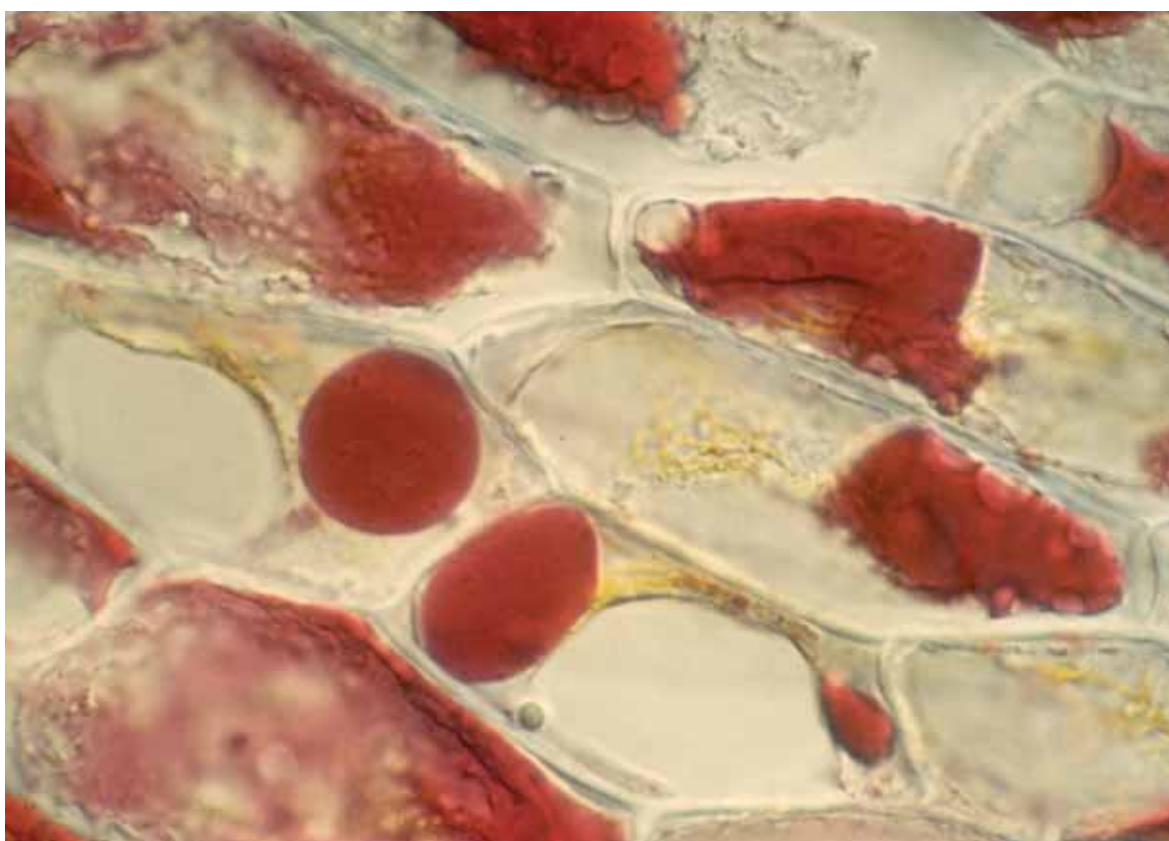


## GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA CELULAR



Ana Cristina da Silva Figueiredo, Luis Manuel Gaspar Pedro, José Manuel Gonçalves Barroso



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

## **GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA CELULAR**

Por:

Ana Cristina da Silva Figueiredo

Luis Manuel Gaspar Pedro

José Manuel Gonçalves Barroso

### **Figura da capa:**

Plasmólise em epiderme da página adaxial da pétala de *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Malvaceae)

Uma palavra de agradecimento aos co-autores de edições anteriores deste Guia, que muito contribuíram para a sua evolução, ao longo dos anos. Os autores agradecem, ainda, a todos quantos, direta ou indiretamente, ajudaram na redação final deste Guia Prático. Uma palavra particular de agradecimento à Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Amorim e ao Prof. Dr. Ricardo Melo do Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela valiosa contribuição na atualização do capítulo 2. Diversidade Celular.

As espécies mencionadas neste guia prático são utilizadas, seguindo os protocolos que constam deste guia, num contexto científico de demonstração, restrito às aulas laboratoriais. Os autores não assumem quaisquer responsabilidades pela utilização indevida, para outros fins ou descontextualizada, por parte de terceiros.





