

PRÁTICAS DE BIOLOGIA CELULAR

Marcos Gino Fernandes
Jussara Oliveira Vaini
Bruno do Amaral Crispim
Tatiane Zaratini Teixeira



2017

Equipe EdUFGD/2012
Coordenação editorial: Edvaldo Cesar Moretti
Administração: Givaldo Ramos da Silva Filho
Revisão e normalização bibliográfica:
Raquel Correia de Oliveira
Programação visual: Marise Massen Frainer

CONSELHO EDITORIAL
Edvaldo Cesar Moretti - Presidente
Célia Regina Delácio Fernandes
Luiza Mello Vasconcelos
Marcelo Fossa da Paz
Paulo Roberto Cimó Queiroz
Rozanna Marques Muzzi
Wedson Desidério Fernandes

A presente obra foi aprovada de acordo
com o Edital 04/2012/EdUFGD.
Os dados acima referem-se ao ano de 2012.

Editora filiada à

Associação Brasileira
das Editoras Universitárias

Gestão 2015/2019
Universidade Federal da Grande Dourados
Reitora: Liane Maria Calarge
Vice-Reitor: Marcio Eduardo de Barros

Equipe EdUFGD
Coordenação editorial:
Rodrigo Garófalho Garcia
Administração: Givaldo Ramos da Silva Filho
Revisão e normalização bibliográfica:
Cynara Almeida Amaral, Raquel Correia
de Oliveira, Wanessa Gonçalves Silva
Programação visual: Marise Massen Frainer
e-mail: editora@ufgd.edu.br

CONSELHO EDITORIAL
Rodrigo Garófalho Garcia - Presidente
Marcio Eduardo de Barros
Thaise da Silva
Clandio Favarini Ruviano
Gicelma da Fonseca Chacarosqui Torchi
Rogério Silva Pereira
Eliane Souza de Carvalho

Fotos: Marcos Gino Fernandes, Jussara Oliveira Vaini, Bruno do Amaral Crispim e
Tatiane Zaratini Teixeira
Revisão: Tiago Gouveia Faria
Diagramação, impressão e acabamento: Triunfal Gráfica e Editora | Assis | SP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P912 Práticas de biologia celular / Marcos Gino Fernandes ... [et al.] --
Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017. (Coleção Cadernos Acadêmicos).
109p.

ISBN: 978-85-8147-111-2
Possui referências

1. Biologia celular. 2. Microscopia óptica. 3. Aulas práticas. I. Título.

CDD – 574.87

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

© Todos os direitos reservados. Conforme lei nº 9.610 de 1998

SUMÁRIO

Prefácio	5
I. MICROSCOPIA ÓPTICA	
Prática 01 - Estudo do microscópio óptico	7
Prática 02 - Células de cortiça	13
II. EUKARIONTES VEGETAIS	
Prática 03 - Estudo de células da epiderme do catáfilo de cebola (<i>Allium cepa</i>).....	17
Prática 04 - Células da epiderme de pimentão (<i>Capisicum annuum</i>)	23
Prática 05 - Estudo de células da folha de <i>Eloдея sp</i> : ciclose e osmose em célula vegetal	29
Prática 06 - Estudo de células da epiderme inferior de <i>Tradescantia pallida purpurea</i>	37
Prática 07 - Teste de coloração do amido em batata (<i>Tuberculus tuberosae</i>).....	43
III. EUKARIONTES ANIMAIS	
Prática 08 - Observação de células descamadas da mucosa bucal.....	47
Prática 09 - Estudo de osmose em célula animal.....	51
Prática 10 - Mitocôndrias dos leucócitos.....	57
Prática 11 - Estudo de células da escama de peixe	61
IV. CÉLULAS PROCARIONTES (Reino Bactéria)	
Prática 12 - Observação dos tipos de bactérias do iogurte	67
Prática 13 - Observação de células da mucosa oral pela técnica de Gram.....	73

V. CÉLULAS EUCARIONTES (Reinos Fungi e Protista)	
Prática 14 - Células de levedura em fermento biológico.....	79
Prática 15 - Identificação de vários tipos de protistas.....	85
VI. MATERIAL GENÉTICO	
Prática 16 - Extração de DNA de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) e cebola (<i>Allium cepa</i>)	91
Prática 17 - Observação de sêmen de carneiro.....	97
VII. DIVISÃO CELULAR	
Prática 18 - Observação das fases da mitose em raiz de cebola (<i>Allium cepa</i>).....	103
Referências Complementares	109

PREFÁCIO

O estudo da célula é fascinante, pois conhecê-la é entender como a vida se estrutura e funciona. Nesse sentido, observou-se a necessidade da elaboração de uma obra ilustrativa que pudesse auxiliar tanto o professor quanto o aluno. Assim, o primeiro objetivo deste livro é levar aos estudantes, através de orientações sobre aulas práticas, uma introdução à Biologia Celular, contribuindo dessa forma para o processo de ensino-aprendizagem. O segundo objetivo é auxiliar o professor a ministrar de suas aulas práticas por meio dos roteiros descritos neste livro, os quais foram testados várias vezes e aplicados à disciplina de Biologia Celular Básica – Prática, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, lecionada aos alunos do primeiro ano do curso de Ciências Biológicas, Biotecnologia e Gestão Ambiental.

O livro é constituído por um sumário dividido em temas, os quais, por sua vez, apresentam a relação das aulas práticas. Estas são detalhadas e apresentam uma introdução ao assunto tratado, além de objetivos, procedimentos adotados, materiais utilizados, resultados com fotos e legendas explicativas, discussão de cada tema e questões a serem respondidas pelos alunos. As referências bibliográficas são apresentadas de duas maneiras: ou são indicadas no final de cada aula prática – para que o estudante possa aprofundar o assunto –, e remetidas para o final do livro, onde se encontra uma relação de referências complementares que, esperamos, seja de utilidade para os iniciantes no estudo da célula.

Para finalizar, é importante ressaltar que esse Caderno de Aulas Práticas não existiria sem a participação dos alunos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD que cursaram a disciplina de Biologia Celular, e que muito contribuíram para que cada aula prática fosse continuamente melhorada. Também, deve-se destacar a indispensável participação de cada técnico de laboratório dessa Faculdade que já participou dessas aulas, preparando-as e organizando-as sempre de maneira muito dedicada. E, finalmente, especial agradecimento aos professores Mônica Maria Bueno de Moraes (FCBA) e Rodrigo Kelson Silva Rezende (FCA) pelas sugestões e comentários à essa obra.

Os Autores

I. MICROSCOPIA ÓPTICA



Prática 01

Estudo do microscópio óptico

Introdução:

No estudo das ciências biológicas, tem sido particularmente importante o uso do microscópio óptico (M.O.), uma vez que este instrumento permite observações que estão fora do alcance resolutivo do olho humano. Com auxílio da microscopia, células e muitas estruturas subcelulares dos seres vivos podem ser estudadas sob vários aspectos morfofisiológicos.

O microscópio óptico é constituído por duas partes: a mecânica e a óptica. A primeira, responsável pela estabilidade e pelo suporte ao sistema óptico, compõe-se de pé ou base, coluna ou estativa (com um parafuso macrométrico, para uma primeira focalização, e um micrométrico, para detalhar a imagem), mesa ou platina (com *charriot* que movimenta a lâmina para frente, para trás e lateralmente, e parafuso, que movimenta o condensador), e o tubo ou canhão (com o revólver). A parte óptica contém três sistemas de lentes – oculares (encaixa no tubo do M.O), objetivas (rosqueadas ao revólver) e condensador (situado sob a platina) –, além de uma fonte luminosa (na base) e um diafragma (alavanca abaixo da platina). A intensidade da luz pode ser controlada por um botão (regulagem de 1 a 10, na base), que regula a aproximação ou o distanciamento do condensador (em relação à mesa), e pela abertura-fechamento do diafragma (para maior ou menor passagem da luz). Deve-se proceder o correto manuseio do M.O, bem como estar atento ao seu transporte e a sua manutenção.

A qualidade de um microscópio está associada ao poder de resolução/PR (capacidade real para definir detalhes, dependente de fabricação) e ao limite de resolução/LR (capacidade resolutiva teórica/calculada, correspondente à menor distância entre dois pontos para que sejam visualizados separadamente).

O objeto a ser observado deve ser focalizado com o macrométrico, para que se forme uma imagem real, invertida e aumentada (cuja riqueza de detalhes é fornecida pela objetiva). A ampliação total é calculada pelo aumento da ocular (10x) multiplicado (4, 10, 40, 100x) pelo da objetiva, resultando em 40, 100, 400 e até 1000 vezes de aumento real.

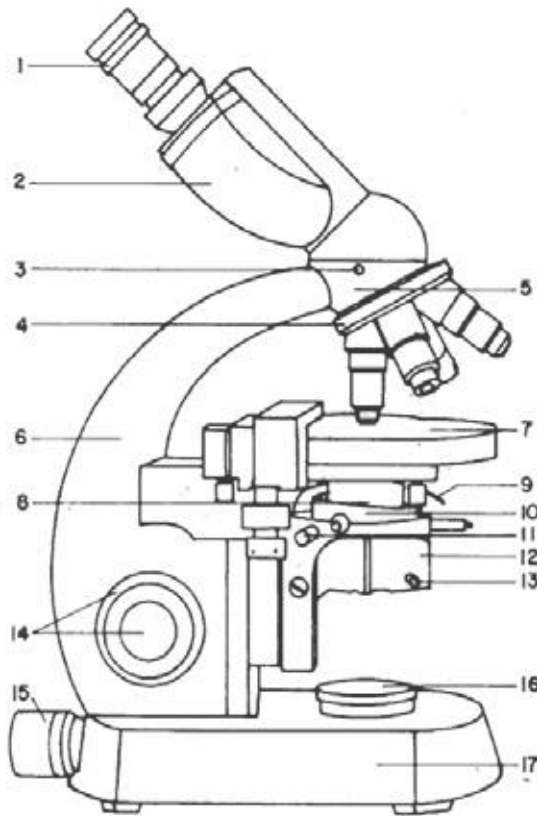


Figura 01: Microscópio óptico composto binocular.

- 1- Lente ocular;
- 2- Tubo binocular;
- 3- Parafuso de fixação;
- 4- Revólver com lentes objetivas;
- 5- Cabeçote;
- 6- Braço ou coluna;
- 7- Platina ou mesa;
- 8- Condensador;
- 9- Diafragma do condensador;
- 10- Manipulador da lente do condensador;
- 11- Parafusos de centralização do condensador;
- 12- Porta-filtros;
- 13- Suporte para lente auxiliar;
- 14- Parafuso macrométrico e parafuso micrométrico;
- 15- Suporte da lâmpada;
- 16- Diafragma de iluminação;
- 17- Pé ou base.

Objetivos:

- Reconhecer as principais partes de um microscópio óptico;
- Aprender a manuseá-lo corretamente.

Materiais:

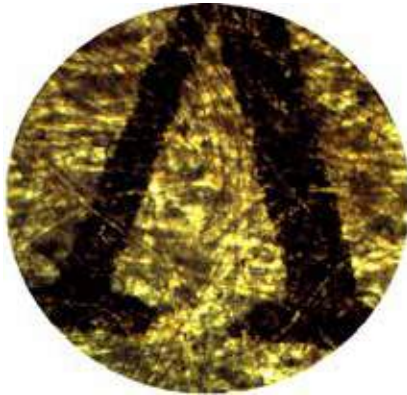
- Microscópio óptico;
- Letras de jornal recortadas;
- Lâmina e lamínula;
- Tesoura;
- Pinça;
- Papel filtro;
- Conta-gotas ou pipeta;
- Água destilada.

Procedimento:

1. Recortar uma pequena letra de jornal;
2. Colocar uma gota de água sobre a lâmina, com auxílio de um conta-gotas ou pipeta;
3. Colocar a letra de jornal (na posição de leitura) sobre a gota de água;
4. Colocar a lamínula na posição de 45° em relação à lâmina, abai-xando-a suavemente;
5. Caso haja excesso de líquido (fora da lamínula), retirá-lo com papel absorvente;
6. Seguir as etapas de focalização indicadas pelo professor;
7. Desenhar nos aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x.

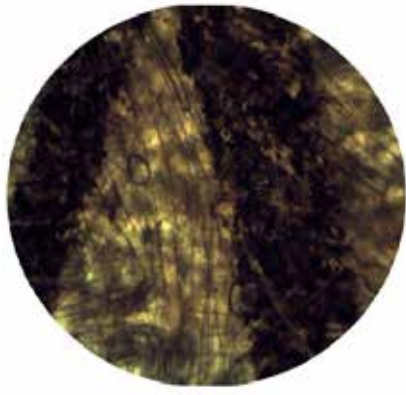
Resultados:

A.



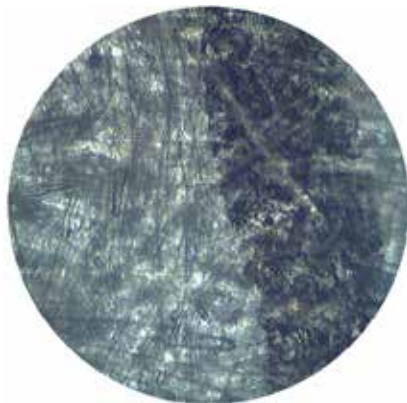
Aumento de 40x

B.



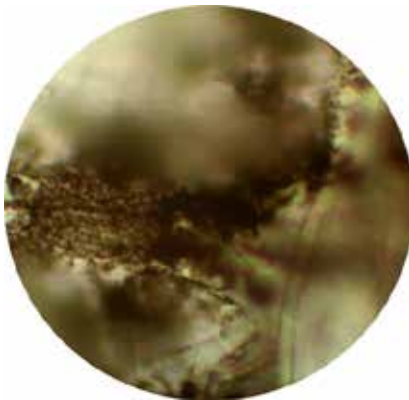
Aumento de 100x

C.



Aumento de 400x

D.



Aumento de 1000x

A letra escolhida (V) fica invertida devido ao funcionamento dos sistemas de lentes do microscópio óptico. Nota-se que, após a primeira focalização, com o macrométrico na objetiva de 4x, seguida do detalhamento com o macrométrico nas lentes objetivas de maior capacidade, a imagem fica muito mais ampliada, sendo possível observar apenas borrões na ampliação total de 1000x.

Discussão:

1. Quais as etapas de focalização do microscópio óptico (fotônico de luz)?
2. Quais as principais partes de um microscópio óptico? E qual a função de cada uma?
3. Quais as diferenças no tamanho da imagem e da área do campo de visão em cada objetiva utilizada?
4. Quais as diferenças observadas, em relação à posição da letra, a olho nu e ao microscópio?
5. Por que é necessária a utilização do óleo de imersão com a lente objetiva de 100x?

6. Qual o aumento total da imagem ao se observar o objeto nas várias objetivas?
7. Qual a diferença entre o aumento da imagem e a ampliação acompanhada do poder de resolução do microscópio?

Referências:

ALBERTS, Bruce et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 866 p.

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004, 125 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998, 163 p.

SILVA, LUCIANO KALABRIC. **Prática de laboratório**. Faculdade Integrada da Bahia. Disponível em: <<http://filer.case.edu/lxs116/biofisio/P2.pdf>>. Acesso em: 7 fev. 2012.

SWANSON, Carl Pontius. **A célula**. São Paulo: Edgar Blucher, 1988, 148 p.



Prática 02

Células de cortiça

Introdução:

A descoberta da célula como unidade funcional da vida só foi possível após a invenção do microscópio por Van Leeuwenhoek. Com este sistema, o cientista holandês conseguiu discernir seres microscópicos, os quais denominou *animalculus*.

Robert Hooke descreve, pouco tempo depois, as células da cortiça, o que permitiu o reconhecimento de que todos os tecidos vivos eram formados por células. Hooke observou cortes finos de cortiça que se apresentavam, ao microscópio, com um aspecto similar a pequenos favos de mel empilhados. O que o cientista efetivamente viu foi a estrutura da cortiça formada pelas membranas dos alvéolos. Ele reportou também ter observado estrutura similar em outras plantas e na madeira. Com base nessas observações, criou o termo **cell** (célula) – da palavra latina que significa pequena cela – para descrever a microestrutura dos sistemas biológicos descobertos por ele a partir da microscopia óptica.

A cortiça é o revestimento exterior do tronco e dos ramos do Sobreiro (*Quercus suber* L.), sendo constituída por células mortas, sem espaços vazios entre si. Em cortes feitos radial e transversalmente, as células da cortiça apresentam-se praticamente iguais, como polígonos de 4 a 6 lados. As células exibem uma estrutura semelhante a um favo de mel, e suas paredes laterais são enrugadas devido à compressão a que as células estão sujeitas durante o crescimento em espessura.

