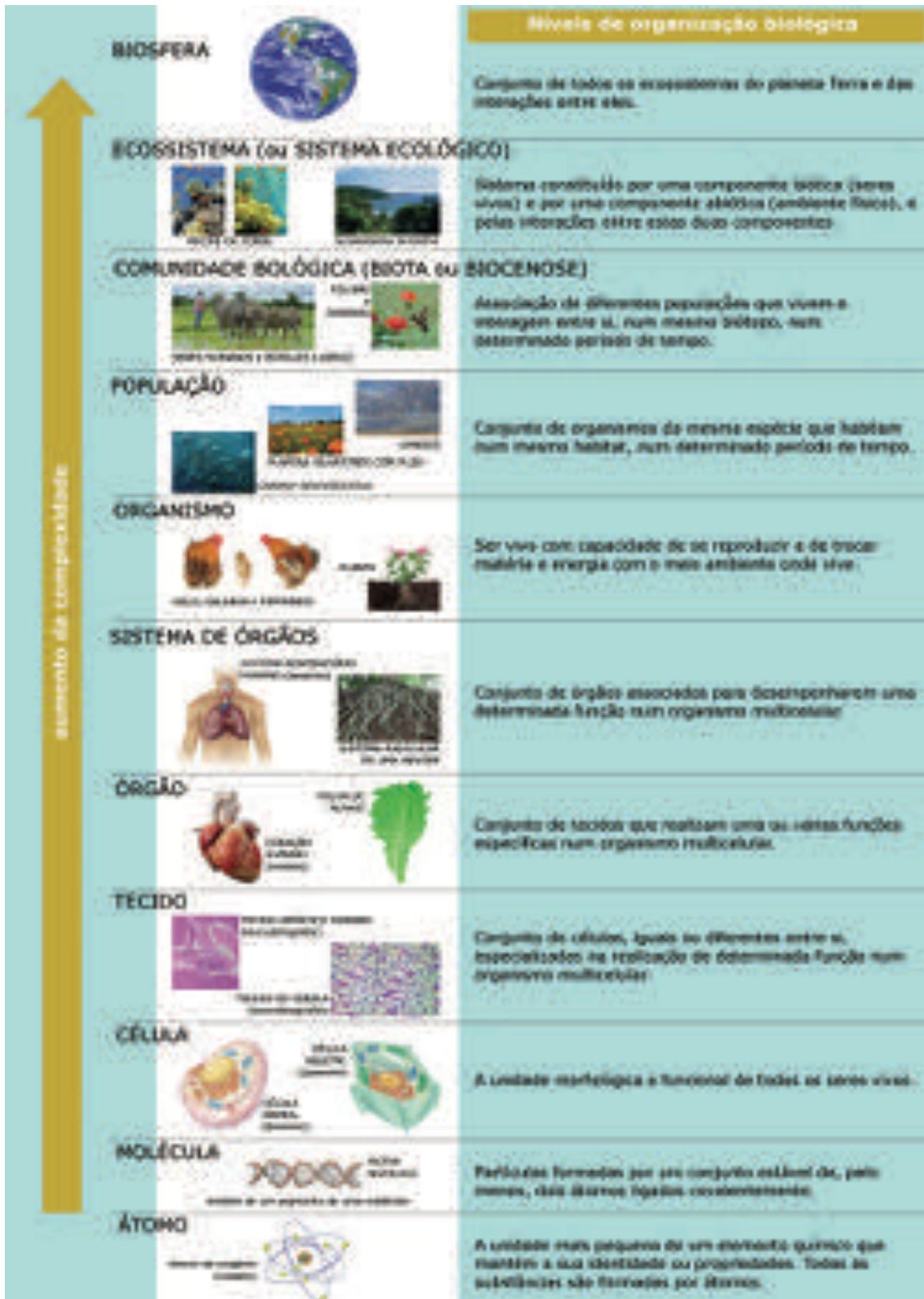


1 Níveis de organização biológica

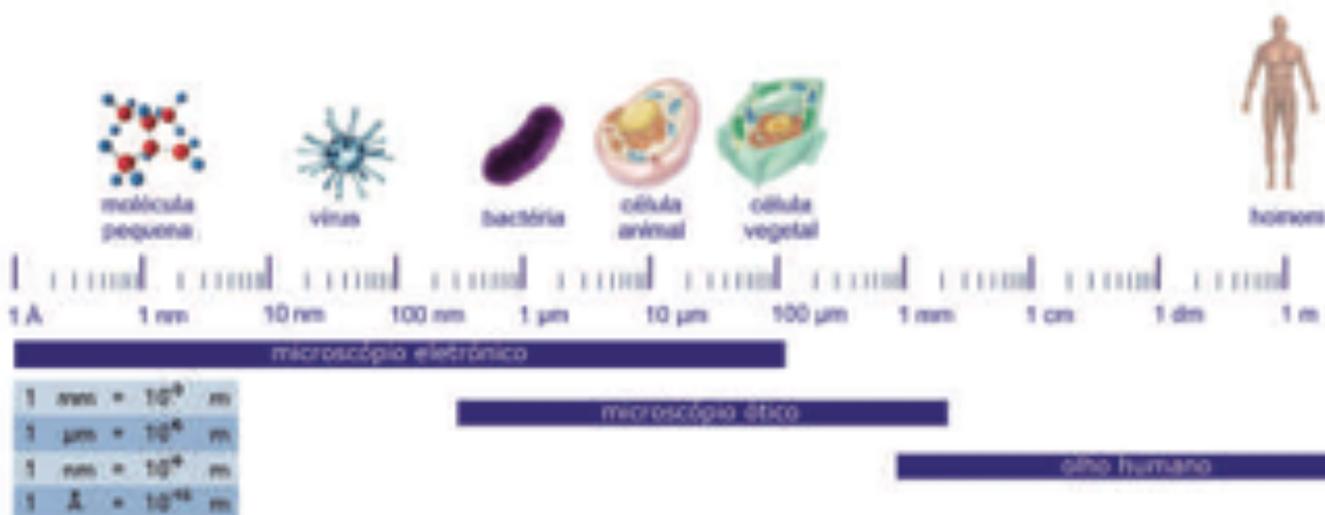


2 Unidades básicas em biologia

2.1 As escalas em biologia

As células são as unidades básicas que constituem os seres vivos. Geralmente as células são mais pequenas do que 1mm, pelo que não as conseguimos ver a olho nu. Quando pretendemos estudar a organização interna das células e os seus organelos, ou seja a ultraestrutura da célula, temos de utilizar microscópios e trabalhar com unidades de medida muito mais pequenas do que o mm.

Tamanhos relativos (em escala logaritmica de base 10)

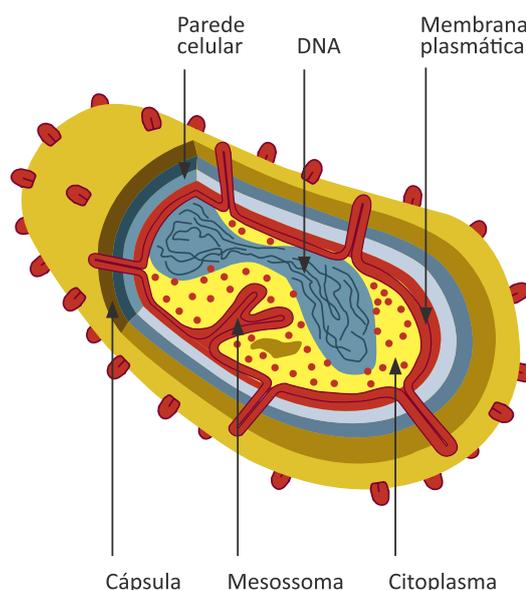


2.2 Células procarióticas e eucarióticas