## FICHA TÉCNICA

**Título:** Guia Prático de Biologia Celular

**Edições anteriores:**

Edição de Autores,

1ª Edição, Sebenta de Citologia Prática, Lisboa, 1989

Edição da Associação dos Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa, AEFCL,

2ª Edição, Sebenta de Citologia Prática, Lisboa, 1992

3ª Edição, Sebenta de Citologia Prática, Lisboa, 1994

4ª Edição, Citologia (Prática), Lisboa, 1996

5ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 1997

6ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 1997

7ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 1998

8ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 1999

9ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 2003

10ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 2003

11ª Edição, Guia Prático de Biologia Celular, Lisboa, 2004

Edição da Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal,

1ª Edição, Lisboa, Maio de 2013 – versão pdf online e versão impressa

2ª Edição, Lisboa, Julho de 2014 – versão pdf online e versão impressa

3ª Edição, Lisboa, Setembro de 2019 – versão pdf online

**Autores:**

Ana Cristina da Silva Figueiredo

Luis Manuel Gaspar Pedro

José Manuel Gonçalves Barroso

**Edição:**

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal.

**Composição, Impressão e Acabamentos:**

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal.

**Tiragem:**

4ª Edição, Lisboa, Fevereiro de 2023 – versão pdf online e versão impressa

**ISBN (versão pdf online): 978-989-99127-4-8**

**ISBN (versão impressa): 978-989-99127-5-5**

**Depósito Legal nº: 511560/23**



# ÍNDICE

GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA CELULAR .....	1
GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA CELULAR .....	3
FICHA TÉCNICA .....	5
ÍNDICE .....	I
1. MICROSCOPIA ÓTICA .....	1
1.1. Microscópio Ótico .....	1
1.1.1. Componentes do Microscópio Ótico .....	2
1.2. Tipos de Microscópio Ótico .....	5
1.2.1. Microscópio de fundo escuro .....	5
1.2.2. Microscópio de contraste de fase .....	6
1.2.3. Microscópio de interferência ou de Nomarski .....	6
1.2.4. Microscópio de fluorescência .....	7
1.2.5. Microscopia confocal .....	8
1.3. Como utilizar o microscópio .....	9
1.4. Medições em preparações microscópicas .....	10
2. DIVERSIDADE CELULAR.....	12
2.1. Procariotas.....	13
2.1.1. <i>Bacteria</i> .....	16
2.1.2. <i>Archaea</i> .....	18
2.2. Eucariotas .....	18
2.2.1. Protistas.....	21
2.2.2. Fungos.....	27
2.2.3. Animais.....	27
2.2.4. Plantas.....	27
3. A CÉLULA.....	28
3.1. Parede celular vegetal .....	28
3.1.1. Alterações químicas da parede celular .....	32
3.2. Matriz extracelular nas células animais .....	37
3.2.1. A diversidade celular nos diferentes tecidos animais .....	39
3.3. Membrana plasmática.....	43
3.4. Movimentos de ciclose .....	45
3.5. Vacúolos e inclusões vacuolares .....	46
3.5.1. Conteúdo vacuolar.....	47
3.6. Plastos .....	51
3.6.1. Cloroplastos.....	52
3.6.2. Leucoplastos.....	54
3.6.3. Amiloplastos .....	55
3.6.4. Cromoplastos.....	55
3.6.5. Proteoplastos.....	56
3.6.6. Oleoplastos.....	56
3.7. Núcleo .....	56
3.7.1. Ciclo celular .....	58
3.7.2. Mitose .....	58
3.7.3. Meiose .....	61

<b>4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO E DE TRANSMISSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Microscopia eletrônica de transmissão .....</b>	<b>65</b>
4.1.1. Fixação.....	67
4.1.2. Lavagens.....	68
4.1.3. Desidratação .....	68
4.1.4. Impregnação e Inclusão .....	68
4.1.5. Seccionamento.....	68
4.1.6. Contrastação .....	68
<b>4.2. Microscopia eletrônica de varrimento .....</b>	<b>68</b>
4.2.1. Secagem ao ar .....	70
4.2.2. Criossecagem .....	70
4.2.3. Secagem pelo método do ponto crítico .....	70
4.2.4. Metalização .....	71
<b>5. PROTOCOLOS .....</b>	<b>74</b>
<b>6. APÊNDICE .....</b>	<b>98</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>101</b>
<b>8. ÍNDICE REMISSIVO .....</b>	<b>102</b>

## 1. MICROSCOPIA ÓTICA

### 1.1. Microscópio Ótico

Instrumento de trabalho de numerosos cientistas, desde há mais de três séculos, o microscópio tem permitido observar diversos objetos e organismos não perceptíveis à vista desarmada. Esta capacidade deve-se a um sistema ótico, composto por lentes, que fornece uma imagem ampliada do objeto.