É preciso notar que a importância da *célula*, como unidade funcional de todos os organismos vivos, só foi definitivamente compreendida no séc. XIX, com a *teoria celular*, formulada por dois cientistas alemães, Mathias Schleiden e Theodor Schwann. Essa teoria defendia que todos os seres vivos são constituídos por células e que estas correspondem a um tipo de “fábrica química”, onde se realizam todos os processos necessários à vida do organismo. Por outro lado, propunha ainda que cada célula deriva de outra célula preexistente.

Objetivos:

- Observar a morfologia das células da cortiça.

Materiais:

- Cortiça (rolha);
- Gilete;
- Pinça;
- Água destilada;
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur;
- Lâminas e lamínulas.
- Papel filtro.

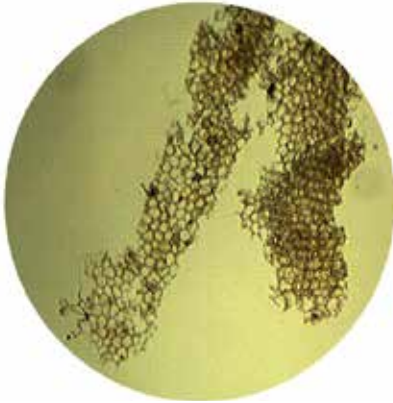
Procedimento:

1. Realizar um corte delgado da cortiça com auxílio de uma gilete;
2. Depositar este corte em uma lâmina e acrescentar uma gota de água destilada;
3. Iniciar a colocação da lamínula em posição de 45° em relação à lâmina e abaixá-la lentamente, até que a mesma fique totalmente sobre a lâmina, evitando a formação de bolhas de ar entre elas;
4. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
5. Analisar em aumentos crescentes, utilizando as objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x;

6. Esquematizar o material observado nos quatro aumentos do microscópio óptico.

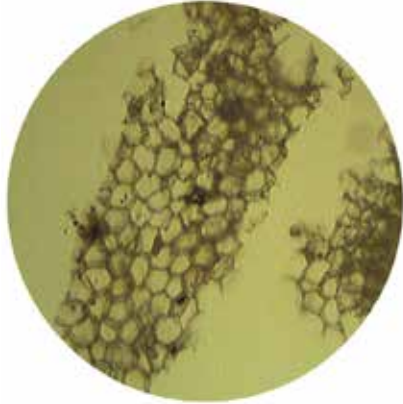
Resultados:

A.



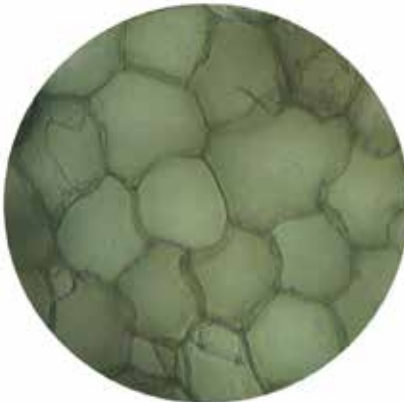
Aumento de 40x

B.



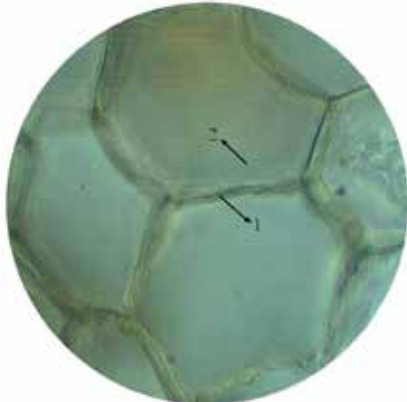
Aumento de 100x

C.



Aumento de 400x

D.



Aumento de 1000x

1- Parede celular

2- Espaço vazio

No aumento de 400x observam-se as células da cortiça, que são citoplasmaticamente mortas, apresentando ar em seu interior.

Discussão:

1. O que é célula?
2. Quem foi o primeiro cientista a designar o termo célula?
3. Como a cortiça é observada ao microscópio óptico?
4. Comente sobre a teoria celular formulada por Mathias Schleiden e Theodor Schwann.

Referências:

BRITO, Armando de Sousa. Quem tramou Robert Hooke? **Ciência e Tecnologia dos Materiais**, v. 20, n. 3/4, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/ctm/v20n3-4/v20n3-4a07.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2012.

CREMASCO, Selma Aparecida. **Caderno Pedagógico Sobre Material Genético**. Londrina: Secretaria de Estado de Educação, 2008. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/918-2.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

VIEIRA, Henrique Duarte. **Análise de características da cortiça amadia relevantes para a sua qualidade industrial**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009. Disponível em: <<http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/1926>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

II. EUCARIONTES VEGETAIS



Prática 03

Estudo de células da epiderme do catáfilo de cebola (*Allium cepa*)

Introdução:

Célula é a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos. Apesar da grande diversidade existente, apenas dois padrões celulares básicos são levados em consideração: procariotas (células não compartimentadas) e eucariotas (células mais complexas, com o material genético organizado num compartimento/núcleo (uma endomembrana denominada envoltório nuclear) distinto do citosol e demais compartimentos.

Todos os organismos são formados por células, que diferem na forma, no tamanho e nas funções que exercem. A superfície das células vegetais (que obedecem ao padrão estrutural eucariótico) é formada pela membrana plasmática e pela parede celulósica (camada mais externa, espessa e rígida).

A superfície celular vegetal possui pequenas descontinuidades que colocam uma célula em contato com aquelas que a cercam: os plasmodesmos, canais estreitos delineados pela membrana plasmática e atravessados pelo desmotúbulo (estreita cisterna do retículo endoplasmático). Já no citoplasma, chama a atenção a presença de vacúolos delimitados por uma endomembrana denominada tonoplasto. Em geral, as células vegetais adultas possuem um único e grande vacúolo, que chega a ocupar cerca de 95% da área celular, com a função de armazenar água e outras substân-

cias. Também há outras estruturas típicas vegetais, como os plastos, que, no caso de não possuírem pigmentos, correspondem aos leucoplastos (plastos incolores, cuja função é armazenar lipídios/oleoplastos, amido/amiloplastos e proteínas/proteoplastos).

Em relação ao bulbo da cebola, trata-se de um caule subterrâneo que apresenta túnicas carnudas e sobrepostas. Cada túnica é uma folha modificada em forma de escama, que acumula substâncias de reserva. Na superfície côncava de cada uma dessas túnicas, existe uma epiderme, ou seja, uma película fina, facilmente destacável e constituída por uma só camada de células.

Porém, mesmo com a ampliação, não é possível observar muitas estruturas celulares no interior das células da epiderme do catáfilo de *Allium cepa*. Uma técnica que permite observar melhor a estrutura celular consiste em corar a preparação com uma substância especial que, neste caso, corresponde ao lugol.

Objetivos:

- Conhecer a morfologia de uma célula eucariótica vegetal;
- Realizar a coloração de células vegetais;
- Diferenciar material corado e não corado;
- Observar núcleo, citoplasma e parede celular.

Materiais:

- Catáfilo de cebola;
- Placa de Petri;
- Lâmina e lamínula;
- Lugol ou cloreto de zinco iodado;
- Papel absorvente;
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur;
- Pinça;
- Cronômetro ou relógio.

Procedimento A:

1. Destacar um pedaço da epiderme do catáfilo da cebola (de preferência a parte interna);
2. Pingar uma gota de água sobre o material distendido;
3. Iniciar a colocação da lamínula em posição de 45° em relação à lâmina e abaixá-la lentamente, até que a mesma fique totalmente sobre a lâmina, evitando a formação de bolhas;
4. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
5. Analisar em aumentos crescentes, utilizando as objetivas de 4x, 10x e 40x;
6. Esquematar com ampliação total de 100x e 400x para o relatório, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

Procedimento B:

1. Realizar os passos 1 e 2 do procedimento A;
2. Pingar uma gota de lugol ou cloreto de zinco iodado sobre o material distendido, deixando corar por 5 minutos;
3. Iniciar a colocação da lamínula como descrito no procedimento A;
4. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
5. Analisar em aumentos crescentes de objetivas;
6. Esquematar com ampliação total de 100x e 400x para o relatório, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

Resultados:

A.



Aumento de 100x – Sem corante

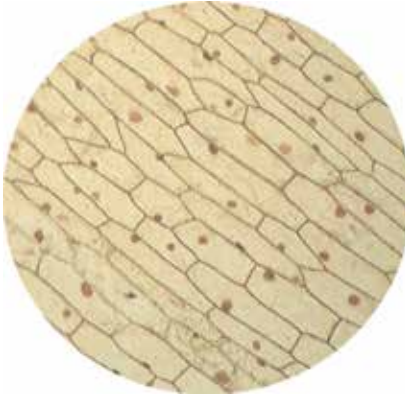
- 1- Parede celular
- 2- Núcleo
- 3- Citoplasma

B.



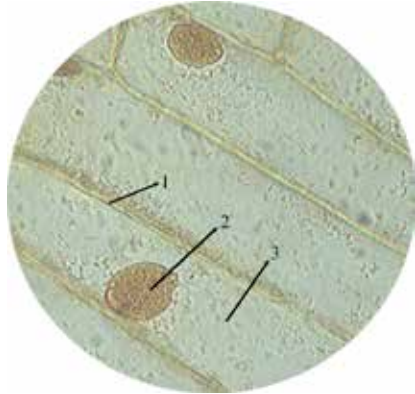
Aumento de 400x – Sem corante

C.



Aumento de 100x – Com corante

D.



Aumento de 400x – Com corante

- 1- Superfície de células adjacentes
(membrana plasmática + parede celular + lamela média+ parede celular+ membrana plasmática)
- 2- Núcleo
- 3- Citoplasma

No aumento de 100x sem material corado, o núcleo não é evidenciado em todas as células; já no material corado, o núcleo é bem visível em todas as células.

Discussão:

1. Quais as estruturas das células da epiderme da cebola que puderam ser observadas?
2. Qual a característica mais importante a ser considerada para a eficácia na observação de um material analisado em microscopia óptica (que utiliza luz branca)?
3. A observação das células é melhor quando estas estão coradas ou não coradas? Por quê?
4. Com que finalidade são utilizados os corantes? Quando o seu uso é dispensado?
5. Qual a diferença entre corantes supravital ou vital e não vital?
6. Defina o preparo de lâminas a fresco (*in vivo*) ou não permanentes (*in vitro*) e permanentes.
7. Por que é necessário fixar o material biológico destinado ao preparo de lâminas permanentes?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Micotécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

FREITAS, Eduardo. **Observação microscópica de seres vivos de uma infusão**. Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco I. Funchal: Escola Secundária Francisco Franco, 2003. Disponível em: <http://fq.no.sapo.pt/download/Observacao_de_serres_vivos_de_uma_infusao.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2012.

SOARES, Cristina Pacheco; SILVA, Newton Soares da. **Práticas de biologia celular**. [S.l.] Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000147.PDF>>. Acesso em: 17 abr. 2012.



Prática 04

Células da epiderme de pimentão (*Capsicum annuum*)

Introdução:

As células vegetais são revestidas por membrana plasmática de estrutura semelhante a da animal. Externamente, possui a parede celulósica (camada mais espessa e rígida). Contém ainda estruturas típicas, tais como plasmodesmos, plastídios, glioxissomas e vacúolos de reserva (maiores e em número inferior àqueles das células animais, como os lisossomos secundários).

Existem diversos tipos de plastídios (que podem se transformar uns nos outros), podendo ser classificados, conforme o material que contém, em cromoplastos (pigmentos não fotossintéticos), cloroplastos (clorofila e outros pigmentos fotossintéticos) e leucoplastos (incolores).

O pimentão é um vegetal encontrado em três tipos mais comuns: verde, amarelo e vermelho (este último é um fruto rico em cromoplastos, que são plastos coloridos, portadores de pigmentos diversos que estão dissolvidos em gotículas lipídicas ou em estruturas cristalinas). As células do pimentão são realmente muito didáticas para visualização das estruturas celulares.

Os cromoplastos, de acordo com sua coloração, podem ser classificados em:

- Eritroplastos (eritro = vermelho) – plastos vermelhos, cuja coloração tem predominância de carotenos, encontrados no pimentão vermelho e no tomate;
- Xantoplastos (xanto = amarelo) – plastos amarelos, com predominância de xantofilas, encontrados principalmente no pimentão amarelo e na cenoura;
- Cloroplastos (cloro = verde) – plastos verdes, com predominância de clorofilas, encontrados, por exemplo, no pimentão verde e nas folhas de vegetais.

Existem ainda os plastos incolores e os leucoplastos (leuco=branco).

Objetivos:

- Observar parede celular, núcleo e cromoplastos das células.

Materiais:

- Pedacos de pimentão;
- Gilete ou estilete;
- 2 lâminas e 2 lamínulas;
- Água destilada;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Papel filtro.

Procedimento A:

1. Fazer um corte fino, pequeno e transparente na casca do pimentão amarelo;
2. Depositar sobre a lâmina e adicionar uma gota de água destilada;
3. Cobrir com a lamínula (retirar excesso de água com papel filtro, se necessário);

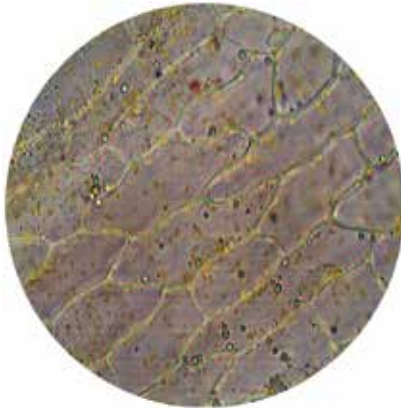
4. Observar ao microscópio nos aumentos totais de 40x, 100x, 400x e 1000x. Nos aumentos de 400x e 1000x, fechar levemente o diafragma;
5. Para o relatório, esquematizar nos aumentos de 400x e 1000x;
6. Identificar as estruturas celulares reconhecidas.

Procedimento B:

1. Fazer outro corte, agora na casca do pimentão vermelho;
2. Seguir os passos do procedimento anterior;
3. Observar ao microscópio como anteriormente. Esquematizar as observações nos aumentos de 400x e 100x, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

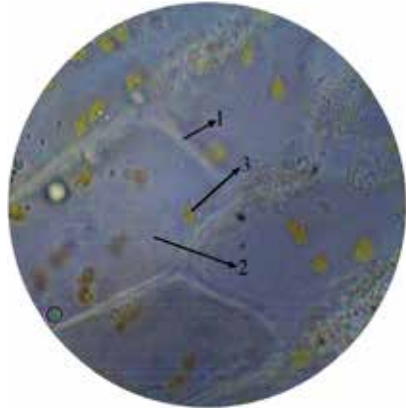
Resultados:

A.



Aumento de 400x

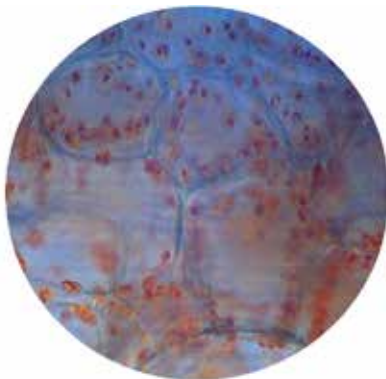
B.



Aumento de 1000x

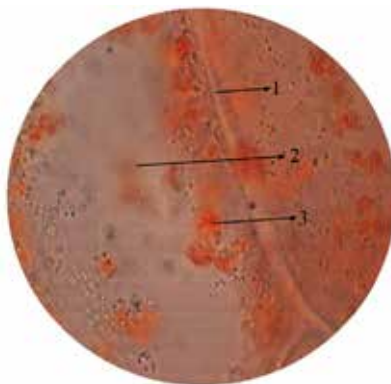
- 1- Parede celular
- 2- Citoplasma
- 3- Xantoplasto

C.



Aumento de 400x

D.



Aumento de 1000x

- 1- Parede celular
- 2- Citoplasma
- 3- Eritroplasto

No procedimento A, com o pimentão amarelo, observa-se os xantoplastos (pigmentos amarelos), a parede celular e o citoplasma. Já no procedimento B, com o pimentão vermelho, em vez dos xantoplastos, visualizam-se os eritroplastos (pigmentos vermelhos).