As células dos seres que classificamos como Bactéria ou Archaea são células em que o citoplasma não tem compartimentos separados por membranas. Nestas células não existe um núcleo, nem retículo endoplasmático ou mitocôndrias. A figura ao lado representa a ultraestrutura de uma célula procariótica.

As células eucarióticas, por outro lado, são células em que há compartimentos, no citoplasma, delimitados por membranas.

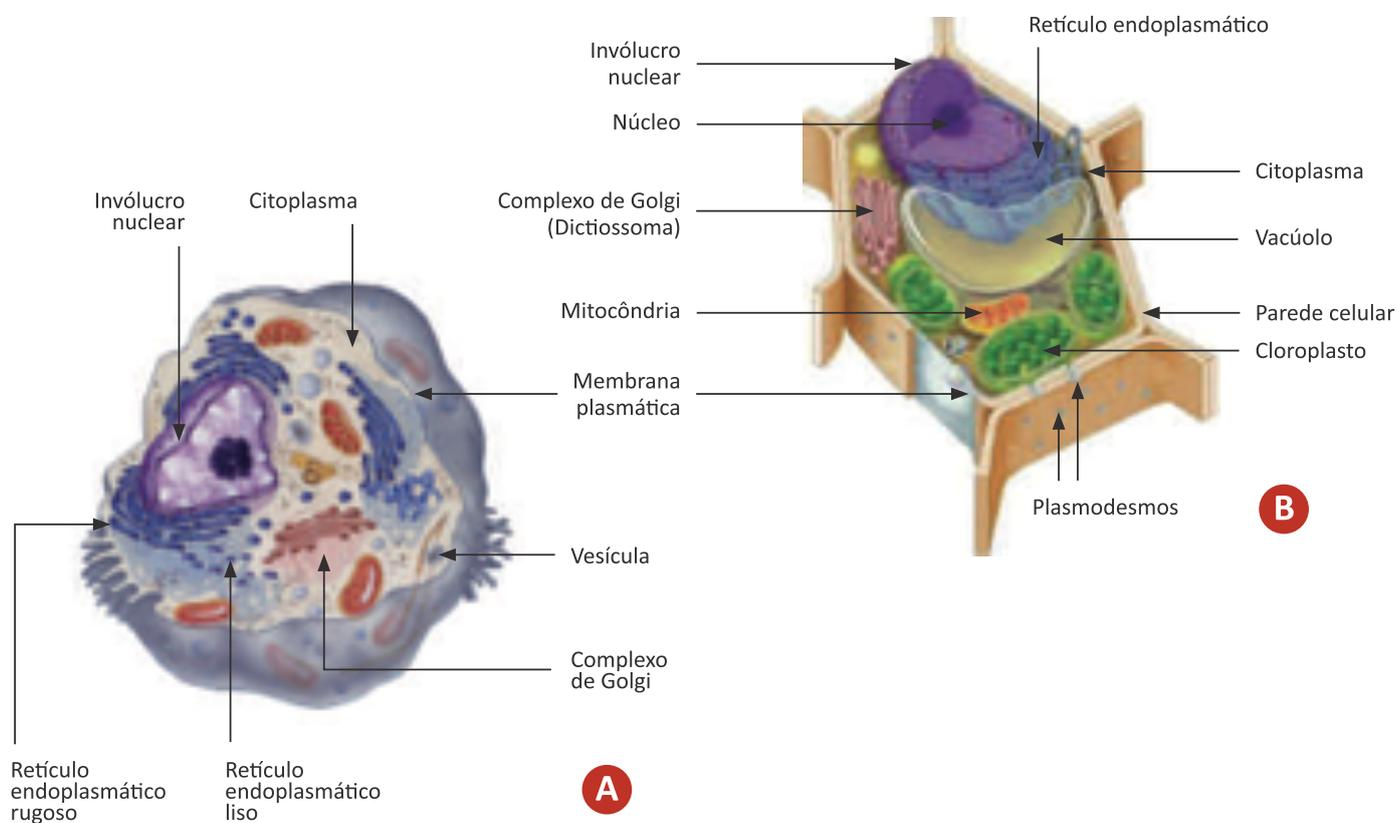
Os organelos das células eucarióticas podem variar um pouco em função do tipo de ser vivo ou do grau de especialização do tecido. Em geral todas as células têm núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomas e vacúolos.