Foi no século XVII que a construção e o aperfeiçoamento do microscópio, em particular o sistema de lentes, conheceu a sua maior expansão. Anton van Leeuwenhoek e Hans e Zacharias Jansen, fabricantes de óculos, desenvolveram os primeiros microscópios simples e compostos. Leeuwenhoek foi um dos primeiros a registar observações feitas num microscópio simples, que constava de uma lente que se segurava com a mão e se dirigia para a fonte luminosa para que a luz atravessasse a lente e o objeto.

São ainda de destacar os trabalhos de Campani (1662), Hooke (1665) e Divini (1668). No microscópio de Hooke o objeto era fixo por um grande alfinete e a luz fornecida por uma lamparina de azeite. O sistema de lentes permitia uma ampliação de 270x.

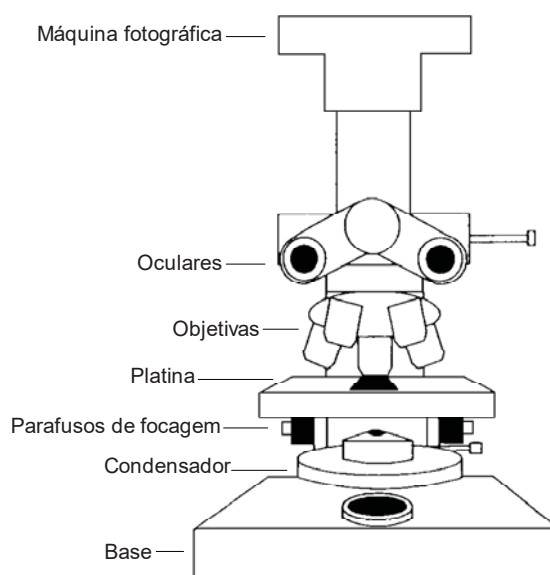


Fig. 1.1. Representação esquemática de um microscópio ótico.

Até ao século XIX, os fabricantes não conseguiam obter lentes que não decompusessem a luz. Este fenómeno, conhecido como aberração cromática, levava a que se obtivesse uma imagem colorida imprecisa. Só em 1830 se construíram as primeiras lentes acromáticas. O outro defeito muito comum nas lentes, a aberração esférica, só viria a ser corrigido anos mais tarde com Ernst Abbe e Carl Zeiss (1886), que produziram as primeiras lentes apocromáticas, capazes de corrigir não só as aberrações cromáticas como as esféricas.

Nas últimas décadas do século XIX, os microscópios começaram a assumir o aspeto que têm hoje. As grandes versões compostas passaram a exigir dos fabricantes melhorias significativas ao nível do sistema de iluminação. Assim, em 1893, August Köhler introduziu um novo sistema de iluminação, cujo princípio ainda hoje é utilizado.

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento tecnológicos têm permitido a construção de

instrumentos de elevado poder de resolução e ampliação. O microscópio é hoje um instrumento de trabalho de aplicações tão diversas como a biologia, a eletrónica ou a metalurgia.

### 1.1.1. Componentes do Microscópio Ótico

<b>Parte Mecânica</b>	Pé ou base		
	Braço		
	Tubo ou canhão		
	Platina ou porta-objetos com pinças e nónios		
	Revólver ou porta-objetivas		
	Parafuso macrométrico		
<b>Parte Ótica</b>	Sistema de Iluminação		Fonte luminosa Condensador
	Sistema de Ampliação	Objetivas	Apocromáticas Imersão Parafocais
		Oculares	

A microscopia pode ser definida como *the art and science of making fine detail visible*. Esta definição acarreta conceitos importantes para os utilizadores de microscópios: ampliação, resolução, contraste e medição.