Discussão:

1. Quais estruturas da célula foram observadas?
2. Quais tipos de cromoplastos foram observados em cada pimentão?
3. Quais os tipos de cromoplastos existentes? E onde são encontrados?
4. Por que os cortes devem ser finos e transparentes?
5. Como os plastos afetam as plantas?
6. No corte observado havia camadas de células sobrepostas? Por quê?
7. Por que foi possível observar os plastídeos do pimentão sem a utilização de corantes?

Referências:

FREITAS, Eduardo. **Observação microscópica de seres vivos de uma infusão**. Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco I. Funchal: Escola Secundária Francisco Franco, 2003. Disponível em: <http://fq.no.sapo.pt/download/Observacao_de_seres_vivos_de_uma_infusao.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2012.

FREITAS, Eduardo. **Observação da célula eucariótica vegetal**: amiloplastos e grãos de amido em batata (*Solanum sp*); Cromoplastos e grãos de licopénio tomate (*Lycopersicon esculentum*); Grãos de licopénico e pimentão (*Capsicum annum*). Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco I. Funchal: Escola Secundária Francisco Franco, 2003. Disponível em: <http://fq.no.sapo.pt/download/Relatorio_da_Batata.pdf>. Acesso em: 2 mar. 2012.

JORDÃO, Berenice Quinzani et. al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998, 163 p.

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica geral**. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489 p.



Prática 05

Estudo de células da folha de *Elodea sp*: ciclose e osmose em célula vegetal

Introdução:

A *Elodea sp.* é uma planta aquática submersa, encontrada na água doce de regiões tropicais. Esta monocotiledônea apresenta folhas com nervuras paralelas. A *Elodea* é muito utilizada na observação da morfologia de células eucarióticas vegetais, cujos cloroplastos, de coloração verde devido à presença de clorofila, são facilmente identificáveis no citoplasma.

O citoplasma se apresenta em constante movimento, proporcionado pelo citoesqueleto. O movimento é circular, em torno do vacúolo central e, por isso, denominado de ciclose ou corrente citoplasmática. A ciclose se origina pela interação dos filamentos de actina e miosina que geram o movimento de partículas e organelas citoplasmáticas, possibilitando, por exemplo, o deslocamento dos cloroplastos de acordo com a intensidade luminosa. Assim, estas organelas se espalham quando há pouca luz e se agrupam quando há excesso de luz.

A profundidade de foco, em células de *Elodea*, pode ser analisada girando-se o parafuso micrométrico, de modo a se observar dois planos de foco.

A ultraestrutura da membrana plasmática só pode ser demonstrada através da microscopia eletrônica. Porém, pode-se demonstrar sua presença em células animais e vegetais através de algumas experimentações,

uma vez que, dentre suas várias funções, ela delimita o meio intracelular e seleciona as moléculas que devem ou não penetrar na célula.

Quando se coloca uma célula vegetal em uma solução, ela ganha ou perde água conforme o potencial hídrico (menor ou maior) em relação ao do meio externo. Dessa forma, se o meio intracelular for maior (positivamente) do que o meio extra (hipertônico), a célula perderá água, ocorrendo retração da membrana plasmática até separar-se da parede (por diminuição, devido à saída de água, de volume vacuolar e do protoplasma restante) fenômeno denominado plasmólise. O processo inverso, por sua vez, é denominado desplasmólise (ganho de água pela célula ao passar do meio hiper para hipotônico). Ambos os fenômenos só ocorrem porque o protoplasma é envolvido por uma membrana dotada de permeabilidade seletiva, que mantém a isotonia entre os meios externo e interno pela alternância entre transportes passivos/ativos.

Cerca de 10% da passagem aquosa total se dá por osmose através da bicamada lipídica, e o restante pelos canais protéicos/aquaporinas, enquanto a passagem de solutos (moléculas pequenas e íons) lipossolúveis ocorre pela bicamada e a dos hidrossolúveis por canais protéicos e proteínas carreadoras, através de transportes passivo e ativo. A membrana plasmática, além de ser um limite físico entre meios intra e extracelular, ajuda a manter a isotonia entre estes (por sua permeabilidade seletiva).

A parede celular vegetal é impermeável (não oferece restrição à passagem de água e solutos, exceto moléculas muito grandes). Como os microporos e microcapilares de sua estrutura estão cheios de água, retida, as moléculas gasosas não a atravessam. No tecido que perde água por evaporação (transpiração), as paredes celulares estarão sempre hidratadas, já que o fluxo de água se dá do vacúolo para a parede. As células perdem água, tendendo à retração, sem que a membrana plasmática se separe da parede celular, e quando ganham água não chegam a se romper devido à rigidez da parede celular.

Objetivos:

- Conhecer a morfologia da célula eucariótica vegetal;
- Observar a organização das células na formação do tecido foliar;
- Observar parede celular, citoplasma e cloroplastos (organelas fotossintetizantes);
- Observar o movimento de ciclose da célula;
- Observar a profundidade de foco (células em três dimensões);
- Observar os fenômenos da plasmólise e da desplasmólise em célula vegetal;
- Verificar a existência da membrana plasmática.

Materiais:

- Microscópio de luz;
- *Elodea* sp;
- Lâmina e lamínula;
- Água destilada;
- Solução salina 2,0%;
- Placa de Petri;
- Papel filtro;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur.

Procedimento A:

1. Colocar um folíolo de *Elodea* sobre uma lâmina contendo uma gota de água;
2. Iniciar a colocação da lamínula na posição de 45° em relação à lâmina, evitando a formação de bolhas de ar. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
3. Observar em aumentos crescentes (40x, 100x, 400x);

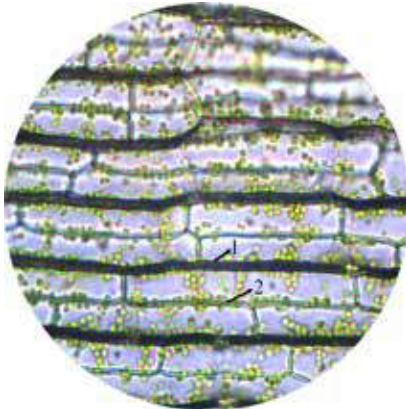
4. Esquematizar as observações nas três últimas objetivas, identificando as estruturas celulares observadas.

Procedimento B:

1. Em uma nova lâmina, colocar outro folíolo de *Elodea*. Em seguida, colocar uma gota de solução salina 2,0% sobre o folíolo;
2. Após um minuto, observar ao microscópio o que acontece com as células e desenhar nos aumentos de 100x e 400x;
3. Logo após, acrescentar água destilada por capilaridade no preparado (colocar uma gota da solução na borda da lamínula e, com o auxílio de papel de filtro, puxá-la para o interior do preparado). Observar e desenhar nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

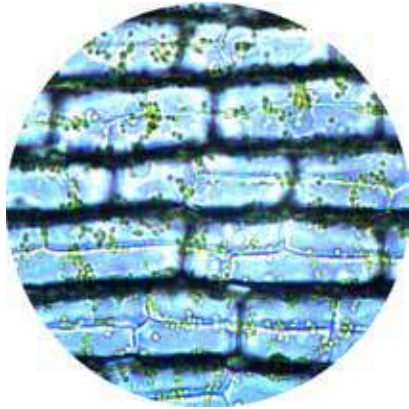
A.



Aumento de 100x

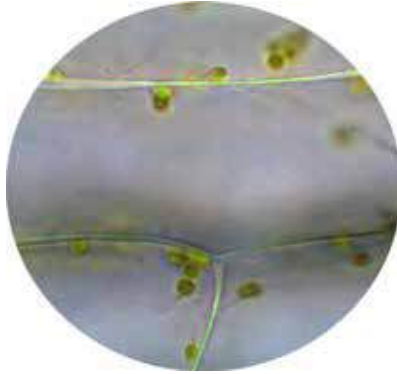
1, 2 - Profundidade de foco

B.



Aumento de 400x

C.

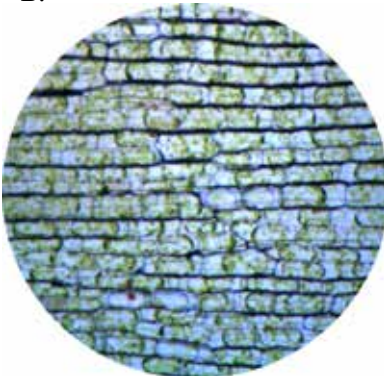


Aumento de 1000x

Nessas fotos, observa-se que os cloroplastos estão próximos da parede celular em virtude do aumento do vacúolo, o que torna o citoplasma periférico. É onde, igualmente, se dá o movimento de ciclose. Percebe-se também, através da profundidade de foco, a sobreposição das camadas de células, sendo a região da camada superior indicada pela seta (1), enquanto a seta (2) indica as paredes celulares da camada inferior no aumento de 100x (A.).

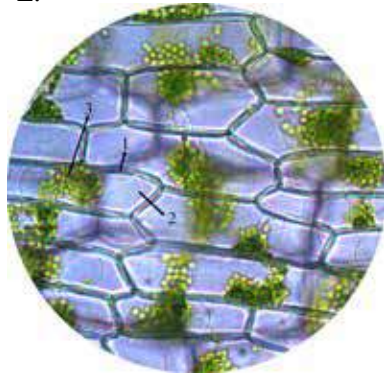
Plasmólise

D.



Aumento de 100x

E.

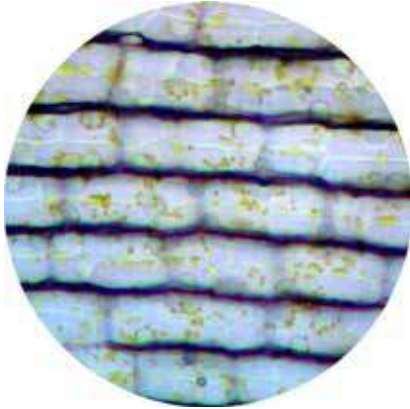


Aumento de 400x

- 1- Parede celular
- 2- Membrana plasmática
- 3- Cloroplasto

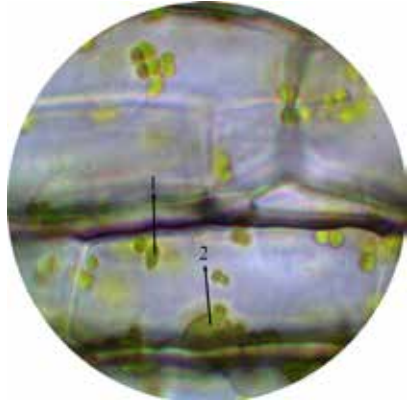
Desplasmólise

F.



Aumento de 400x

G.



Aumento de 1000x

- 1- Cloroplasto
- 2- Núcleo

Percebe-se, nos aumentos de 100x e 400x, referentes à plasmólise (fotos D. e E.), os cloroplastos agrupados na região central da célula em virtude desse fenômeno. Observa-se, ainda, a evidência da membrana plasmática (foto E.). Nas fotos referentes à desplasmólise, os cloroplastos voltaram à posição inicial, ou seja, próximos à parede celular (fotos F. e G.).

Discussão:

1. Como ocorre, o que é e qual a função da ciclose?
2. Qual a posição dos cloroplastos da folha da *Elodea* durante a ciclose?
3. Como os cloroplastos reagem com a intensidade luminosa?
4. Como pode ser analisada, ao microscópio, a profundidade de foco?
5. Por que nas células da *Elodea* observam-se diversos cloroplastos e, nas células da cebola (aula anterior), o mesmo não ocorre?

6. Descreva o que ocorreu com as células colocadas em diferentes soluções.
7. Em qual solução ocorreu a plasmólise? Explique o termo.
8. Em que momento ocorreu desplasmólise? Explique o termo.
9. Qual das soluções é a isotônica? Por quê? O que é solução hiper e hipotônica?
10. Por que a célula vegetal não se rompe em meio hipotônico?
11. Por que é possível, neste experimento, demonstrar a existência da membrana plasmática, mesmo sem conseguirmos vê-la?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Micotécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: Ed. UEL, 1998. 163 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica geral**. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489p.

RENZI, Denise; SOBREIRA, Marlene Marques; LIMA, Selma Miranda Rosa. **Estratégias didático-pedagógicas para o ensino da célula**. Caderno pedagógico do Programa do Desenvolvimento Educacional. UEL. 2008. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1474-6.pdf>> Acesso: 06 fev. 2012.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.



Prática 06

Estudo de células da epiderme inferior de *Tradescantia pallida purpurea*

Introdução:

Uma célula vegetal, além da membrana plasmática, possui parede celular constituída basicamente por celulose, que, sendo espessa e resistente, confere sustentação e proteção mecânica à célula.

O vacúolo é uma estrutura que pode ocupar até 95% do volume de uma célula madura. É revestido por endomembrana lipoprotéica e tem a função de armazenar água e outras substâncias (participa do controle das trocas hídricas entre a célula e o meio extracelular e é responsável pela manutenção da pressão osmótica celular). Pode apresentar cristais de oxalato de cálcio, inclusões que proporcionam proteção contra herbívoros (por causarem irritações no trato digestório de vertebrados e invertebrados quando ingeridos e também por atuarem no controle dos níveis de cálcio). Esses cristais estão associados ao efeito tóxico de algumas plantas, tais como a comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia picta*). Outras possíveis funções dos cristais permanecem ligeiramente obscuras, sem prova científica.

Pode-se observar ainda, nesta aula, os estômatos, estruturas que controlam a difusão de CO₂ e de vapor de água. A absorção de água nas

plantas ocorre quando o potencial hídrico do vegetal é menor em relação ao potencial hídrico do solo. Essa diferença provém principalmente da perda por transpiração, processo caracterizado pela participação dos estômatos.

Os estômatos se localizam principalmente na região adaxial (inferior) das folhas, podendo ainda ser encontrados, mas em menor quantidade, nos caules verdes. São constituídos por células subsidiárias e duas células-guardas que formam um poro ou abertura, denominada ostíolo.

A perda de água ocorre devido à aquisição da luz solar e do dióxido de carbono (fundamentais no processo fotossintético), devendo ocorrer uma exposição da superfície foliar para maior captação desses. Entretanto, tal fato favorece a transpiração, pois ao mesmo tempo que a planta expõe a superfície foliar aos raios luminosos e ao CO₂ atmosférico, há perda de vapor de água (e o vegetal deve controlar o balanço hídrico). Uma maneira de se evitar a perda excessiva de água é por meio de uma barreira que cobre as paredes celulares externas da epiderme das folhas e do caule, denominada cutícula.

Outra característica da célula vegetal é a presença de plastos, como os cloroplastos (onde se localizam pigmentos, enzimas e coenzimas responsáveis pela formação dos compostos orgânicos, através do processo da fotossíntese).

A *Tradescantia pallida purpurea* apresenta, na epiderme de suas folhas, uma grande quantidade de estômatos, cloroplastos e vacúolos (com cristais de oxalato de cálcio e pigmento antocianina, que lhe confere coloração roxa intensa). Ela é uma espécie bioindicadora que serve como ferramenta do controle de qualidade ambiental do ar, solo e água.

Objetivos:

- Observar estômato e ostíolo, cristais de oxalato de cálcio, cloroplastos e vacúolos (ráfides, monocristais).

Materiais:

- Folha de *Tradescantia*;
- Lâmina e lamínula;
- Água destilada;
- Papel filtro;
- Cloreto de zinco iodado ou lugol;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur.

Procedimento A:

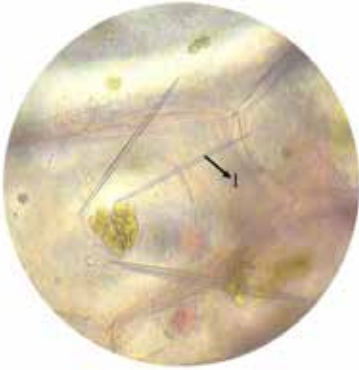
1. Retirar um pedaço da epiderme inferior da folha de *Tradescantia* e colocar em uma lâmina contendo uma gota de água destilada;
2. Cobrir com lamínula. Retirar o excesso de água, se necessário;
3. Observar ao microscópio nos aumentos de 40x, 100x e 400x;
4. Esquematizar para o relatório no aumento de 1000x.

Procedimento B:

1. Retirar a lâmina do microscópio;
2. Colocar algumas gotas do corante lugol na borda da lamínula e, com auxílio de papel de filtro, forçar a solução para junto do preparado;
3. Aguardar alguns minutos e observar novamente ao microscópio;
4. Esquematizar as observações nos aumentos de 400x, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

Resultados:

A.