Esquema de célula procariótica

Os cloroplastos só existem nas células vegetais que realizam fotossíntese.

As células eucarióticas formam todos os organismos que classificamos como Eukarya. As figuras seguintes esquematizam uma célula animal (A) e uma célula vegetal (B). (Revê a Unidade 3 do 10º ano).



A – Esquema de célula animal

B – Esquema de célula vegetal

No quadro seguinte resumem-se alguns exemplos de organelos celulares e suas funções.

ORGANELO CELULAR	FUNÇÃO
Núcleo	Contém o DNA (código genético da célula).
Mitocôndria	Realiza reações da respiração celular.
Complexo de Golgi	Processa e transporta substâncias como, por exemplo, proteínas.
Retículo endoplasmático	Sintetiza e transporta substâncias. Quando associado a ribossomas sintetiza proteínas.
Vacúolo	Tem grandes dimensões em células vegetais. Armazena água e substâncias. Tem pequenas dimensões nas células animais. Faz, por exemplo, digestão de substâncias.
Cloroplastos	Usa a luz solar para fazer a fotossíntese.

3 Atividades laboratoriais: divisão celular

3.1 Preparação de ápices de raiz de cebola (*Allium cepa* L) para análise de figuras de mitose

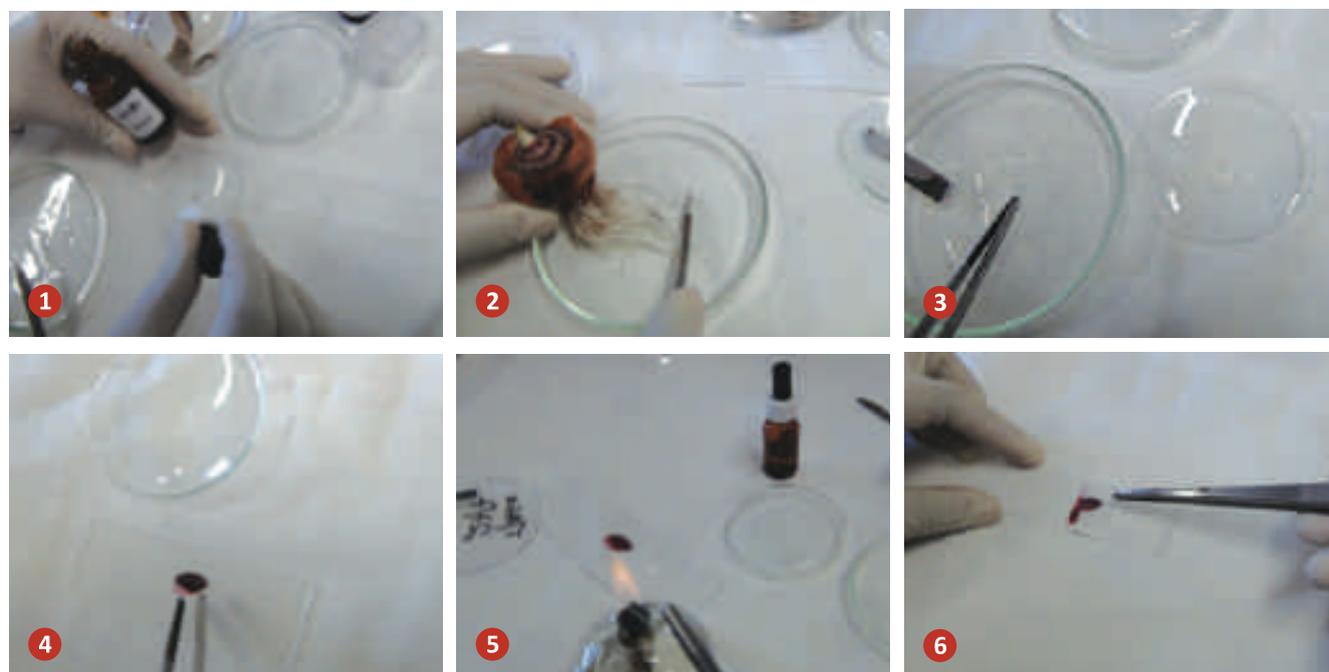
Material

Extremidades de raízes jovens de cebola (*Allium cepa* L)

- | | | |
|--------------------------------|--|--------------------------|
| a) Vidro de relógio | b) Pinça e bisturi | c) Ácido clorídrico a 5% |
| d) Microscópio ótico (MOC) | e) Lâminas e lamelas | f) Papel de filtro |
| g) Lamparina e mola ou suporte | h) Solução diluída de coranteorceína acética | |

Atividade

- 1 - Coloca uma gota de solução diluída de ácido clorídrico (HCl) num vidro de relógio (Figura 1).
- 2 - Corta uma porção pequena (4 a 5mm) da extremidade da raiz (contendo o ápice) (Figura 2).
- 3 - Coloca as porções de raiz no vidro de relógio. Espera 15 minutos (Figura 3).
- 4 - Coloca 1 gota de solução diluída de coranteorceína acética numa lâmina de microscopia. Transfere a extremidade da raiz para a lâmina mergulhando-a na gota do corante (Figura 4).
- 5 - Segura a lâmina com uma pinça e aquece-a à chama alguns segundos (não deixes queimar) (Figura 5).
- 6 - Coloca a lamela e comprime para esmagar suavemente a raiz, junto ao ápice (Figura 6).
- 7 - Coloca no microscópio ótico e observa seguindo as regras de utilização do microscópio (vê secção 4).
- 8 - Procura identificar as células em interfase, profase, anafase e telofase. Desenha e legenda o que observas.