A ampliação relaciona a dimensão da imagem do objeto com a sua dimensão real. A resolução de um microscópio corresponde à capacidade de separar dois pontos tão próximos quanto possível um do outro. O contraste corresponde a acentuar as diferenças entre os constituintes da preparação de modo a fazer sobressair uns em relação aos outros. Finalmente, fazendo uso de uma correta ampliação, resolução e contraste, é possível ao utilizador fazer medições precisas, válidas e reprodutíveis do objeto em estudo.

Num microscópio de luz visível, os raios de luz da fonte de iluminação são concentrados, sobre o espécime a observar, através de uma lente condensadora, Fig. 1.1. Os raios luminosos que atravessam o espécime são focados, numa imagem ampliada, por duas lentes colocadas nas extremidades opostas do tubo ou canhão, Fig. 1.1. A lente mais perto do espécime é designada objetiva e a da extremidade oposta a ocular. Com o auxílio de parafusos de ajuste grosseiro e/ou fino é possível mover o espécime de molde a colocá-lo na posição correta para se poder focar. A posição do condensador pode ser igualmente ajustada por forma a convergir a luz sobre o espécime, Fig. 1.1.

A resolução de um microscópio depende de dois fatores: 1) do comprimento de onda da radiação empregue ( $\lambda$ ) e 2) da abertura numérica da objetiva (que condiciona o grau de luminosidade).

O poder de resolução ou separação do olho humano varia de pessoa para pessoa. Normalmente, a uma distância de trabalho de 25cm, está apto a resolver dois pontos que distem, entre si 0,25mm. Quando a distância entre os dois pontos é superior, distingue-se o espaço entre eles; quando é inferior, os dois pontos aparecem como um só.

Como o olho humano não deteta luz com comprimento de onda inferior a 400nm, não é possível, recorrendo ao microscópio ótico, obter uma resolução superior a 0,17  $\mu$ m. Isto quer dizer que, com o microscópio, não se distinguem, separadamente, dois pontos cuja distância entre si seja inferior a 0,2  $\mu$ m (na prática, o limite de resolução do microscópio ótico é de cerca de 0,5  $\mu$ m).

Do ponto de vista experimental, não é possível distinguir dois pontos cuja distância entre eles seja inferior a metade do comprimento de onda da radiação utilizada.

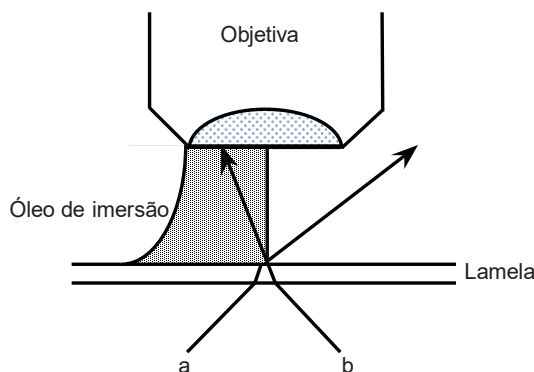


Fig. 1.2. Abertura da objetiva. a) Empregue a seco. b) Empregue com imersão num líquido com índice de refração idêntico ao do vidro ( $n=1,51$ ). Os fotões não sofrem refração pelo que o ângulo do cone útil é superior ao de a).

O outro fator, que afeta o poder de resolução do microscópio, é a abertura numérica da objetiva. Quando uma objetiva possui uma lente frontal (lente da objetiva que fica mais próxima da platina) de pequenas dimensões e elevado poder de ampliação, a quantidade total de luz que a atravessa é muito inferior à que atravessaria a lente frontal de uma objetiva de menor poder de ampliação. Adicionalmente, quando se trabalha com lentes de maior poder de ampliação, a distância de trabalho (distância entre a lente frontal e a lamela que cobre o objeto em foco) é inferior à utilizada para objetivas de menor poder de ampliação. Por outro lado, como a luz é refratada pela camada de ar existente entre a lâmina e a objetiva, o ângulo do cone de luz útil que atinge a objetiva é menor do que seria se esse fenómeno não se verificasse, Fig. 1.2. Daí resulta a perda de luminosidade observada quando, por exemplo, se passa da objetiva de 40x para a de 100x. Este problema pode ser obviado se se utilizar, entre a lâmina e a objetiva, uma substância transparente (normalmente óleo de cedro) com índice de refração idêntico ao do vidro da lâmina. Quando se procede à imersão da objetiva num líquido com índice de refração  $\approx 1,51$ , os raios que atravessam a preparação não são refratados, o que determina um maior ângulo do cone de luz útil, Fig. 1.2. O poder de separação do microscópio é, neste caso, superior, como pode verificar-se pela fórmula de Abbe:

$$\text{Limite de resolução } (\epsilon) = 0,6 \cdot \lambda / n \cdot \sin \mu \quad \text{em que:}$$