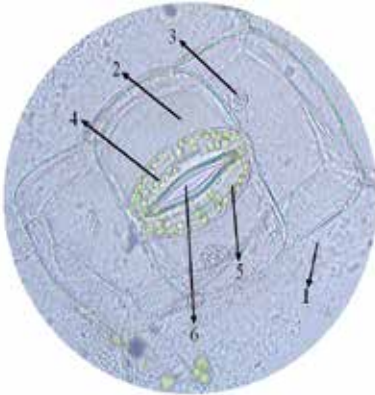
Aumento de 1000x – Sem corante
1- Ráfides

B.



Aumento de 1000x – Sem corante
1- Monocristais

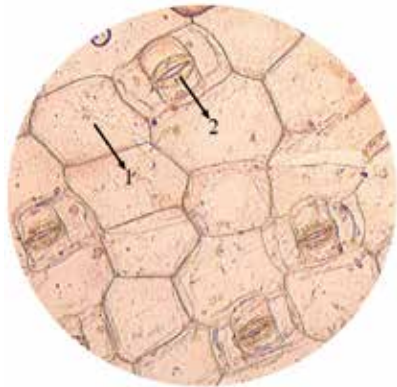
C.



Aumento de 1000x – Sem corante
Estômato com as seguintes estruturas:

- 1- Célula epidérmica
- 2- Célula subsidiária
- 3- Núcleo
- 4- Célula-guarda
- 5- Cloroplasto
- 6- Ostíolo

D.



Aumento de 400x – Com corante

- 1- Célula epidérmica
- 2- Estômato

Observa-se, no aumento de 1000x sem corante, cristais de oxalato de cálcio do tipo ráfidés (foto A), monocristais (foto B) e estômatos (foto C). No material corado, com aumento de 400x, evidenciam-se mais as células epidérmicas (foto D) e os estômatos, com as mesmas estruturas observadas na foto C. O uso do corante também possibilita uma melhor visualização do núcleo.

Discussão:

1. Qual a função do estômato em células vegetais?
2. Para que serve o vacúolo em uma célula vegetal?
3. Sabe-se que há diferenças significativas entre uma célula vegetal e animal. Cite algumas características presentes apenas em células vegetais.
4. Qual é o papel desempenhado pelos cristais ou pelas inclusões protoplasmáticas?
5. Qual a finalidade em se utilizar cloreto de zinco iodado na preparação da lâmina?

Referências:

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica geral**. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489 p.

PAIVA, Elder Antônio Sousa; MACHADO, Silvia Rodrigues. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Brazil, v.48, n. 1, p. 147-153, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v48n1/a19v48n1.pdf>>. Acesso em: 3 abr. 2012.

RENZI, Denise; SOBREIRA, Marlene Marques; LIMA, Selma Miranda Rosa. **Estratégias didático-pedagógicas para o ensino da célula**. Caderno pedagógico do Programa do Desenvolvimento Educacional. UEL. 2008. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1474-6.pdf>>. Acesso: 06 abr. 2012.

SAVÓIA, Eriane Justo Luiz. **Potencial de Tradescantia pallida cv. Purpurea para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo, por meio do bioensaio Trad-MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos.** Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-20062007-154214/pt-br.php>>. Acesso em: 3 abr. 2012.



Prática 07

Teste de coloração do amido em batata (*Tuberculus tuberosae*)

Introdução:

O amido é um polissacarídeo cuja unidade monossacarídica é a glicose. Está presente na maioria dos vegetais com a função inicial de armazenar energia coletada pela fotossíntese. A principal razão para a conversão fotossintética de açúcar em amido é que esta forma de armazenamento é vantajosa para a planta, pois a molécula de amido é insolúvel em soluções aquosas e à temperatura ambiente e, dessa maneira, não provoca desbalanço osmótico, como o açúcar armazenado em grandes quantidades.

Quando há a produção de amido, este é empacotado em pequenos grânulos que variam de tamanho em função da fonte (mandioca, milho, batata, etc.). Apresenta-se sob duas formas: amilose, que consiste em longas cadeias não ramificadas, as quais, na presença de iodo, apresentam coloração roxo-azulada; e amilopectina, que contém cadeias altamente ramificadas e apresentam coloração marrom-avermelhada. Ambas estão presentes, em proporções variáveis, nos tecidos vegetais de reserva.

O amido pode ser classificado como 1) amido primário, que se forma nos cloroplastos pela fotossíntese, sendo ali armazenado temporariamente, e como 2) amido secundário, que é armazenado nos amiloplastos, como substâncias de reserva, em órgãos não expostos à luz.

O grão de amido é constituído de hilo (ponto inicial de formação) e lamelas ou estrias (zonas claras e escuras). Na análise microscópica, devem ser observadas características como a forma (esféricos, ovóides, poliédricos, periformes, elipsóides etc.), a presença de lamelas, o tipo de hilo (pontuado, estrelado, linear etc.) e o estado de agregação.

O amido é encontrado em sementes, raízes, tubérculos, bulbos e, em alguma porcentagem, nos caules e nas folhas dos vegetais. Encontrase em grandes quantidades na batata, no milho, nas sementes de leguminosas, nas frutas, no pão, no arroz, no macarrão e nos cereais.

Objetivos:

- Visualizar o amido na batata;
- Observar a morfologia do amido.

Materiais:

- Batata inglesa;
- Gilete;
- Lâmina e lamínula;
- Corante lugol.
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Cronômetro ou relógio;
- Papel filtro;

Procedimento:

1. Raspar, com o auxílio da gilete, o interior do tubérculo da batata;
2. A seguir, de modo homogêneo, passar o material retirado da batatinha sobre a lâmina e diluí-lo com corante Lugol;
3. Deixar o material corar por 5 minutos;
4. Cobrir com lamínula;
5. Observar a lâmina nos aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x;

6. Desenhar, identificando as estruturas celulares observadas nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

A.



Aumento de 400x

- 1- Hilo
- 2- Lamelas

B.



Aumento de 1000x

Nesta aula pode-se observar a morfologia do grão de amido presente na batata, identificando o hilo, que é o ponto inicial de formação das lamelas, conforme as ilustrações da foto.

Discussão:

1. Qual a função do amido nas plantas?
2. Quais as formas dos grãos de amido observadas? Como se comportam na presença de iodo?
3. Qual a diferença entre amido primário e amido secundário?
4. Defina hilo e indique como a sua posição varia nos grãos de amido.
5. Quais outras plantas poderiam ser usadas para a observação do amido?

Referências:

CUNHA Verena Augusta Guimarães et al. **Efeito do Annealing nas propriedades físico-químicas dos amidos de diferentes fontes botânicas.** [S.l.]. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_08122773680.pdf>. Acesso em: 1 abr. 2012.

FERRI, Maria Guimarães. **Botânica:** morfologia interna das plantas (anatomia). 9. ed. São Paulo: Nobel, 2007. 114 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular.** Londrina: UEL, 1998. 163 p.

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica geral.** 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489 p.

III. EUCARIONTES ANIMAIS



Prática 08

Observação de células descamadas da mucosa bucal

Introdução:

Membranas mucosas são estruturas que forram superfícies úmidas de cavidades do corpo e que se comunicam com o meio externo. A mucosa bucal reveste toda a cavidade bucal. Apresenta células epiteliais pavimentosas estratificadas e não queratinizadas, com formato irregular, núcleo central e esférico, citoplasma granuloso e bordos dobrados, quando observadas em lâminas histológicas (tais células não têm parede celular rígida, típica de células vegetais). A membrana plasmática, por ser muito fina, não é observada com microscopia óptica. Porém, evidenciamos a sua presença através do limite celular.

Para a preparação da lâmina da mucosa bucal, é preciso fazer um esfregaço na bochecha e outro na lâmina de microscopia, pois isso permite espalhar as células, propiciando uma melhor observação.

Essas células, além de serem pequenas, não apresentam contraste entre os seus constituintes, por isso é necessária a utilização de corante. Sendo assim, de acordo com os constituintes a observar, deve-se empregar o corante certo. Para esta atividade, será utilizado o azul de metileno, um corante básico que atua preferencialmente sobre o núcleo, corando-o de azul. Ele é um corante supravital, ou seja, usado para corar células vivas (que contém moléculas de natureza ácida e, portanto, basófilas) recém removidas do organismo, sem alterar muito sua estrutura (por ser pouco tóxico).

Objetivos:

- Preparar lâmina “a fresco” das células da mucosa bucal com e sem coloração.

Materiais:

- Palitos de madeira (Swab);
- Lâmina e lamínula;
- Solução salina 2%;
- Azul de metileno;
- Papel de filtro;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur.

Procedimento A:

1. Raspar a mucosa bucal com o auxílio de um palito de madeira (Swab);
2. Com o material colhido fazer um esfregaço fino e transparente sobre uma lâmina seca;
3. Deixar a lâmina secar movimentando-a no ar;
4. Pingar uma gota de solução salina sobre o material;
5. Cobrir com lamínula e observar ao microscópio nos aumentos de 40x, 100x e 400x;
6. Esquematizar o material observado no aumento de 400x.

Procedimento B:

1. Retirar a lâmina do microscópio;
2. Substituir, por capilaridade, a solução salina da mesma preparação pelo corante azul de metileno;
3. Esperar cinco minutos para corar bem e, em seguida, observar ao microscópio;
4. Esquematizar o material observado nos aumentos de 100x, 400x e 1000x, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

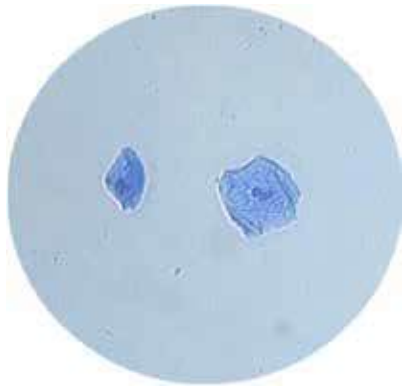
Resultados:

A.



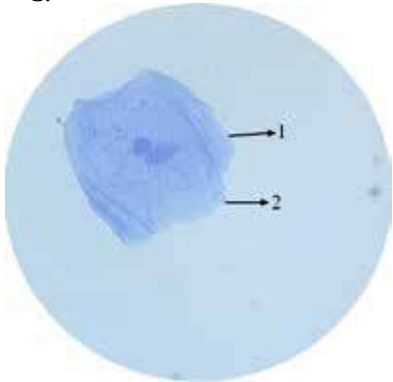
Aumento de 400x – Sem corante

B.



Aumento de 100x – Corante

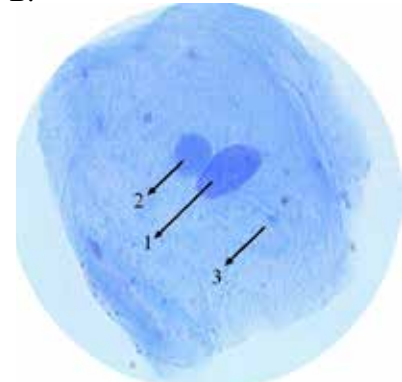
C.



Aumento de 400x – Corante

- 1- Limite celular da célula de cima
- 2- Limite celular da célula de baixo

D.



Aumento de 1000x - Corante

- 1 - Núcleo da célula de cima
- 2 - Núcleo da célula de baixo
- 3 - Citoplasma granuloso

No material não corado, com aumento total de 400x (foto A.), as estruturas celulares não apresentam um bom contraste de cor. Já no material corado, o núcleo é melhor evidenciado em relação ao citoplasma granuloso. Não é possível visualizar a membrana plasmática em decorrência de sua espessura ser ultrafina: então o que se vê é o limite celular.

Observam-se dois núcleos porque duas células estão sobrepostas, pois não foram devidamente espalhadas no momento do esfregão.

Discussão:

1. Quais as estruturas observadas nas células coradas e não coradas?
2. Qual foi a ação do corante supravital utilizado nas células?
3. Foi possível observar a membrana plasmática? O que é o limite celular?
4. Qual a diferença entre o citoplasma das células epiteliais da mucosa bucal e o das células vegetais?
5. Descreva a forma das células da mucosa bucal.
6. Qual a forma do núcleo e que posição ocupa nessas células?
7. Por que há a necessidade de fazer o esfregão para observação adequada dessas células?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

FREITAS, Eduardo. **Constituição da célula eucariótica animal**: Células do epitélio bucal. Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco I. Funchal: Escola Secundária Francisco Franco, 2003. Disponível em: <http://fq.no.sapo.pt/download/Observacao_de_serres_vivos_de_uma_infusao.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2012.

JORDÃO, Berenice Quinzani; ANDRADE, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus; RUAS, Claudete de Fátima; CÓLUS, Ilce Mara de Syllus; BUIM, Marcilei Elisa. **Práticas de Biologia Celular**. Londrina: Ed. UEL, 1998. 163p.

SOARES, Cristina Pacheco; SILVA, Newton Soares da. **Práticas de Biologia Celular**. [S.l.] Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000147.PDF>>. Acesso em: 17 fev. 2012.



Prática 09

Estudo de osmose em célula animal

Introdução:

O sangue é composto basicamente de duas porções: o plasma (líquido corporal extracelular no interior de vasos sanguíneos, contendo água, outras moléculas e íons) e células sanguíneas dos tipos leucócitos, plaquetas/fragmentos de megacariócitos e hemácias (cerca de 4,5 milhões por mL de sangue no homem e 4,0 milhões por mL na mulher). As hemácias de mamíferos (ou eritrócitos, ou glóbulos vermelhos) são células maduras, altamente diferenciadas (anucleadas sem organelas citoplasmáticas, não se dividem e possuem um tempo médio de vida de 120 dias) e apresentam-se ao microscópio óptico como discos bicôncavos (cujas concavidades dão a falsa impressão da presença do núcleo).

Dentre as várias funções da membrana plasmática, destaca-se a delimitação do meio intracelular e a seleção de moléculas que devem ou não penetrar na célula, a chamada permeabilidade seletiva. Portanto, o solvente (água) se difunde na membrana através de um sistema de transporte chamado osmose, tanto pela bicamada lipídica (em menor proporção) como pelas proteínas integrais do tipo canais aquaporinas (em muito maior proporção).

Em solução isotônica, a célula não tem seu volume nem sua forma alterada, pois o líquido extracelular tem uma concentração de soluto semelhante àquela do interior da célula ($\pm 0,9\%$). Em solução hipertônica, o líquido extracelular tem uma concentração maior de soluto que o meio intracelular. A célula perde água e murcha devido à diminuição do volume, a membrana plasmática se desprende da parede celulósica rígida (em células vegetais) e o citoplasma separa-se deste – fenômeno chamado plasmólise. Já em solução hipotônica (meio extracelular menos concentrado em soluto que o intracelular), há ganho de água e aumento do volume celular, ou seja, a célula fica túrgida (em células vegetais ocorre a desplasmólise, aumento de volume). Este processo de osmose ocorre para manter o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular.

Células animais em meio hipotônico podem se romper (lise celular), pois a membrana plasmática não suporta a absorção de solvente em excesso, processo que, no caso das hemácias, é chamado de hemólise (em células vegetais, tal fato geralmente não ocorre, devido à presença de parede celular espessa e rígida).

Objetivos:

- Analisar a morfologia das hemácias em diferentes soluções salinas, obtendo-se uma evidência indireta da presença da membrana plasmática.

Materiais:

- Algodão;
- Álcool iodado;
- Microlanceta descartável;
- 2 Lâminas e 2 lamínulas;
- Soluções de cloreto de sódio 0,4%, 0,6%, 0,9% e 2,0%;

- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Papel de filtro.

Procedimento A:

1. Passar algodão embebido em álcool iodado no dedo indicador;
2. Com o auxílio de microlanceta descartável, furar a ponta do dedo indicador;
3. Colocar uma gota de sangue em uma lâmina com uma gota de NaCl 0,9% e cobrir com lamínula;
4. Observar a morfologia das hemácias e fazer desenho esquemático no aumento de 400x;
5. Com um conta-gotas, colocar uma gota de NaCl 2,0% na borda da lamínula e, com auxílio de papel de filtro, forçar a solução para junto do preparado;
6. Observar o comportamento das hemácias e desenhar no aumento de 400x e 1000x;
7. Em outra lâmina, colocar uma gota de sangue com solução de NaCl 0,6%, observar e desenhar no aumento de 400x;
8. Em seguida, acrescentar solução de NaCl 0,4%, por capilaridade, ao preparado;
9. Observar o que acontece com as hemácias e desenhar nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

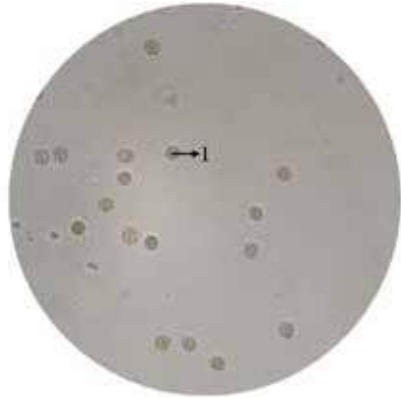
A.