Passos iniciais para a preparação de material biológico (ápices de raízes de cebola) para visualização de mitoses ao microscópio ótico. Os números correspondem às etapas descritas acima.

3.2 Preparação de anteras para análise de figuras de meiose

Material

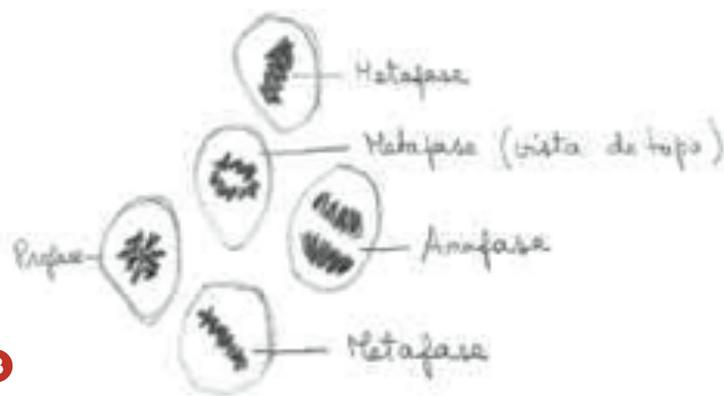
- a) Solução fixadora de 3 partes de álcool para 1 parte de ácido acético (fixador de *Carnoy*)
- b) Anteras de milho (*Zea mays* L) ou de *Lilium* sp, por exemplo.
- c) Solução diluída de corante carmim
- d) Lâminas e lamelas
- e) Pinça e bisturi
- f) Álcool etílico a 70%
- g) Microscópio

Atividade

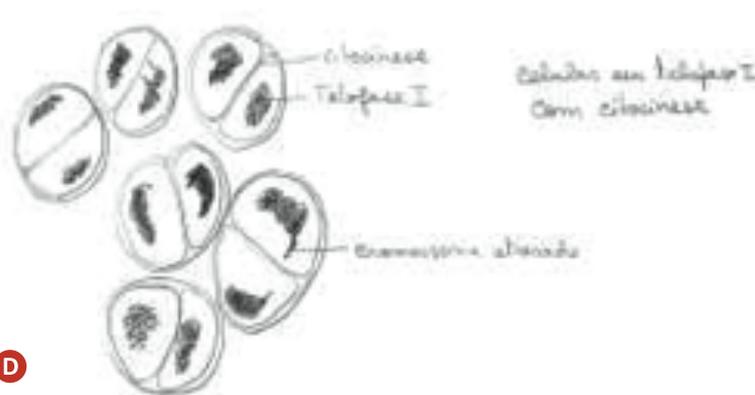
- 1- Usa anteras que te são fornecidas pelo(a) professor(a) já fixadas em *Carnoy* (durante 1 a 2 dias), e posteriormente fixadas em álcool 70%.
- 2 - Transfere 1 a 2 anteras para uma lâmina limpa.
- 3 - Coloca sobre as anteras 1 ou 2 gotas de solução corante de carmim.
- 4 - Com o bisturi corta as anteras esmagando-as depois suavemente com uma pinça para soltar as células.
- 5 - Aquece a lâmina ligeiramente.
- 6 - Cobre a lâmina com a lamela e pressiona para esmagar suavemente. Deixa arrefecer.
- 7 - Coloca a preparação no microscópio ótico e observa seguindo as regras de utilização do microscópio (vê secção 4).
- 8 - Localiza as células em meiose. Desenha e legenda as várias fases da divisão I e II que observas (observa os exemplos abaixo).



(A) Microfotografia de células em meiose (Fase I) em MOC (400x); (B) desenho esquemático da microfotografia, com legenda



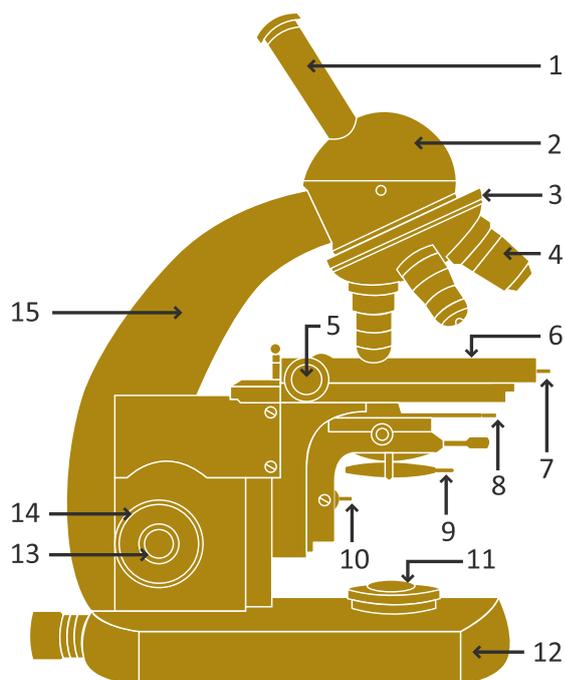
(A) Microfotografia de células em meiose (Fase I) em MOC (400x); (B) desenho esquemático da microfotografia, com legenda



4 Utilização do microscópio ótico composto

4.1 Constituição

O microscópio ótico composto é um instrumento muito dispendioso, por isso importa conhecê-lo e seguir as regras de utilização, de modo a usá-lo com cuidado para que não seja danificado. As figuras seguintes mostram a sua constituição básica.