$\lambda$  é o comprimento de onda, que, para a luz visível, é 0,4 a 0,7  $\mu\text{m}$ , isto é, para o microscópio ótico o  $\lambda$  é constante e  $\approx 0,5$ ,

**0,6** é uma constante que reflete o grau de sobreposição de dois pontos que ainda podem ser visualizados separadamente,

**$n \cdot \sin \mu$**  é a abertura numérica da objetiva (numa boa objetiva o seu valor é de 1,4),

**$n$**  é o índice de refração do meio = velocidade no ar / velocidade no material

ex. Índice de refração do vidro = Velocidade da luz no ar / velocidade da luz no vidro =  $300000 \text{ km.s} / 200000 \text{ km.s} = 1.5$

ar = 1,0; água = 1,33; vidro = 1,5; óleo = 1,51 ou bálsamo do Canadá = 1,53

**$\mu$**  é o semiângulo com vértice no cone formado pelos raios, que saindo da preparação, atingem

a lente frontal da objetiva e depende da largura da lente e da sua distância ao espécime (numa boa objetiva o seu valor é de  $70^\circ$ , o que dá um  $\text{sen } \mu \approx 0,94$ ).

A ótica dos microscópios pode criar artefactos de imagem designados por aberrações, que podem ser de dois tipos: cromáticas e esféricas. A aberração cromática deve-se ao diferente grau de refração dos diversos componentes da luz, de tal modo que se criam orlas coloridas na extremidade do material, Fig. 1.3A. A aberração esférica é uma consequência dos diferentes ângulos dos raios luminosos emergentes da lente, Fig. 1.3B. Ambos os tipos de aberrações são corrigidos por um conjunto de lentes existentes no interior da objetiva, destinadas a compensar aberrações específicas (por ordem de complexidade crescente de correção: lentes acromáticas, de fluorite e apocromáticas).

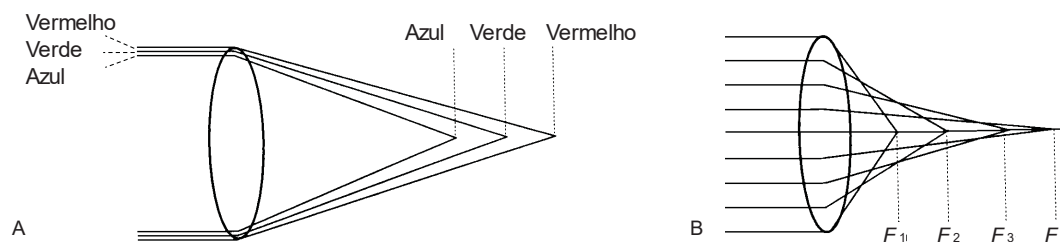


Fig. 1.3. Tipos de aberrações: cromática (A) e esférica (B).

Diferentes tipos de microscópios óticos são correntemente utilizados no estudo de vários aspetos da estrutura celular, o mais simples dos quais é o microscópio de campo claro. O grau de visibilidade depende, neste caso, da capacidade do material refratar a luz diferentemente do meio circundante, Fig. 1.8. A visibilidade do material é, correntemente, designada por contraste, isto é, o aspeto diferente apresentado por zonas adjacentes do material, ou entre o material e o meio de montagem.

Uma das maneiras mais eficazes de tornar um material, naturalmente fino e translúcido, visível em microscopia ótica, é corá-lo com reagentes que absorvem só determinados comprimentos de onda dentro do espectro do visível. Os comprimentos de onda que não são absorvidos são transmitidos ao observador, de tal modo que o material aparece corado. Diferentes reagentes marcam diferentes moléculas biológicas e, como tal, não só aumentam a visibilidade do material, como podem também indicar onde certos constituintes se encontram nas células ou nos tecidos, isto é, permitem fazer uma caracterização histoquímica.