Aumento de 400x – NaCl 0,9%

- 1- Limite celular
- 2- Biconcavidade central

B.



Aumento de 400x – NaCl 2,0%

- 1- Hemácias crenadas
(enrugadas devido a saída de água)

C.



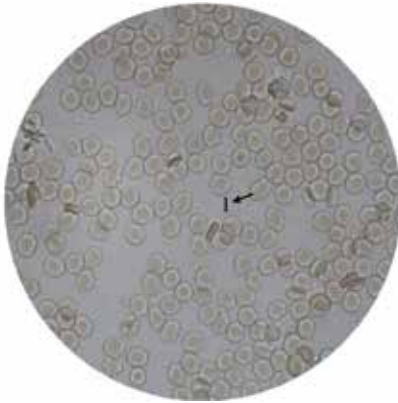
Aumento de 1000x – NaCl 2,0%
(Hemácias enrugadas)

D.



Aumento de 400x – NaCl 0,6%
1- Aumento de volume celular

E.



Aumento de 400x – NaCl 0,4%

1- Hemólise

F.



Aumento de 1000x – NaCl 0,4%

1- Hemólise

No meio isotônico (NaCl 0,9%), as hemácias aparecem em forma de disco e com biconcavidade, sendo que, dentre elas, algumas aparecem de lado, pois estão em movimento. Em meio hipertônico (NaCl 2,0%), ocorre a perda de água, logo, as hemácias ficam murchas. No meio hipotônico (NaCl 0,6%), por outro lado, ocorre o ganho de água. As células ficam túrgidas e chega mesmo a ocorrer o seu rompimento (hemólise), como se pode observar no aumento de 1000x com NaCl 0,4%.

Discussão:

1. Como é a morfologia das hemácias colocadas em meio isotônico (NaCl 0,9% – igual ao do soro sanguíneo)?
2. Quando se mistura o sangue com uma solução de NaCl 2,0%, o que acontece com a membrana das células?
3. Quanto à concentração de 2,0%, que denominação recebe este meio?
4. Quando os meios (NaCl a 0,6% e 0,4%) são menos concentrados que o soro sanguíneo, o que acontece com as hemácias?

5. Quanto à concentração de 0,6% e 0,4%: que denominação recebe esse meio?
6. Por que a célula libera água do citoplasma durante o murchamento e a absorve durante a turgescência?
7. O que é hemólise?

Referências:

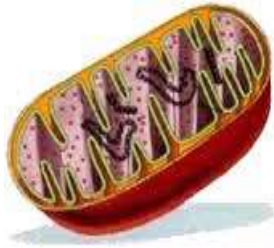
BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

DE ROBERTIS, Eduardo. M. F; HIB, José. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 389 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998. 163 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 332 p.

LODISH, Harvey et al. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1054 p.



Prática 10

Mitocôndrias dos leucócitos

Introdução:

O sangue é formado por células, plaquetas (fragmentos celulares) e uma parte líquida chamada plasma. As células sanguíneas são divididas em: glóbulos vermelhos, ou hemácias, ou eritrócitos; glóbulos brancos ou leucócitos; e plaquetas. Os leucócitos são um pouco maiores que as hemácias e estão presentes no sangue periférico, no qual são divididos em dois grandes grupos: os granulócitos polimorfonucleados, que são representados pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e os agranulócitos mononucleados, que são os linfócitos e monócitos.

O número de leucócitos por milímetro de sangue no adulto normal é de 4.000 a 10.000. A principal função dos leucócitos é proteger o organismo, de maneira imunitária, contra agentes patológicos causadores de doenças, como é o caso da infecção por micro-organismos (ocorrendo produção de **anticorpos**).

As mitocôndrias são organelas que estão presentes no citoplasma de todas as células eucarióticas aeróbicas, local onde se realiza a fosforilação oxidativa, ou seja, a conversão de alimento (substâncias orgânicas) e O_2 nos produtos finais CO_2 , H_2O e liberação de energia para a produção de ATP (adenosina trifosfato). Elas são identificáveis em leucócitos corados, podendo ter formas e tamanhos variados.

Quanto maior a necessidade de energia celular, como é o caso de células musculares, maior é a síntese de ATP e, conseqüentemente, maior é o número de mitocôndrias. Essas organelas são plásticas e se movimentam no citoplasma celular dirigindo-se, frequentemente, aos locais da célula onde há maior demanda de energia.

Objetivo:

- Verificar a presença das mitocôndrias no citoplasma dos leucócitos;
- Conhecer a morfologia dessas organelas citoplasmáticas (semelhantes a células procarióticas, o que explica sua origem por endossimbiose de bactérias aeróbias);
- Conhecer a morfologia dos leucócitos.

Materiais:

- Lâminas e lamínulas;
- Papel filtro;
- Conta-gotas ou pipeta;
- Microlancetas descartáveis e estéreis;
- Palitos de madeira;
- Álcool iodado (para desinfecção dos dedos);
- Corante Verde Janus;
- Cronômetro ou relógio.

Procedimento:

1. Colocar uma gota do corante verde janus sobre a lâmina e esperar cerca de 10 minutos;
2. Passar algodão embebido em álcool iodado no dedo indicador;
3. Com o auxílio de microlanceta descartável, furar a ponta do dedo indicador;
4. Acrescentar uma gota de sangue sobre o resíduo do corante na lâmina, misturando com palito de madeira;

5. Cobrir cuidadosamente com lamínula, evitando a formação de bolhas de ar;
6. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente;
7. Esquematizar o que for observado nos aumentos de 100x, 400x e 1000x.

Resultados:

A.



Aumento de 100x

B.



Aumento de 400x

1- Leucócito

C.



Aumento de 1000x

Leucócito (1, 2 e 3)

- 1- Núcleo
- 2- Citoplasma
- 3- Mitocôndria
- 4- Hemácia

O corante Verde Janus destaca os leucócitos; com isso as hemácias ficam apagadas. As mitocôndrias são visíveis no citoplasma dos leucócitos por apresentarem uma movimentação durante a sua observação e, com este tipo de corante, consegue-se visualizar as mesmas como sendo pequenos pontos com coloração preta esverdeada.

Discussão:

1. Qual a função das mitocôndrias?
2. Fale sobre o total de mitocôndrias nos diferentes tipos celulares.
3. Descreva as mitocôndrias observadas através da microscopia de luz.
4. Qual a função do corante Verde Janus nesse preparado?
5. Descreva a morfologia dos leucócitos.
6. Qual a função dos leucócitos?
7. Normalmente, qual o total de leucócitos por mililitro de sangue? O que pode significar uma quantidade muito alta ou muito baixa de leucócitos?
8. Fale sobre os tipos de leucócitos existentes.

Referências:

CARVALHO, Hernandes F.; RECCO-PIMENTEL, Shirlei Maria. **A célula**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2007. 380 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998. 163 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

NULTSCH, Wilhelm. **Botânica geral**. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 489 p.

SOARES, Cristina Pacheco; SILVA, Newton Soares da. **Práticas de biologia celular**. [S.l.] Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/00000147.PDF>>. Acesso em: 2 jan. 2012.



Prática 11

Estudo de células da escama de peixe

Introdução:

As escamas dos peixes possuem origem dérmica, diferente das encontradas nos tetrápodes, que têm sua formação a partir da epiderme. São estruturas em forma de placa achatada, que se dispõem no tegumento como uma armadura protetora. Estão presentes em peixes, répteis e aves. Em peixes, as escamas podem ser **placóides** (peixes cartilagosos), parecidas com dente de mamíferos, pois apresentam esmalte e dentina; ou **dérmicas** (peixes ósseos), originadas pelas células da derme e recobertas por uma fina camada de células epidérmicas que protegem contra choques e ataques de outros animais. O peixe ideal para ser utilizado nesta prática é o lambari *Astyanax* sp., que possui escama do tipo dérmica e de formato ciclóide.

Na parte superior da derme, próximas à epiderme, estão os melanócitos, células dendríticas, produtoras de melanina, proteína que corresponde a um pigmento de coloração marrom escura, o que possibilita a camuflagem destes animais.

Quando o melanossomo (vesícula produzida pelo sistema de Golgi, onde se inicia a produção de melanina) está cheio de melanina, passa a receber o nome de grânulo de melanina. O hormônio que regula a produção de melanina nos melanócitos é o MSH (hormônio estimulante de melanócito), de natureza protéica e produzido na hipófise, sendo

transportado até os cromatóforos através da circulação. Este hormônio dispersa os grânulos de pigmento, promovendo alteração da cor do tegumento em vertebrados ectotérmicos.

Os melanócitos ou melanóforos são um tipo de cromatóforos (células que contêm pigmentos que refletem a luz). Quando maduros, podem se dividir em diferentes classes segundo a cor que refletem: xantóforos (amarelo), eritróforos (vermelho), iridóforos (iridescente), leucóforos (branco), melanóforos (negro/marrom) e cianóforos (azul).

As células também possuem a armação protéica chamada **citoesqueleto**, responsável por manter sua forma, sua organização do espaço interno bem como sua capacidade de movimentação. É composto por três tipos principais de filamentos: actina (estruturais e contráteis), intermediários e microtúbulos (ambos estruturais). Estes últimos, auxiliados por proteínas acessórias, transportam os grânulos de pigmento ao longo de toda a célula, ajustando a cor do animal.

Objetivos:

- Conhecer a morfologia da escama de peixe;
- Observar cromatóforos, dentre eles os melanócitos ou melanóforos;
- Observar os pigmentos de melanina.

Materiais:

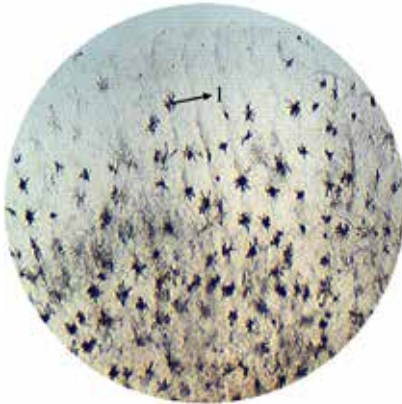
- Aquário;
- Anticloro;
- Puçá;
- Peixe pequeno, de preferência lambari;
- Pinça;
- Solução de Cloreto de Sódio a 0,6%;
- Lâmina e lamínula;
- Papel filtro;
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur;

Procedimento:

1. Utilizar um aquário e, para cada 1L de água, usar uma gota de anticloro;
2. Com auxílio de um puçá, capturar o peixe (se possível, o lambari);
3. Retirar, com uma pinça, uma escama do peixe. Não é necessário matá-lo;
4. Colocar essa escama em uma lâmina de microscopia;
5. Pingar uma gota de NaCl 0,6% sobre a escama;
6. Cobrir com lamínula, evitando a formação de bolhas;
7. Retirar o excesso com auxílio de papel filtro;
8. Analisar nos aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x;
9. Esquematizar nos aumentos de 40x e 1000x para o relatório, identificando as estruturas celulares reconhecidas.

Resultados:

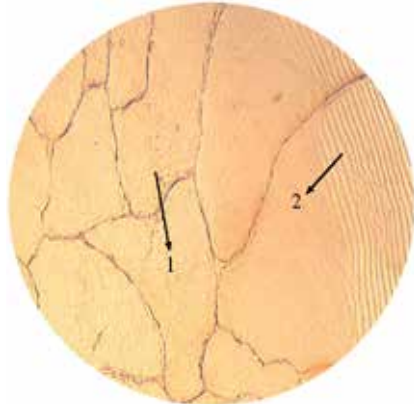
A.



Aumento de 40x

1- Melanócito

B.

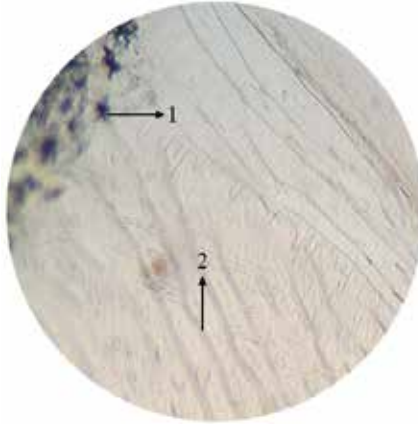


Aumento de 100x

1- Melanócitos

2- Linhas de crescimento

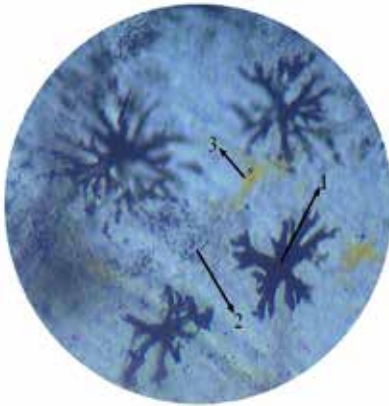
C.



Aumento de 100x

- 3- Melanócitos
- 4- Linhas de crescimento

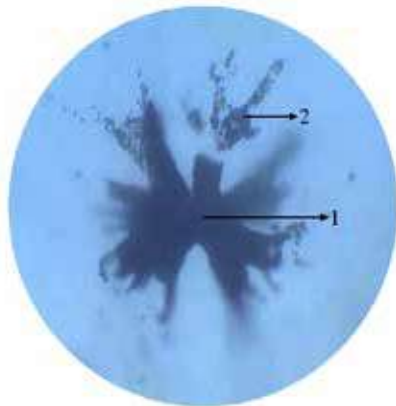
D.



Aumento de 400x

- 1- Melanócito
- 2- Melanina
- 3- Xantóforo

E.



Aumento de 1000x

- 1- Melanócito
- 2- Melanina

Na primeira foto (A) é possível observar os cromatóforos do tipo melanócitos, com aspecto de estrelas pretas. A segunda foto mostra o

centro da escama do peixe e as estrias de crescimento. E, nas duas últimas fotos (D e E), visualizam-se os xantóforos (coloração amarela), os melanóforos ou melanócitos e os pigmentos de melanina (coloração preta).

Discussão:

1. Quais estruturas celulares da escama do peixe puderam ser observadas?
2. O que é cromatóforo?
3. Como os melanócitos são visualizados ao microscópio óptico?
4. Como se dá a coloração nos peixes?
5. Quais as divisões do cromatóforo?
6. O que é citoesqueleto?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

DE SOUZA, Maria Luiza Rodrigues; DOS SANTOS, Heid Sueli Leme. Análise morfológica da pele da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz. **Revista UNIMAR**. Maringá, v. 19, n. 3, p. 881-888, 1997. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevUNIMAR/article/viewPDFInterstitial/4566/3116>>. Acesso em: 5 fev. 2012.

HILDEBRAND, Milton. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1995. 700 p.

MORESCO, Rafaela Maria. **Análise dos melanócitos viscerais em anuros (*Rhinella schneideri*, *Dendropsophus nanus* e *Physalaemus cuvieri*) submetidos a variações de fotoperíodo e temperatura**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brp/33004153072P6/2009/moresco_rm_me_sjrp.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2012.

POUGH, Harvey; JANIS, Christine; HEISER, John. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003. 699 p.

STORER, Tracy; USINGER, Robert; STEBBINS, Robert; NYBAKKEN, James. **Zoologia geral**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. 815 p.

IV. CÉLULAS PROCARIONTES (Reino Bactéria)



Prática 12

Observação dos tipos de bactérias do iogurte

Introdução:

Geralmente quando se fala em bactérias, associamo-las a doenças: contudo, nem todas são nocivas à saúde. Muitas delas são importantes para o equilíbrio da natureza e algumas espécies são de grande utilidade para o homem. Dentre estas, pode-se destacar os lactobacilos (empregados na preparação de coalhada, iogurte, queijo, manteiga, creme, entre outros). As bactérias do iogurte obtêm energia pelo processo de fermentação láctica (o qual não requer O_2) que corresponde ao processo de degradação anaeróbica da glicose em ácido pirúvico, gerando energia para formação de 2ATP e do produto orgânico final. Elas metabolizam a lactose do leite produzindo o ácido láctico. A lactose, ao acumular-se no ácido, se dissocia em lactato e H^+ (prótons), acidifica o meio e desnatura a proteína do leite/caseína, provocando a sua precipitação e a alteração do leite (ação deletéria).