1. **Ocular** – contém lentes que ampliam a imagem fornecida pela objetiva;
2. **Tubo** – peça que suporta a ocular (duas oculares no microscópio ótico binocular) e o revólver;
3. **Revólver** – suporta todas as objetivas e deve ser rodado para mudar de objetiva;
4. **Objetivas** – ampliam a imagem da amostra;
5. **Parafuso da sobreplatina** – move a sobreplatina (muitos MOC não possuem esta peça);
6. **Pinça ou pinças da sobreplatina** – seguram a preparação sobre a platina;
7. **Platina** – suporta a preparação que está a ser observada;
8. **Diafragma** – abre e fecha regulando a quantidade de luz que atinge a preparação;
9. **Condensador** – sistema de lentes que concentra a luz na preparação;
10. **Parafuso do condensador** – sobe e desce o condensador;
11. **Fonte de iluminação** – emite um feixe de luz em direção ao condensador;
12. **Base** – assenta na bancada e fornece estabilidade ao microscópio;
13. **Parafuso micrométrico** – parafuso que promove os movimentos de pequena amplitude da platina;
14. **Parafuso macrométrico** – parafuso que promove os movimentos de grande amplitude da platina;
15. **Braço** – suporta o tubo e faz a ligação à base do microscópio.

4.2 Colocação da preparação e focagem até à objetiva de 40x e de 100x

A) Focagem para a objetiva de 40x

1. Retira a proteção do microscópio, liga-o à corrente elétrica e liga o interruptor.
2. Confirma se a objetiva de menor ampliação (4x) está colocada na posição de observação.
3. Ajusta o condensador, aproximando-o da platina.
4. Coloca a preparação na platina, com a lamela voltada para cima, fixa-a com as pinças e ajusta-a para que a amostra fique iluminada pelo feixe de luz.
5. Roda o parafuso macrométrico sobe a platina.
6. Observa pelas oculares e ajusta a intensidade da luz, regulando a abertura do diafragma.
7. Usando o parafuso macrométrico começa a descer a platina até começares a observar algo da amostra.
8. Passa a utilizar o parafuso micrométrico (rodando nos dois sentidos) até a imagem ficar o focada o melhor possível.
9. Para observar outras partes da amostra desloca a preparação sobre a platina.
10. Roda o revólver para a objetiva seguinte e ajusta a focagem com o parafuso micrométrico. Nunca movas a platina antes de efetuar este procedimento. Se não conseguires focar a amostra, volta a colocar a objetiva de 4x e reinicia a focagem.
11. Terminada a observação com a objetiva de 10x, coloca a de 40x. Cuidado, pois a objetiva ficará muito próxima da preparação. Foca rodando apenas o parafuso micrométrico. Se necessário reinicia a focagem com a objetiva de 4x.
12. No final, baixa totalmente a platina com o parafuso macrométrico. Coloca a objetiva de 4x e retira a preparação.
13. Desliga o interruptor e arruma o aparelho, colocando sempre a capa de proteção.



B) Focagem para a objetiva de 100x

Nos casos em que precisares de grande ampliação, podes usar a objetiva de 100x. Para isso, debes proceder como descrito acima até ao ponto 11. Em seguida:

12. Assegura que tens a imagem focada e centrada na objetiva de 40x.
13. Roda o revólver e coloca uma objetiva menor (atenção não mexas nos parafusos micrométricos).
14. Coloca uma gota de óleo de imersão sobre a lamela.
15. Com muito cuidado roda a objetiva de 100x.
16. Ajusta com muito cuidado a focagem com o parafuso micrométrico.
17. Depois de veres, baixa totalmente a platina com o parafuso macrométrico.
18. Deves depois limpar com um lenço a objetiva de 100x, para remover o óleo.
19. No final, baixa totalmente a platina com o parafuso macrométrico. Coloca a objetiva de 4x e retira a preparação.
20. Desliga o interruptor e arruma o aparelho, colocando sempre a capa de proteção.

4.3 Cuidados específicos

1. As objetivas possuem, geralmente, um anel colorido, que as identifica, e uma inscrição com o seu poder de ampliação: geralmente 4x (anel vermelho), 10x (anel amarelo) e 40x (anel azul) e 100x (anel preto). Verifica estas características de forma a distinguir, facilmente, cada uma das objetivas.

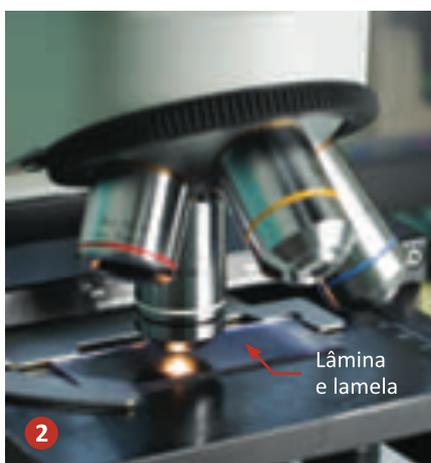
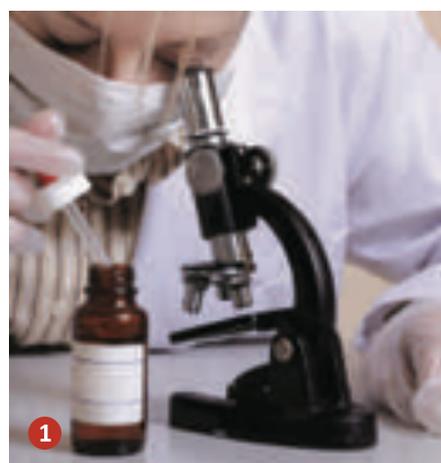
2. Nunca toque nas lentes das objetivas ou das oculares com as mãos.
3. Se as lentes do microscópio ficarem sujas pede ao professor para proceder à sua limpeza. Nunca force os parafusos do microscópio (macrométrico, micrométrico, sobreplatina, revólver e condensador).
4. A platina do microscópio deve ser sempre mantida limpa e seca. Podes usar um lenço de papel para a limpar.