A utilização destes reagentes põe, no entanto, um grande problema: na sua maioria não podem ser utilizados em células vivas. Isto deve-se a vários fatores: em muitos casos a sua utilização pressupõe uma fixação prévia do material, com álcool, ácido acético ou formaldeído, para preservar as estruturas celulares; os reagentes são, normalmente, tóxicos, mesmo a baixas concentrações; as condições de reação não preservam a integridade celular (alguns reagentes não penetram a membrana celular e requerem aquecimento e/ou um tratamento prévio em ácido para facilitar a penetração). Um número reduzido de reagentes, designados corantes vitais, preservam a integridade celular, mas são, contudo, de utilização limitada.

Nas condições experimentais em que não se deve alterar a viabilidade celular, é possível recorrer a diferentes tipos de microscópios óticos que convertem as variações de densidade ou espessura entre zonas adjacentes do material em diferenças de contraste, que aumentam a qualidade da imagem final.



## 1.2. Tipos de Microscópio Ótico

Embora muitas regiões do material biológico não corado sejam transparentes, elas possuem diferentes densidades e, conseqüentemente, índices de refração diferentes. Assim, os raios luminosos atravessam estas regiões a velocidades muito diversas, sofrendo refrações em diferente grau, Fig. 1.4. Existem, deste modo, diferenças nítidas entre as fases dos raios luminosos que atravessam um objeto e as dos que passam junto aos seus bordos, ou seja, na interface onde se verifica a alteração do índice de refração. Na prática, os raios luminosos que passam pelos componentes celulares de maior índice de refração, são retardados cerca de  $1/4$  de comprimento de onda, e são mais refratados que os raios luminosos que atravessam componentes com menor índice de refração.

Existem diferentes tipos de microscópios óticos, de aplicações várias, que tiram partido de fontes luminosas e modos de formação de imagem diversos.

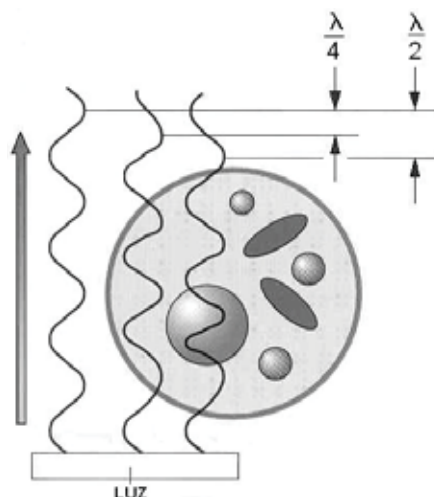


Fig. 1.4. Os raios luminosos são retardados diferentemente ao passarem pelos vários constituintes celulares.

### 1.2.1. Microscópio de fundo escuro

No microscópio de fundo escuro existe um condensador especial, com um disco opaco na sua zona central, que orienta a luz de forma oblíqua, Figs. 1.5 e 1.8. Assim, a luz só atinge as lentes da ocular se for desviada pelo objeto em observação. Daqui se infere que só os objetos com índice de refração diferente do do meio circundante farão chegar a luz à ocular, isto é, neste método a periferia do objeto aparece brilhante sobre um campo escuro circundante.

Refira-se, a título de exemplo, que microtúbulos com um diâmetro de 25nm podem ser visualizados por este processo, e que as bactérias aparecem, neste microscópio, como pequenos pontos brilhantes em fundo escuro. Também cristais, grânulos de prata e paredes celulares, entre outros, podem ser visualizados deste modo, mas porque as poeiras também refletem a luz, as lâminas têm de estar particularmente limpas e isentas de riscos.