Dois importantes gêneros de bactérias fermentadoras do ácido láctico são *Streptococcus* e *Lactobacillus*, que pode resultar tanto na deterioração de alimento como também na produção do iogurte a partir do leite (cujas proteínas são degradadas durante o processo de maturação, ou seja, durante a preparação dos produtos lácteos).

Assim, a principal função das bactérias lácticas é a acidificação de produtos alimentares em um pH próximo de 4, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis. Isso permite que o período de conservação desses produtos seja muito maior que o de produtos cuja matéria-prima tinha sido fermentada.

Existem muitas formas de bactérias, tais como bacilos (forma de bastão), cocos (forma esférica ou oval), espirilos (forma helicoidal) e vibriões (forma de vírgula). Quando os cocos se dividem, podem permanecer em pares, formando os diplococos; por outro lado, os estreptococos permanecem ligados em cadeia. Outras se dividem em dois, três ou múltiplos planos, produzindo, respectivamente, as formas tétrades (grupo de quatro células); são elas as sarcinas (grupo de oito células, em forma de cubo), os pneumococos (colônia de dois cocos na forma de chama de uma vela), os gonococos (colônia de dois cocos em forma de rim) e os estafilococos (forma de cachos de uvas). Grande parte dos bacilos é encontrada isolada, mas também podem ser observados os diplobacilos e os estreptobacilos. As formas mais encontradas no iogurte são os cocos, diplococos, estreptococos, bacilos e diplobacilos.

Objetivos:

- Conhecer a morfologia de procariotos e sua organização colonial.

Materiais:

- Lâmina e lamínula;
- Iogurte natural;
- Água destilada;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Palitos de fósforo ou de dente;
- Papel filtro;
- Cronômetro ou relógio.

Procedimento A:

1. Colocar uma gota de iogurte natural sobre uma lâmina;
2. Pingar uma gota de água destilada e homogeneizar com o auxílio de um palito;
3. Iniciar a colocação da lamínula na posição de 45° em relação à lâmina e abaixar lentamente, até que a mesma fique totalmente sobre a lâmina, evitando a formação de bolhas de ar;
4. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
5. Proceder às etapas de focalização, utilizando os aumentos totais de 40x, 100x, 400x e 1000x;
6. Esquematizar, para o relatório, nos aumentos de 400x e 1000x.

Procedimento B:

1. Sobre uma lâmina, colocar uma pequena porção de iogurte;
2. Pingar uma gota de água e dissolver bem. Fazer um esfregaço, tomando-se o cuidado de identificar o lado da lâmina no qual se encontra o esfregaço;
3. Secar bem a lâmina, podendo utilizar chapa aquecida;
4. Pingar 3-4 gotas da mistura álcool-clorofórmio;
5. Secar o preparado movimentando a lâmina no ar;
6. Em seguida, pingar 2 gotas de azul de metileno, espalhando-o pela lâmina;
7. Aguardar 5 minutos e lavar com água destilada;
8. Limpar o excesso de água e levar ao microscópio para observação nos aumentos totais de 40x, 100x, 400x e 1000x. Fechar um pouco o diafragma após a localização do material;
9. Esquematizar o material observado, identificando as estruturas celulares reconhecidas nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

A.



Aumento de 400x

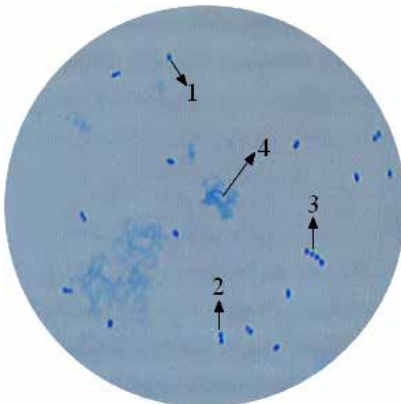
B.



Aumento de 1000x

- 1- Estreptococos
- 2- Diplococos
- 3- Substrato do iogurte

C.



Aumento de 400x

- 1- Cocos
- 2- Diplococos
- 3- Estreptococos
- 4- Substrato do iogurte

D.



Aumento de 1000x

No material não corado, as bactérias ficam se movimentando, pois estão vivas e são de coloração clara. Já no material corado, elas se fixam e, portanto, sua visualização é melhor, pois se destacam.

Discussão:

1. Qual a função das bactérias do iogurte?
2. Quais as formas de bactérias encontradas no iogurte?
3. Quais as diferenças na morfologia das bactérias encontradas?
4. Como diferiu a visualização das bactérias nos dois procedimentos? Justifique a redução da abertura do diafragma.
5. As bactérias observadas, em ambos os procedimentos, estavam vivas ou mortas?
6. Por que se deve aguardar 5 minutos após a utilização do corante para visualizar o material?
7. Por que, ao final, se deve lavar o preparado com água destilada?

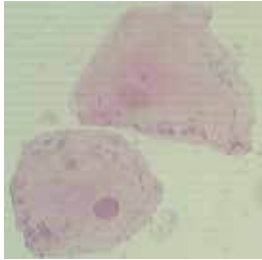
Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998. 163 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Identificação de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1976. 91 p.



Prática 13

Observação de células da mucosa oral pela técnica de Gram

Introdução:

A coloração de Gram (assim designada em memória de Hans Christian Joachim Gram, bacteriologista que desenvolveu este procedimento em 1884) agrupa as bactérias nos tipos Gram positivo ou negativo, sendo um dos métodos mais empregados para classificá-las. Tal classificação baseia-se em diferenças na constituição molecular da parede celular de ambos os tipos bacterianos, pois, devido à propriedade da parede, estas células comportam-se de maneira diferente diante da coloração de Gram.

A parede das células Gram-positivas, as quais se coram em roxo, é simples, sendo constituída por uma espessa camada de peptidoglicanas (cadeias peptídicas ligadas a uma cadeia de hidratos de carbono), o que lhe dá rigidez e resistência. Ex.: Bactérias lácteas: *Lactobacillus* (fermentação do ácido láctico a partir do leite), *Streptococcus* (bactérias fermentadoras do ácido láctico); *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, etc.

Já a parede das células Gram-negativas é bastante complexa, formada pelas seguintes camadas, de dentro para fora: (1ª) peptidoglicanas, mais delgada do que nas bactérias Gram-positivas; (2ª) uma camada de lipoproteínas; (3ª) membrana externa de estrutura trilaminar, como as

demais membranas celulares, porém de estrutura peculiar, pois os fosfolípidios de seu folheto externo são substituídos por lipopolissacarídeos/LPS. Estes últimos chegam a constituir uma (4ª) camada (com função protetora), formando forte barreira impermeável em volta da célula. Como exemplo, podemos citar as bactérias entéricas que resistem às enzimas hidrolíticas e aos sais biliares do tubo digestivo. Essa membrana externa contém moléculas proteicas denominadas porinas, que são canais por onde penetram diversas substâncias, aminoácidos e açúcares. Tais células gram-negativas retêm a cor roxa e, para facilitar sua visualização, são coradas em vermelho com safranina ou fucsina (que não altera a cor roxa fixada pelas das Gram-positivas, presentes no mesmo material a ser observado). Ex: *Salmonella typhi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, etc.

A constituição da parede celular bacteriana se dá por meio de um complexo de proteínas e polissacarídeos, o qual resulta numa camada espessa, resistente e rígida, que envolve a membrana plasmática. Esta membrana, presente em todas as bactérias (exceto nas micoplasmas), é responsável pela forma celular e pela proteção mecânica contra a ruptura e a penetração de vírus. Por outro lado, por ser permeável, facilita a endocitose (entrada de substâncias, em um processo de nutrição da célula), mas também a exocitose (processo que compreende a saída de moléculas produzidas/secreção e daquelas excretadas/clasmocitose). A parede contém diversos determinantes (proteínas antígenos, que são utilizadas para identificação das bactérias).

Esta coloração é um importante teste realizado em laboratórios, sendo um recurso auxiliar no diagnóstico de doenças bacterianas. A coloração de Gram envolve uma série de procedimentos antes que se chegue à etapa final de leitura da lâmina preparada.

Nessa técnica, são atualmente utilizadas as seguintes substâncias químicas: o cristal violeta (violeta de metila) e o lugol, que coram em roxo as células Gram-positivas; o álcool etílico 99,5°, responsável por retirar o excesso dos corantes que não se ligaram às paredes celulares; e, por fim, a safranina, cuja função é a de corar em vermelho as células Gram-ne-

gativas (sem alterar a coloração roxa fixada por células Gram-positivas, coradas anteriormente).

Objetivos:

- Observar como as células eucariontes e procariontes se comportam em relação à coloração de Gram;
- Conhecer a morfologia dos procariotos.

Materiais:

- Espátula de madeira;
- Lâmina e lamínula;
- Cristal violeta;
- Lugol;
- Safranina;
- Álcool;
- Cronômetro ou relógio;
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur;
- Papel filtro.

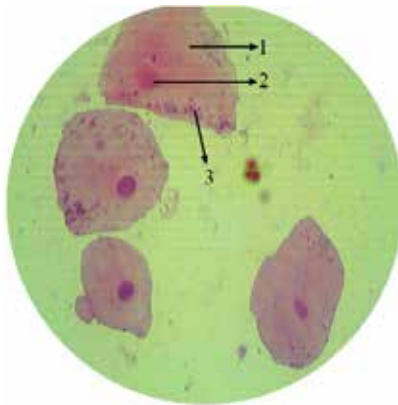
Procedimento:

1. Logo depois de realizado o bochecho, retirar células da mucosa bucal raspando-a com uma espátula de madeira;
2. Apoiar o palito contendo o material colhido sobre uma lâmina de microscopia;
3. Deslizar o palito sobre a lâmina, de maneira que o material colhido seja deixado na porção central da mesma, preparando-se assim um esfregaço;
4. Deixar secar (balançar a lâmina no ar para secar mais rápido);
5. Proceder à coloração, adotando os seguintes passos:

- a. Corar com cristal violeta → 2 gotas por 1 minuto; em seguida lavar com água;
 - b. Corar com lugol → 2 gotas por 1 minuto; em seguida lavar com água;
 - c. Acrescentar álcool → 2 gotas por 30 segundos; em seguida lavar com água;
 - d. Corar com safranina → 2 gotas por 1 minuto; em seguida lavar com água.
6. Colocar a lâmina e levá-la ao microscópio para observação;
 7. Esquematizar os desenhos nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

A.



Aumento de 400x

- 1- Célula da mucosa bucal
- 2- Núcleo
- 3- Bactérias

B.



Aumento de 1000x

- 1- Bactéria Gram-positiva
- 2- Bactéria Gram-negativa

Ao microscópio, as bactérias Gram-positivas aparecem coradas em violeta escuro e as Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro.

Discussão:

1. Pela classificação de Gram, quais tipos de células foram observados?
2. Qual a diferença observada entre as células Gram-positivas e Gram-negativas após a aplicação da bateria de corantes?
3. A que se deve a diferença observada entre os dois tipos de bactérias coradas pelo método de Gram?
4. Qual a função de cada corante e do álcool na técnica de coloração de Gram?
5. Qual a importância prática de classificar as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas?
6. Como é feito e qual é o objetivo do esfregaço?
7. Justifique por que ocorre a diferenciação de coloração entre as duas células: bacteriana positiva e eucarionte da mucosa bucal.
8. Ao se observar uma célula eucarionte animal, por que as bactérias gram-negativas (após coloração de Gram) não se mostram tão evidenciadas/distintas quanto as bactérias gram-positivas?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**. Brasília, DF, 1997. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2012.

EYMAEL, Dayane; SCHUH Graziela, Maria; TAVARES, Rejane Giacomelli. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 3, p.:09-312, mai./jun. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n3/19.pdf>>. Acesso em: 3 mar. 2012.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998, 163 p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999. 586 p.

V. CÉLULAS EUCARIONTES (Reinos Fungi e Protista)



Prática 14

Células de levedura em fermento biológico

Introdução:

Os fungos são seres vivos eucariontes, unicelulares (como as leveduras) ou pluricelulares (filamentosos ou bolores, cujos filamentos são denominados hifas e, em conjunto, recebem o nome de micélio). Também são denominados talófitos, por possuírem talos (corpo vegetativo de fungos, destituído de caule, raiz ou folhas legítimas) e por serem desprovidos de clorofila ou qualquer outro pigmento fotossintético. São, ainda, heterótrofos; não contêm tecido verdadeiro e possuem coloração variada (esbranquiçados, avermelhados, pretos, etc.).

São divididos em quatro grupos: *Ascomycota*, *Basidiomycotas*, *Zigomicota* e os fungos de reprodução incerta, denominados *Deuteromycetos*. Quanto ao modo de vida, podem ser: parasitas, quando causam danos ao hospedeiro animal (doenças denominadas de micoses) ou vegetal (doenças como ferrugem, verrugose, etc.); saprófitas, quando utilizam matéria orgânica em decomposição para retirar substâncias nutritivas, como, por exemplo, “cogumelos de chapéu” ou “orelhas de pau”; e simbioses, quando se associam à cianobactérias para formar os líquens.

Muitas espécies de fungos têm sido testadas e utilizadas para a produção de substâncias de interesse industrial ou médico: o etanol, o ácido cítrico, o ácido glucônico, os aminoácidos, as vitaminas, os nucleotídeos e os polissacarídeos são exemplos de metabólitos primários produzidos por fungos; os antibióticos, por sua vez, constituem importantes metabólitos secundários.

Além da sua vasta aplicação em indústrias de fermentação, novos aspectos biotecnológicos têm sido explorados, inclusive os de caráter ambiental, ou seja, os fungos podem atuar como agentes benéficos para a melhoria do meio ambiente. Por exemplo: no tratamento de resíduos líquidos e na biorremediação de solos poluídos, na produção de biomassa (incluindo proteína comestível) ou o seu emprego no controle biológico.

As leveduras, fungos com uma forma oval, sofrem influência na presença de oxigênio (O_2), já que este gás determinará o modo como elas obtêm energia. Assim, ao se encontrarem na presença de O_2 , realizam respiração aeróbia; de outro modo, realizarão fermentação alcoólica, de modo que têm uma grande importância na indústria, nomeadamente na produção de pão e bebidas alcoólicas, como a cerveja.

Estes seres unicelulares reproduzem-se assexuadamente, através de um processo chamado de gemulação ou brotamento (quando a nova célula origina-se de uma protuberância, ou gema, a partir da célula-mãe), de forma bastante rápida quando em condições favoráveis (na presença de glicose).

Objetivos:

- Observar culturas de fungo unicelulares no microscópio óptico;
- Observar a divisão celular mitótica em fungos.

Materiais:

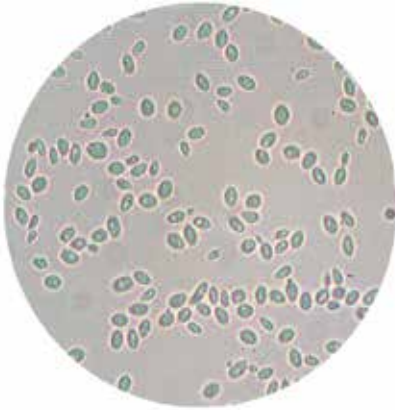
- Fermento biológico;
- Água morna;
- Açúcar;
- Lâmina e lamínula;
- Lamparina;
- Violeta genciana;
- Cronômetro ou relógio;
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur;
- Papel filtro.

Procedimento:

1. Dissolver uma porção ($\pm 5\text{g}$) de fermento biológico em água morna ($\pm 50\text{mL}$);
2. Adicionar açúcar, deixando descansar de 15 a 20 minutos;
3. Pingar uma gota da suspensão sobre uma lâmina, cobrir com a lamínula e observar ao microscópio;
4. Esquematizar as observações nos aumentos de 400x e 1000x;
5. Em seguida, retirar a lamínula e fixar o material, passando a lâmina sobre uma chama;
6. Corar com violeta genciana durante 5 minutos;
7. Lavar rapidamente em água corrente, cobrir com lamínula nova e observar ao microscópio;
8. Esquematizar as observações nos aumentos de 400x e 1000x.

Resultados:

A.



Aumento de 400x – Sem corante

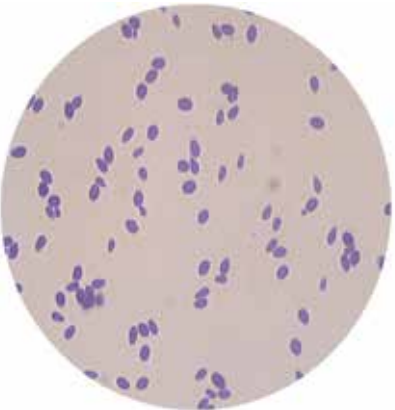
B.