Algumas informações sobre a objetiva de 100x

Esta objetiva é diferente das anteriores. Por exemplo, a objetiva de 100x é maior que as outras, o que quer dizer que pode mais facilmente tocar na lamela, e sujar-se ou ficar riscada. Se isto acontecer, a objetiva pode ficar estragada. Assim, só se deve usar a objetiva de 100x quando é mesmo necessário usar grandes ampliações para ver estruturas celulares muito pequenas.

Como a objetiva de 100x está muito próximo da lamela, coloca-se uma gota de um óleo especial chamado “óleo de imersão” entre a objetiva e a preparação para que os feixes de luz atravessem o vidro e o óleo sem se desviarem. O óleo de imersão ajuda por isso a teres uma imagem mais nítida com a objetiva de 100x.

O óleo de imersão só pode ser usado com a objetiva de 100x e pode estragar as outras objetivas. Assim, NUNCA uses a objetiva de 40x numa lâmina / lamela com óleo de imersão.



1) Colocar uma gota de óleo de imersão sobre a lamela; 2) com muito cuidado rodar o revólver para a objetiva de 100x ficar sobre a gota do óleo de imersão e observar ajustando a focagem; 3) descer a platina e rodar a objetiva de 100x limpando a lente (seta) com um lenço muito limpo, para retirar o resto de óleo de imersão.

5 Outras técnicas usadas em laboratórios de biologia

5.1 Uso da balança de precisão

A determinação da massa de substâncias químicas (ex. cloreto de sódio, sacarose, glicose, amido) para realizar trabalhos laboratoriais é feita com balanças de precisão. Existem vários modelos.

A balança analítica é um instrumento delicado que deve ser usada com extremo cuidado. Só funciona com rigor se estiver bem limpa e seca. O professor fornecerá instruções sobre como usar corretamente a balança.

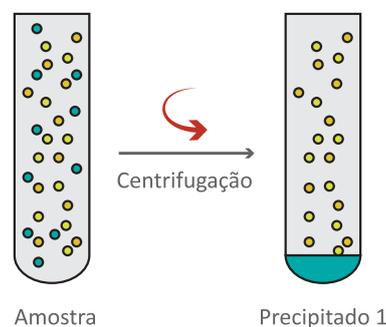
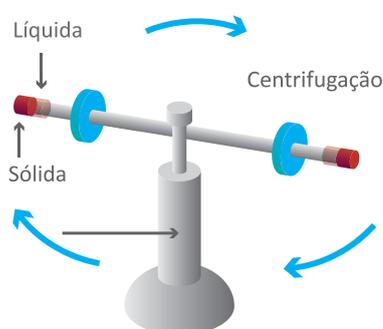
Nunca se deve colocar cargas (sais, líquidos, material biológico, etc.) diretamente no prato da balança. Usa-se sempre uma superfície de proteção (caixa de plástico, vidro de relógio, papel, etc.) que deve ser colocada no centro do prato da balança. Depois de usar a balança, esta deve ser desligada e bem limpa.



1)Ligar a balança; 2) colocar o suporte que vai receber as substâncias (neste caso um vidro de relógio); 3) voltar a colocar a balança a 0,000g; 4 e 5) adicionar com cuidado a substância a pesar até ao valor desejado

5.2 Centrifugação

A **centrifugação** é um processo de separação de partículas numa amostra fluida. A amostra é colocada dentro de tubos. Os tubos são colocados num rotor de um aparelho que se chama **centrífuga**.



Quando o rotor da centrífuga roda faz os tubos rodarem a grande velocidade (exemplo 100 a 100 000 rotações por minuto, ou seja, o tubo pode dar 100 000 voltas num minuto). O número de rotações que o tubo faz por minuto chama-se **rotações por minuto**. Esta rotação faz com que as partículas no fluido se separem, pois as mais pesadas descem mais depressa e as mais leves descem mais devagar. O conjunto de partículas que se depositam no fundo do tubo como resultado da centrifugação chama-se sedimento ou **pellet**. O conjunto de amostra que não deposita chama-se **sobrenadante**.

A centrífuga é um aparelho caro. Se for mal manipulado pode ser perigoso, por isso deve ser usado com cuidado. Algumas regras básicas: verificar se a centrífuga se encontra limpa e bem cuidada; usar apenas tubos próprios para a centrífuga; usar sempre um tubo de calibração (pode conter apenas água) para compensar o teu tubo da amostra; os tubos têm de ficar em lados opostos entre si; fechar a tampa da centrífuga antes de marcar o tempo e a velocidade de rotações por minuto; retirar os tubos sem agitar nem mexer bruscamente para não agitar as

frações separadas (para o sedimento não se misturar com o sobrenadante); depois de usar a centrífuga limpar e desligar da corrente elétrica.



1) Colocar a amostra no tubo de centrífuga e colocar igual volume de água no outro tubo de centrífuga; 2) colocar um tubo na centrífuga; 3) colocar o outro tubo no lado oposto do rotor da centrífuga; 4) fechar a centrífuga e programar a centrífuga para o tempo e velocidade desejada.

Existem atualmente vários modelos de centrífugas desde as manuais até centrífugas grandes e que atingem altas velocidades.

A centrifugação é uma técnica muito importante para a biologia, química, e outras áreas. Podes aprofundar mais conhecimentos sobre o funcionamento das centrífugas e centrifugação nas disciplinas de química e de física.



5.3 Eletroforese

A **eletroforese** é uma técnica de separação de moléculas, por exemplo, proteínas, RNA, DNA, etc. com a ajuda de um campo elétrico.

Um pequeno volume da amostra é colocado num pequeno poço de um gel dentro de uma tina. A tina contém uma solução rica em sais e com pH estável (solução tampão) e que cobre o gel. A esta solução na tina aplica-se um campo elétrico. Assim, um dos lados da tina fica carregado positivamente, o ânodo (+), e outro lado fica carregado negativamente, o cátodo (-).

Normalmente, as moléculas da amostra estão carregadas negativamente e por isso deslocam-se para o lado positivo da tina (ânodo).



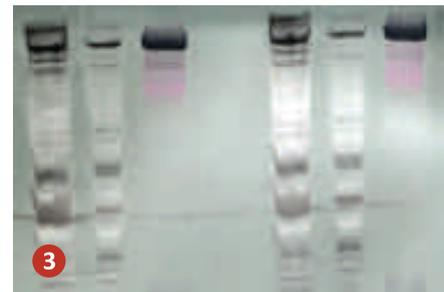
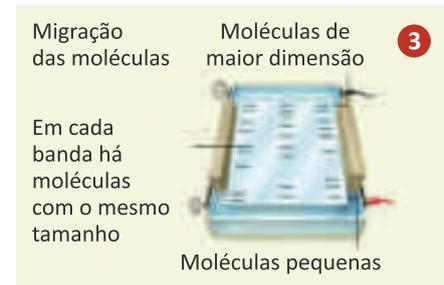
As moléculas mais pequenas deslocam-se mais depressa no gel, e as moléculas maiores deslocam-se mais devagar.

Os equipamentos de eletroforese, normalmente são constituídos por duas partes: a tina (onde se coloca a solução tampão e o gel com a amostra) e uma fonte de alimentação que fornece a corrente elétrica que vai criar na tina os polos elétricos positivo e negativo.

São aparelhos sensíveis que devem ser manipulados com cuidado.

Algumas regras básicas: verificar que a tina se encontra limpa e bem cuidada; a solução tampão deve estar limpa; usar apenas géis e suportes adequados à tina; colocar a amostra nos poços com muito cuidado para a amostra não sair do poço; a tina deve estar em local estável sobretudo quando ligada à fonte de alimentação; depois de usar deixar o equipamento e a bancada limpos.

A eletroforese é uma técnica muito importante para a biologia, química e física. Podes explorar mais sobre esta técnica nas disciplinas de química ou física.



1) Colocar a amostra no poço do gel, na tina; 2) tapar a tina e plicar uma corrente elétrica (fornecida pela fonte de alimentação); após corrida vêm-se bandas que correspondem a moléculas com pesos diferentes.

5.4 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) permite copiar fragmentos de DNA. Esta **amplificação** é feita à custa de uma polimerase extraída de microrganismos que vivem em ambientes de elevada temperatura, e por isso, as suas enzimas também toleram altas temperaturas. Geralmente usa-se a polimerase de um microrganismo chamado *Thermus aquaticus*.

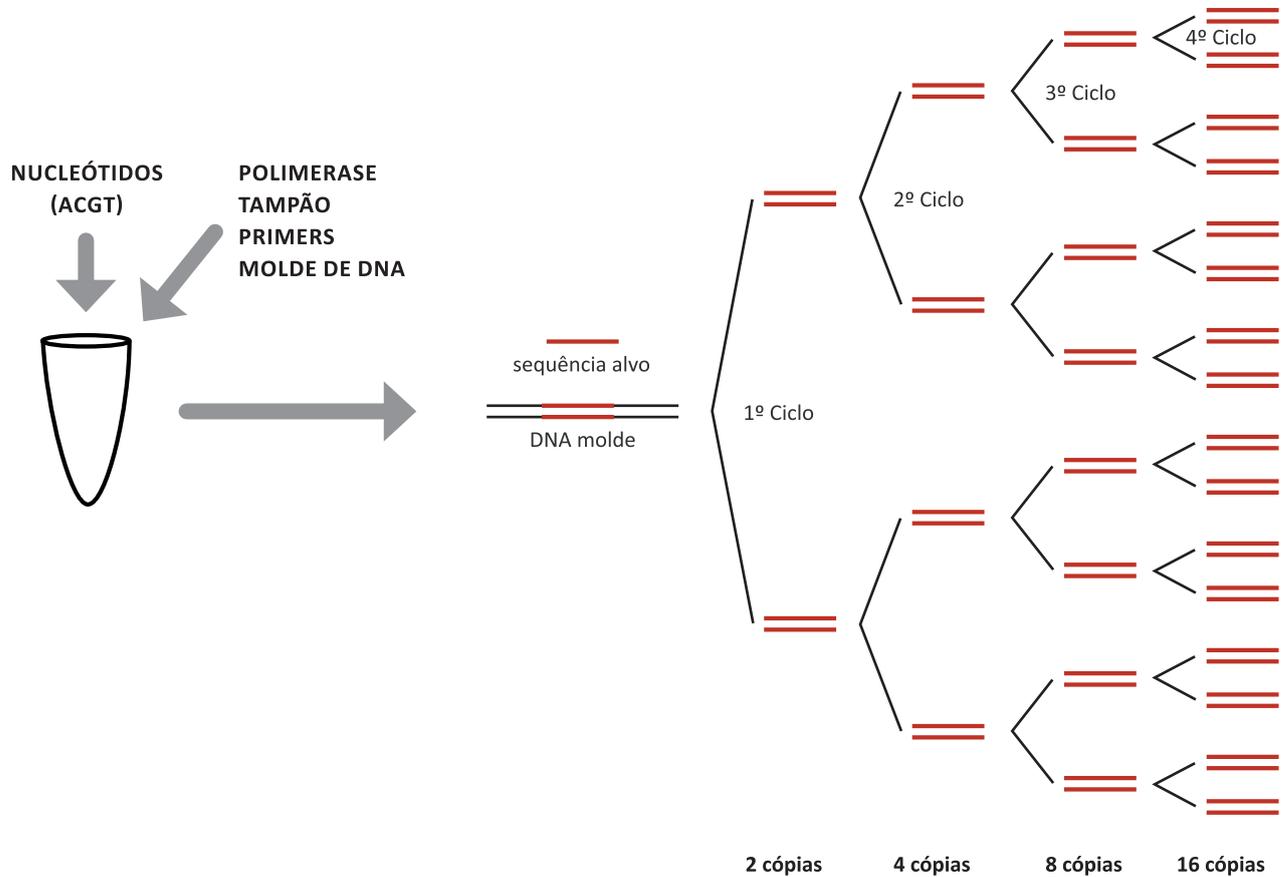
Num tubo coloca-se o tampão, o fragmento de DNA a copiar, a enzima, pequenos fragmentos complementares de porções do fragmento de DNA a copiar (chamados *primers*) e nucleótidos (de adenina, de guanina, de timina e de citosina).