Aumento de 1000x – Sem corante

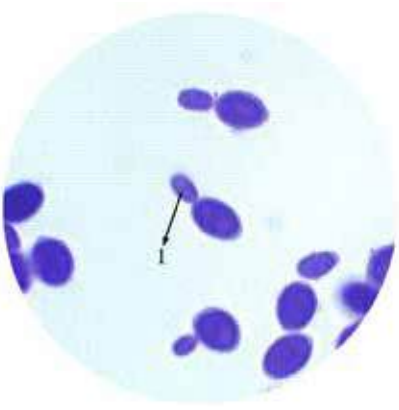
- 1- Levedura
- 2- Brotamento

C.



Aumento de 400x – Com corante

D.



Aumento de 1000x – Com corante

- 1- Brotamento

No material não corado (fotos A e B), as leveduras estão vivas, portanto estão realizando o processo de divisão celular. Por outro lado,

quando ocorre a fixação para a observação do material corado, as células morrem, fazendo com que as que então estavam se dividindo fiquem paradas; com isso, visualizam-se melhor essas células e sua divisão por brotamento (fotos C e D).

Discussão:

1. Qual a espécie do organismo observado nesta prática?
2. Quais as principais diferenças entre uma célula eucariótica e procariótica?
3. Quais as diferenças na visualização da suspensão antes e após a fixação?
4. Você observou a reprodução das leveduras? Qual é o tipo de reprodução e como ocorre?
5. Como você define os fungos?
6. Quanto ao modo de vida, como os fungos se classificam?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

DE CARVALHO, Giovani Brandão Mafra; BENTO, Camila Vieira; SILVA, João Batista de Almeida. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – as leveduras. **Revista Analytica**, Lorena, n. 25, 2006. Disponível em: <http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_anteriores/25/art03.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2012.

GUIMARÃES, Thais Martins. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <http://www.farmacêuticas.ufpr.br/pdf/teses_resumos/Thais%20Martins%20Guimaraes_dis.pd>. Acesso em: 1 abr. 2012.

JAY, James. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998. 163 p.



Prática 15

Identificação de vários tipos de protistas

Introdução:

Os protozoários são organismos eucarióticos unicelulares que vivem em diversos ambientes como a água doce, a salgada e a terra. Podem ser de vida livre, parasitas e mutualistas, ou comensalistas em plantas e animais. A maioria é de vida livre, embora seja considerável o número de espécies parasitas.

Apresentam forma variada (oval, alongadas, esférica, etc.) consistindo, como qualquer outra célula, de, pelo menos, um núcleo. Com algumas exceções, os protozoários podem locomover-se ativamente por meio de flagelos, cílios ou emissão de pseudópodos. A reprodução pode ser sexuada (conjugação), assexuada (fissão binária) ou ocorrer de ambos os processos. Alguns exemplos de protistas são: *Amoeba*, *Euglena*, *Paramecium*, *Trypanosoma*, e a maioria das algas.

Em comunidades naturais, os protozoários desempenham importante função como parte das cadeias alimentares, alimentando-se e servindo de alimento para outros organismos diminutos. O modo de nutrição desses organismos é muito variado, pois eles podem alimentar-se de bactérias, algas e, ainda, de outros protozoários. Também se nutrem de substâncias orgânicas em decomposição ou através de fotossíntese.

Algumas espécies são úteis na purificação de filtros de água e de esgotos em estações de tratamento, enquanto outras são causadoras de doenças como a disenteria amebiana, a malária e a doença africana do sono, no homem.

O protozooplâncton constitui-se de protozoários de vida livre, podendo representar a maior parte do zooplâncton (até 60%). Possuem considerável diversidade morfológica e fisiológica, com notável espectro de adaptações para diferentes condições ambientais, ocupando uma grande variedade de nichos ecológicos.

Objetivos:

- Preparação e observação de culturas de protozoários;
- Observar uma gota com a cultura de protozoários, identificando a variabilidade entre os organismos (ciliados e flagelados).

Materiais:

- 3 frascos sem tampa;
- Alface picada;
- Grama picada;
- Água de lago;
- Grãos de arroz crus;
- Água filtrada;
- Papel filtro ou algodão;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Espátula de madeira.
- Conta-gotas ou pipeta de pasteur.

Preparo da cultura de protistas:

Onde coletar o material: Pode-se obter protozoários coletando água de lagos, tanques, riachos, água do mar, superfícies de vegetais aquáticos, etc.

Cuidados na preparação das culturas:

- A) Os frascos usados para cultura devem estar bem limpos. Lave-os com água e enxágue diversas vezes com água da torneira. A última enxaguada deve ser feita com água destilada;
- B) Não trabalhar com ácidos e bases fortes próximo às culturas. Os vapores dessas substâncias poderão matar os animais;
- C) Guardar as culturas a meia-luz. A luz muito intensa é prejudicial para tais organismos.
- D) Conservar as culturas em temperatura mais ou menos constante. A temperatura ideal é entre 18°C a 21° C; acima de 25°C e abaixo de 15°, os protozoários geralmente morrem.

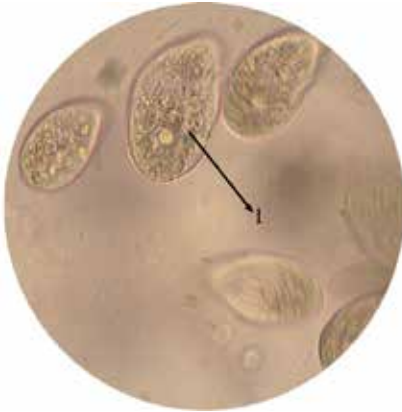
Procedimento:

1. Preparar as culturas A, B e C com antecedência de 6 a 7 dias;
2. Colocar alface picada em um frasco (A), grama picada em outro (B) e água de lago em um terceiro (C);
3. Acrescentar alguns grãos de arroz crus e 100 mL de água filtrada nos três frascos;
4. Deixar os frascos em local arejado e iluminado, sem exposição direta ao sol;
5. Após alguns dias, cobrir os frascos com papel filtro ou algodão;
6. Colocar uma gota da cultura A (colher a película que se forma na superfície ou o sedimento do fundo) em uma lâmina, cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio nos aumentos de 400x e 1000x;
7. Esquematizar as observações, identificando as estruturas celulares visualizadas;

8. Repetir as operações 6 e 7 com as culturas B e C.

Resultados:

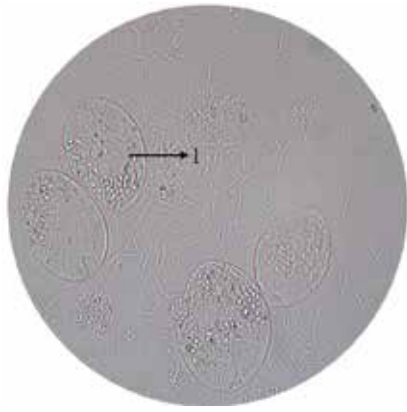
A.



Aumento de 1000x – Procedimento A

1- Colpidium

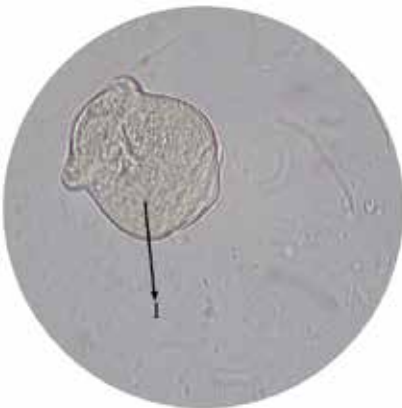
B.



Aumento de 1000x – Procedimento B

1- Colpidium

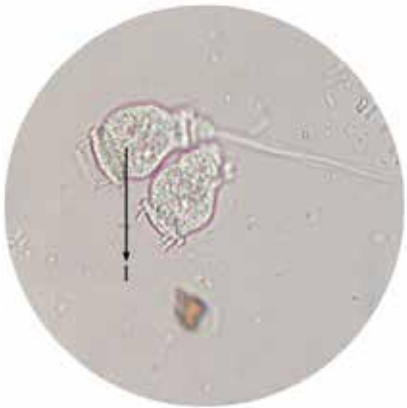
C.



Aumento de 1000x – Procedimento C

1- Didinium

D.



Aumento de 1000x – Procedimento C

1- Vorticella

No procedimento A (alface) e B (grama), aparecem muitos espécimes de *Colpidium*; por outro lado, no procedimento C (arroz), além do *Colpidium* aparece *Didinium* e *Vorticela*.

Discussão:

1. Após a adição de corante, que estruturas são evidenciadas nos protozoários?
2. Os protozoários possuem órgãos? Como desenvolvem suas atividades (locomoção, alimentação, digestão, etc.)?
3. Qual a diferença entre protozoários flagelados e ciliados?
4. Como é a reprodução dos protozoários?
5. Quais as características dos organismos pertencentes ao reino Protista?

Referências:

AREAS, Michele de Oliveira; TENENBAUM, Denise Rivera; GOMES, Eli Ana Traversim. Microvariações temporais do protozooplâncton na baía de Guanabara (RJ): composição específica e densidade durante o verão de 2004. **Saúde e Ambiente em Revista**. Duque de Caxias, v.1, n.1, p.14-22, jan./jun. 2006. Disponível em: <<http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/sare/article/viewFile/332/323>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

PINTO, Cesar. Protozoários observados no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 18, n.1, 1925. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/mioc/v18n1/tomo18\(f1\)_211-302.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v18n1/tomo18(f1)_211-302.pdf)>. Acesso em: 5 mar.

RUPPERT, Edward; FOX, Richard; BARNES, Robert. **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145 p.

STORER, Tracy et al. **Zoologia geral**. 6. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. 815 p.

VI. MATERIAL GENÉTICO



Prática 16

Extração de DNA de tomate
(*Solanum lycopersicum*) e cebola
(*Allium cepa*)

Introdução:

DNA significa ácido desoxirribonucléico e é a molécula que contém as informações genéticas em todos os organismos celulares e em grande parte dos vírus. Este material genético transporta a informação necessária para sua replicação, como também para dirigir a síntese de proteínas através da transcrição. A molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice (diâmetro uniforme de 2nm), que realizam uma volta ao redor de um eixo imaginário a cada 3.4nm.

Trata-se de um polímero longo constituído por simples unidades (monômeros) de nucleotídeos formados por: grupo fosfato, monossacárideo pentose e uma base nitrogenada. A ligação covalente ou forte entre nucleotídeos adjacentes é do tipo 3', 5' fosfodiéster (fosfato unido aos C3 e C5 destes). Já a dupla hélice do DNA é mantida por pontes de hidrogênio entre as bases complementares (através da interação hidrófoba, que, apesar de não ser propriamente uma ligação química, é considerada como não covalente ou fraca).

Dentre as bases nitrogenadas, as púricas são formadas por dois anéis: Adenina (A) e Guanina (G), e as bases pirimidínicas são moléculas formadas por um único anel: Timina (T) e Citosina (C). Os dois tipos de

pares de base formam diferentes números de pontes de hidrogênio, onde o par AT forma duas e o par GC, três pontes. Todas elas são empilhadas e distantes uma das outras (0.34nm).

Nesta aula prática, será possível observar as fitas separadas do DNA (a **trituração** mecânica de células vegetais serve para que haja a ruptura de suas paredes); a **solução de lise**, que desestrutura a bicamada lipídica das membranas celulares, expondo o DNA que se dispersa nesta solução; o **banho-maria**, que favorece a reação e desnatura as moléculas de DNA; o **gelo**, que desfavorece ainda a interação entre as fitas da molécula de DNA, mantendo-as abertas no meio; a **filtração**, que separa partículas sólidas e líquidas, e o **etanol**, que separa o DNA dos demais componentes.

A técnica de extração de DNA permite a realização da amplificação do DNA (PCR- reação em cadeia de polimerase), que é utilizada, por exemplo, para a construção de uma biblioteca genômica, para a produção de organismos geneticamente modificados (transgênicos), entre outros.

Objetivos:

- Executar protocolo de extração de DNA de dois vegetais;
- Observar moléculas de DNA.

Materiais:

- 1 tomate;
- 1 cebola;
- Cloreto de sódio ou sal;
- Água destilada;
- Etanol 96% (álcool etílico comercial; como alternativa pode ser utilizado também álcool de cereais 99%, encontrado em lojas de produtos para perfumaria e farmácias de manipulação);
- Detergente comercial;
- Gelo;

- Papel de filtro;
- Bandeja plástica (para fazer banho de gelo);
- Faca e Funil;
- Béquer de 500 mL;
- Proveta de 100 mL;
- Tubos de ensaio;
- Mixer ou liquidificador;
- Banho-maria;
- Cronômetro ou relógio;
- Bastão de vidro ou pinça.

Procedimento:

1. Picar 1 tomate com uma faca; triturá-lo em seguida utilizando um *mixer* ou liquidificador e depositar o extrato formado em um béquer de 500 mL;
2. Em um béquer de 100 mL, preparar a solução de lise: 6 mL de detergente concentrado, 4 g de cloreto de sódio, completando o volume com água até 60 mL;
3. Adicionar a solução de lise (60 mL) ao béquer de 500 mL contendo o tomate triturado;
4. Homogeneizar a solução de lise com a polpa de tomate e colocar o béquer em banho-maria por 10 minutos a 55 °C;
5. Preparar um banho de gelo em uma bandeja;
6. Após os 10 min. de banho-maria, transferir o béquer para o banho de gelo por um período de 5 minutos;
7. Filtrar 4 mL da solução para um tubo de ensaio;
8. Adicionar, delicadamente, 4 mL de etanol gelado ao tubo de ensaio. Durante a adição do etanol, observar atentamente o que ocorre no tubo;
9. Coletar com pinça ou bastão de vidro um pouco do DNA visível para observar nos aumentos de 40x, 100x, 400x, e 1000x;
10. Esquematizar somente nos aumentos de 400x e 1000x;

11. Realizar o mesmo procedimento, porém, ao invés do tomate, utilizar cebola.

Resultados:

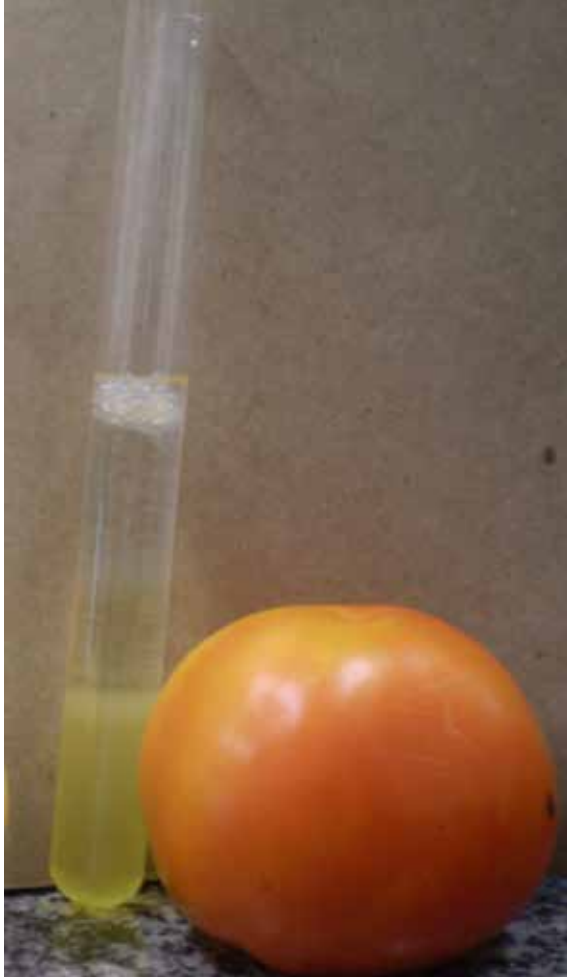


Foto 01: “Nuvem” de DNA extraído do tomate.

Durante a extração do DNA ocorre a separação da sua fita dupla, portanto, o que se observa são as fitas simples com aparência de fios de algodão. Nos dois protocolos obtêm-se boa extração de DNA e observação dos seus fragmentos.