Quando se usa a polimerase de *Thermus aquaticus*, chamada Taq polimerase, usam-se as temperaturas descritas a seguir:

O tubo é colocado num aparelho que:

- 1) Aquece a cerca de 95°C e separa as cadeias da dupla hélice de DNA (desnaturação do DNA).
- 2) Depois baixa a temperatura para cerca de 50°C, permitindo que os *primers* emparelhem com as zonas complementares de DNA (emparelhamento).

3) Em seguida sobe a temperatura para cerca de 72°C (temperatura ideal para a enzima polimerase do DNA poder trabalhar), permitindo que a polimerase adicione novos nucleótidos. Forma-se assim uma cópia de cada cadeia da molécula modelo de DNA.



Composição do meio de reação no tubo de PCR; B) esquema do aumento de cópias de DNA ao longo dos ciclos

No segundo ciclo a temperatura volta a variar (por exemplo, 95°C / 50 °C / 72 °C) e forma-se outra cópia de cada cadeia. Repetindo os ciclos formam-se muitas cadeias, numa progressão exponencial. Diz-se que a amostra foi amplificada.

Esta técnica é essencial para se obter DNA em quantidade necessária para estudos de biologia molecular, engenharia genética, biotecnologia, medicina, ciências forenses, entre outros.



1) Colocar os tubos de PCR no aparelho de PCR; 2) fechar o aparelho; 3) programar o aparelho para fazer vários ciclos de variação de temperatura

6 Regras de segurança em laboratório



Uso de roupa e óculos de proteção

1. Prende cabelos longos, e protege peças ornamentais ou vestuário que possam tocar em substâncias.
2. Usa sempre uma bata de proteção.
3. Usa óculos de proteção quando existe a possibilidade de qualquer substância química atingir os olhos.

Regras de conduta

4. Não deves comer ou beber dentro do laboratório.
5. Antes de executar qualquer trabalho, lê com atenção as instruções de procedimento. Não avances com dúvidas.
6. Nunca executes trabalhos que não tenham sido autorizados pelo professor.
7. Nunca toques, cheires ou comas uma substância química nem uses vidro de laboratório para beber.
8. Nunca pipetas com a boca.
9. Manipula com muito cuidado as substâncias químicas. Se alguma derramar, pede ajuda sobre a forma de limpar.
10. Comunica imediatamente ao professor qualquer tipo de acidente que ocorra dentro do laboratório.

Regras de segurança quando se utilizam fontes de aquecimento

11. Nunca uses uma fonte de chama sem o professor explicar o funcionamento.
12. Mantém a área à volta de uma chama desocupada e limpa e não te aproximes muito.
13. Nunca aqueças um recipiente fechado porque este pode rebentar.
14. Nunca direciones a abertura de tubos a aquecer para ti nem para os teus colegas.
15. Não agarres objectos a aquecer ou aquecidos com a mão.

Como usar utensílios afiados em segurança:

16. O uso de lâminas de bisturi, ou de facas, deve ser feito com extremo cuidado.
17. Nunca cortes material na tua direção, mas sim na direção oposta, e sempre apoiado numa superfície específica.
18. Avisa imediatamente o professor se te cortares com algum utensílio afiado.

Regras a seguir no final de cada trabalho

19. No final do trabalho, limpa e arruma a área de trabalho; desliga e guarda o equipamento utilizado.

20. Se utilizaste a fonte de aquecimento verifica se este fica desligado e se a ligação ao gás fica fechada.

21. Lava as mãos com água e sabão, no final de cada trabalho.

7 Alguns materiais de laboratório

Apresentam-se em seguida algum material de laboratório.



Copo (ou goblé)
com vareta



Proveta



Matraz



Funil



Pipeta
volumétrica



Pipetas Pasteur
com Tetina



Frasco
e conta gotas



Tubos de ensaio
e suporte de tubos



Almofariz
e Pilão



Balão volumétrico



Caixa de Petri



Tubo de centrífuga



Lamparina



Bico
de Bunsen (a)



Bisturi
(com lâmina)



Tesoura



Pinça