Discussão:

1. Foi possível visualizar o DNA insolúvel no etanol? Como é a aparência das moléculas de DNA visualizadas na solução?
2. Qual o aspecto da molécula de DNA quando observada ao microscópio óptico?
3. Qual a função da solução de lise preparada?
4. Qual a função do etanol gelado utilizado no processo?
5. Para quê você poderia utilizar o DNA extraído neste experimento?
6. Como é a estrutura molecular do DNA?

Referências:

BRANCALHÃO, Rose Meire Costa; SOARES, Maria Amélia Menck. **Microtécnica em biologia celular**. Cascavel: Edunioeste, 2004. 125 p.

FARAH, Solange Bento. **DNA: segredos e mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 538 p.

JORDÃO, Berenice Quinzani et al. **Práticas de biologia celular**. Londrina: UEL, 1998. 163 p.

SCHEID, Neusa Maria John; FERRARI, Nadir; DELIZOICOV, Demétrio. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciência e Educação**, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ciedu/v11n2/05.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2012.

WATSON, James. **Dupla hélice**. 1. ed. Lisboa: Gradiva, 1987. 280 p.



Prática 17

Observação de sêmen de carneiro

Introdução:

O ejaculado do ovino é caracterizado por um volume em torno de um a dois mililitros, sendo que total de espermatozoides ejaculados varia de dois a seis bilhões. Não raramente, constata-se, no carneiro saudável, alta motilidade, o que corresponde a 80%, ou mais, de células com movimento. Para aplicações biotecnológicas, o sêmen ovino é facilmente obtido por meio de vagina artificial, não requerendo condicionamento prévio dos reprodutores.

Os espermatozoides são células pequenas e especializadas na fertilização do óvulo, processo essencial para a transmissão da hereditariedade e para o desenvolvimento do organismo. São adaptados para exercer funções tais como a sobrevivência em um órgão com pouca oxigenação, ou ainda alcançar, selecionar e fecundar o gameta feminino.

Compõem-se pelas seguintes estruturas: cabeça formada por um núcleo achatado com forma oval, apresentando cromatina bem compactada; o acrossoma, que consiste em uma dupla camada de membrana que reveste a extremidade anterior do núcleo; a cauda, estrutura composta pelo colo, peça intermediária, principal e terminal.

Na região central da peça intermediária da cauda do espermatozoide, encontra-se o axonema (conjunto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central), rodeado por mitocôndrias. É possível que um aumento no seu comprimento possa estar associado com uma maior atividade metabólica, influenciando na motilidade da célula, pois as mitocôndrias são as transformadoras de energia para a célula. Essa região termina no chamado *annulus* ou *anel de Jensen*, estrutura densa e firmemente presa à membrana plasmática do flagelo.

A peça principal compreende desde a área a partir do *annulus* até quase o final da cauda (peça terminal) e possui duas colunas longitudinais (dorsal e ventral) interligadas por fibras semicirculares. Por fim, a peça terminal é composta pelo axonema, recoberto pela membrana plasmática.

Objetivos:

- Observar a morfologia da célula germinativa masculina;
- Conhecer os flagelos dos espermatozoides;
- Diferenciar material não corado e corado.

Materiais:

- Microscópio de luz;
- Sêmen de carneiro;
- Luvas;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Solução de cloreto de sódio a 0,9%;
- Lâminas e lamínulas;
- Corante Rosa de Bengala.
- Citrato de sódio a 2,9%.

Procedimento A:

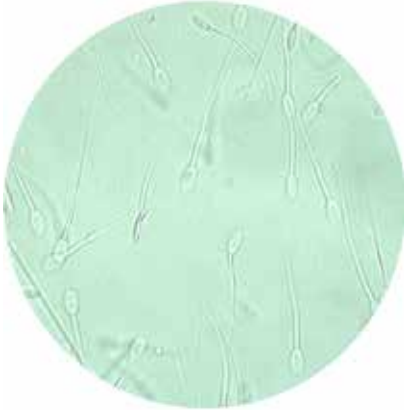
1. Recolher o sêmen animal e, no momento da prática, misturá-lo com uma solução de citrato de sódio a 2,9%, na proporção de 1:1 (essa solução pode ser congelada para posteriores observações);
2. Misturar a solução de sêmen e citrato com NaCl 0,9%, na proporção de 1:1 (usar luvas);
3. Pingar uma gota dessa solução contendo espermatozoides sobre uma lâmina;
4. Iniciar a colocação da lamínula em posição de 45° em relação à lâmina e ir abaixando lentamente, até posicioná-la totalmente sobre a lâmina, evitando a formação de bolhas de ar;
5. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
6. Analisar, utilizando os aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x;
7. Esquematizar nos aumentos de 400x e 1000x.

Procedimento B:

1. Pingar uma gota da solução (sêmen + citrato) sobre a lâmina e fazer um esfregaço (usar luvas);
2. Esperar secar;
3. Pingar sobre o material o corante Rosa de Bengala;
4. Esperar cerca de cinco minutos e lavar, tirando assim o excesso do corante;
5. Iniciar a colocação da lamínula em posição de 45° em relação à lâmina e ir abaixando lentamente, até posicioná-la totalmente sobre a lâmina, evitando a formação de bolhas de ar;
6. Caso haja excesso de líquido, retirar com papel absorvente para manter a lamínula fixa;
7. Analisar, utilizando os aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x;
8. Esquematizar nos aumentos de 400x e 1000x.

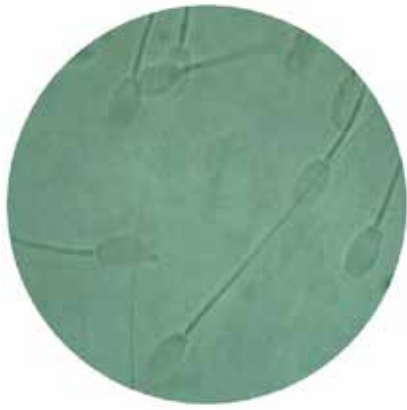
Resultados:

A.



Aumento de 400x - Sem corante

B.



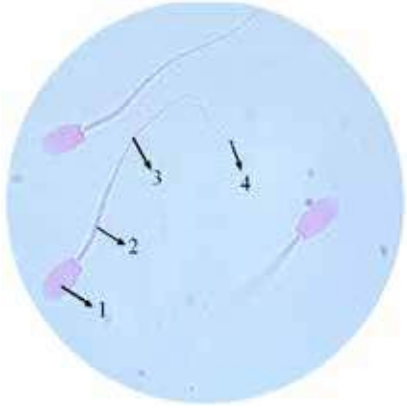
Aumento de 1000x – Sem corante

C.



Aumento de 400x – Com corante

D.



Aumento de 1000x – Com corante

- 1- Cabeça
- 2- Peça intermediária
- 3- Peça principal
- 4- Peça terminal

No material não corado, ocorre dificuldade na observação dos espermatozoides, pois estão transparentes e em constante movimento. Por outro lado, no preparo com a utilização do corante Rosa de Bengala, eles estão fixados e, portanto, consegue-se observar bem o núcleo achatado de forma oval (cabeça), a peça principal, a peça intermediária, onde ficam as mitocôndrias que não são visíveis com essa técnica, e a peça terminal.

Discussão:

1. O que é sêmen?
2. Quais as estruturas do espermatozoide? Quais destas estruturas foi possível observar nessa prática?
4. Houve diferença entre o material corado e o não corado? Quais?
5. Qual a função das mitocôndrias na peça intermediária do espermatozoide?
6. Qual a função do citrato de sódio na solução preparada?

Referências:

GOÉS, Paola Almeida de Araújo. **Dosagem dos níveis anti-oxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmem de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio.** 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARTINS, Carlos Frederico. **Liofilização de espermatozóides bovinos: viabilidade estrutural e funcional.** 2006. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em: <<http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/ReproducaoAnimal/martins.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2012.

NAME, Khesller Patrícia Olázia. **Análise morfológica das espermátides dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008. Disponível em: <http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/1303/1/DISSERTACAO_2008_KhesllerPatriciaOlaziaName.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2012.

VII. DIVISÃO CELULAR



Prática 18

Observação das fases da mitose em raiz de cebola (*Allium cepa*)

Introdução:

Mitose é um processo de divisão celular através do qual uma célula eucariótica mãe origina duas células-filhas idênticas a ela, que contêm todas as informações genéticas necessárias à sua vida. Ao longo da mitose, células observadas ao microscópio exibem aparências características, sendo possível reconhecer estágios marcantes, os quais foram escolhidos pelos cientistas para dividir o processo mitótico em fases:

Prófase - início da condensação dos cromossomos. A carioteca (envoltório nuclear) desintegra-se e, no momento que os cromossomos, já bastante condensados, espalham-se na região central do citoplasma, os centros celulares vão se afastando, dando origem a um complexo conjunto de fibras denominado fuso acromático.

Metáfase - cada cromossomo liga-se a fibras do fuso provenientes de pólos opostos (fibras cromossômicas) pela região do centrômero. A tensão nas fibras de pólos opostos faz com que os cromossomos permaneçam temporariamente estacionados na região equatorial da célula, formando a placa metafásica em grau máximo de condensação.

Anáfase - os centrômeros se dividem e as cromátides irmãs se separam; há o encurtamento gradual das fibras cromossômicas que

arrastam as cromátides-irmãs em sentidos opostos até os polos do fuso acromático.

Telófase - os cromossomos, já nos polos opostos da célula, descondensam-se e voltam a produzir nucléolos. Cada conjunto cromossômico é envolvido por uma nova carioteca; surgem, assim, dois núcleos filhos com conjuntos idênticos de cromossomos. Após a formação dos núcleos filhos (cariocinese), ocorre a divisão do citoplasma, denominada citocinese.

A cebola é um modelo experimental muito utilizado para análise de mitose, pois apresenta um crescimento rápido e fácil.

Objetivos:

- Observar as fases da mitose;
- Identificar e caracterizar os diferentes estágios da mitose.

Materiais:

- Raízes de cebola;
- Tubos de ensaio;
- Fixador Carnoy 3:1;
- Álcool 70%;
- Lâmina e lamínula;
- Gilete;
- Orceína acética;
- HCl 1N;
- Bastão de vidro;
- Lamparina;
- Esmalte incolor;
- Algodão;
- Pinça de ponta fina ou estilete;
- Conta-gotas ou pipeta de Pasteur;
- Papel filtro.

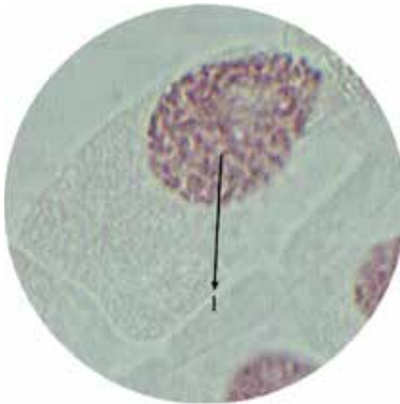
Procedimento:

1. Colocar um bulbo de cebola em um recipiente com água de torneira, de maneira que o bulbo fique suspenso na borda do recipiente e apenas sua base entre em contato com a água;
2. Antes disso, retirar com uma gilete as raízes secas, cortando inclusive parte do eixo da cebola, e esperar até que as raízes da mesma fiquem com um ou dois centímetros de comprimento;
3. Quando as raízes estiverem com um ou dois centímetros de comprimento, retirá-las com uma pinça e colocá-las em um frasco de vidro com fixador de Carnoy 3:1 (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético glacial) de 12 a 20 horas;
4. Após esse tempo, retirar do fixador e colocá-las em álcool 70% na geladeira;
5. Colocar as raízes em um tubo de ensaio, contendo o corante em uma proporção de 9 gotas de corante orceína acética para uma gota de HCl 1N, de maneira que cubra as raízes;
6. Aquecer tubo de ensaio com a lamparina até que se inicie a liberação de vapores, atentando-se para que não levante fervura;
7. Tampar o tubo de ensaio com algodão, deixando-o na estante; aguardar por 20 minutos;
8. Retirar a raiz do tubo de ensaio e colocá-la em uma lâmina de microscopia;
9. Separar a região meristemática (cerca de 2 mm a partir da coifa), cortando-a com gilete. Desprezar os primeiros 0,7 mm correspondentes à coifa e ao restante da raiz;
10. Pingar sobre o fragmento 2 gotas do corante que estava no tubo e, em seguida, cobrir com uma lamínula;
11. Cobrir a lamínula com papel filtro e pressionar com o polegar para esmagar o material, cuidando para que a lamínula não se desloque;
12. Vedar a lamínula com esmalte incolor (optativo);

13. Levar ao microscópio e, no aumento de 40x, procurar o material corado;
14. Logo após, passar para o aumento de 100x e procurar as fases;
15. Desenhar cada fase nos aumentos de 400x ou 1000x.

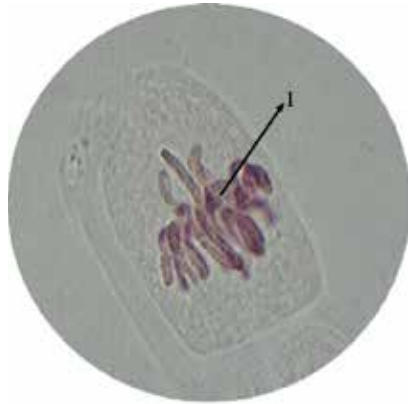
Resultados:

A.



Aumento de 1000x
1- Prófase

B.



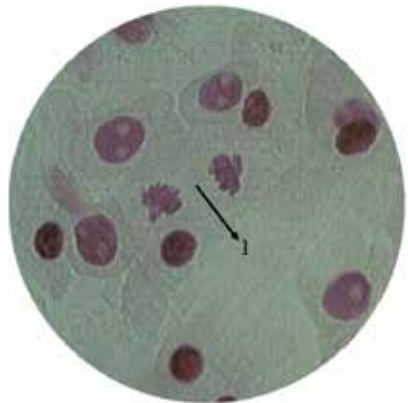
Aumento de 1000x
1- Metáfase

C.



Aumento de 1000x
1- Anáfase

D.



Aumento de 400x
1- Telófase

Pode-se observar que esta prática é muito eficiente, pois é fácil visualizar com clareza todas as fases da mitose.

Discussão:

1. Em que fase da mitose ocorre a separação das cromátides irmãs?
2. Na espécie humana quantos cromossomos recebem cada célula no final da mitose?
3. Por que utilizamos a extremidade de raízes novas e não outra parte qualquer da cebola?
4. O que é mitose?
5. Quais são as características que determinam cada fase da mitose?
6. Quais etapas da mitose foram evidenciadas na aula prática?
7. Todas as células observadas estavam na mesma fase da mitose? Justifique sua resposta.

Referências:

FARAH, Solange Bento. **DNA: segredos e mistérios**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 538 p.

GUERRA, Marcelo dos Santos. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 339 p.

SWANSON, Carl Pontius; MERZ, Timothy; YOUNG, Wilian. **Citogenética**. Perondini: Universidade de São Paulo, 1969. 244 p.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

DE LIMA, Renata; FRACETO, Leonardo Fernandes. Abordagem química na extração de DNA de tomate. 2007. **Química Nova na Escola**, n. 25, mai. 2007.

DURAND, Michel; FAVARD, Pierre. **A célula**. São Paulo: Edgar Blücher, 1972. 198 p.

FIRKET, Henri. **A célula viva**. São Paulo: Difusão Européia do Livro, 1968. 124 p.

JÚNIOR, CARLOS ANTONIO NEVES. **Zoologia Geral e Comparada I**. [S.l.]: Nupre, 2009. 195 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 332 p.

JUNQUEIRA, Luis Carlos; CARNEIRO, José. **Citologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 271 p.

MANNHEIMER, Walter. **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro: E-papers, 2002. 226 p.

PELCZAR, Jr. Joseph Michael; CHAN, E. C. S; KRIEG, Noel. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. 517 p.

RAVEN, Peter H; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 830 p.

SANTOS, Elias de Barros. **Caracterização de escamas do peixe Piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de íons Cu (II) em meio aquoso**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Laboratório de fabricação e síntese de materiais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008. Disponível em: <<http://www.pos.ufs.br/quimica/up/Disserta%C3%A7..pdf>>. Acesso em: 7 abr. 2012.

WHITE, Michael James Denham. **Os cromossomos**. 3. ed. São Paulo: Editora Nacional, Universidade de São Paulo. 1977. 196 p.

Diagramação, Impressão e Acabamento



Rua Fagundes Varela, 967
Cep 19802 150 • Assis • SP
Fone: (18) 3322-5775
Fone/Fax: (18) 3324-3614
vendas@graficatriunfal.com.br
www.graficatriunfal.com.br