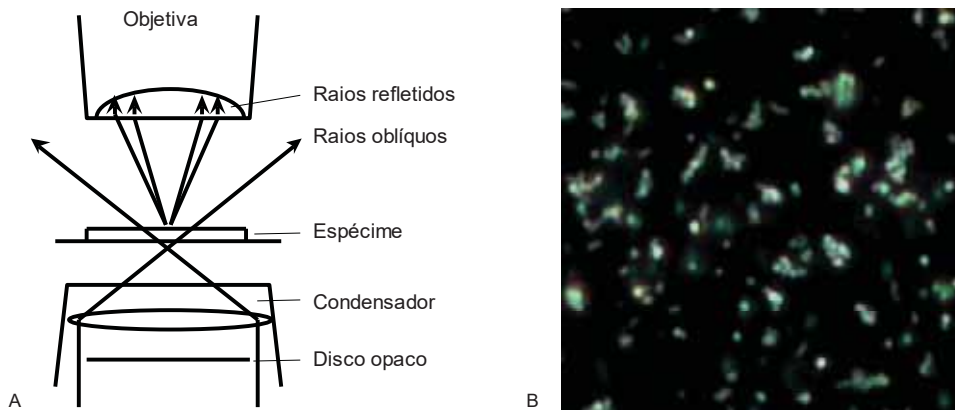


Fig. 1.5. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do microscópio de fundo escuro (A) e observação de bactérias com o microscópio de fundo escuro (B).

### 1.2.2. Microscópio de contraste de fase

O microscópio de contraste de fase permite uma melhor observação de espécimes sem qualquer coloração porque converte as diferenças de índice de refração dos diversos constituintes celulares, Fig. 1.4, em diferenças de intensidade luminosa visíveis ao microscópio. Este tipo de microscópio possui um condensador especial provido com uma placa circular com diversos anéis, Figs. 1.6 e 1.8. Os anéis são de vidro opaco, mas incluem um anel central de vidro transparente que permite a passagem dos raios luminosos menos refratados. Os anéis de vidro opaco têm um revestimento e uma espessura tal que retardam, adicionalmente, os raios mais refratados de  $1/4$  de comprimento de onda. Tais diferenças acentuam o contraste entre o objeto em observação e o meio circundante.

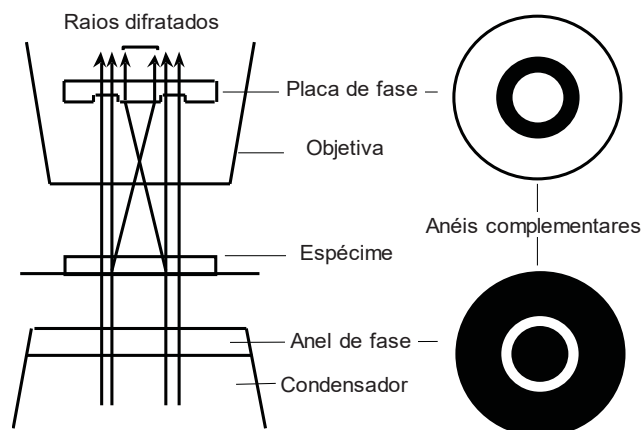


Fig. 1.6. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do microscópio de contraste de fase.

### 1.2.3. Microscópio de interferência ou de Nomarski

A microscopia de Nomarski (equivalente a DIC, *differential interference contrast*), é uma técnica excelente para observar material biológico, não só pelo elevado contraste conseguido, mas também pela tridimensionalidade que se obtém. Uma outra vantagem deste tipo de microscopia é a de permitir observar materiais mais espessos, sem colocar os mesmos problemas que a microscopia de contraste de fase, Figs. 1.7 e 1.8.

Este microscópio utiliza luz polarizada e dois filtros separadores de modo que produz efeitos de sombra que dão particular relevo às extremidades das diferentes estruturas do material (membranas, núcleo, organitos, parede celular, etc.). Outra característica interessante deste microscópio é que os objetos podem aparecer corados, mesmo sem coloração prévia e apesar de se utilizar luz branca na iluminação.

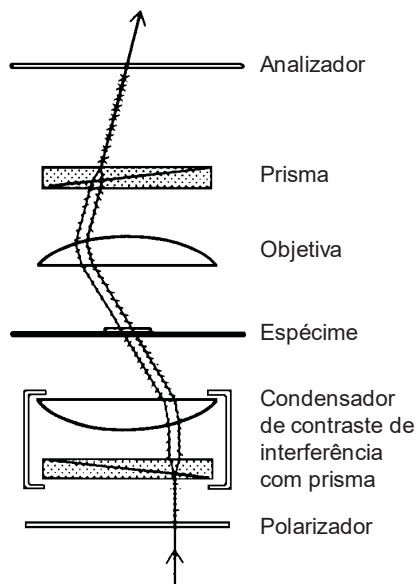


Fig. 1.7. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do microscópio de contraste de Nomarski.

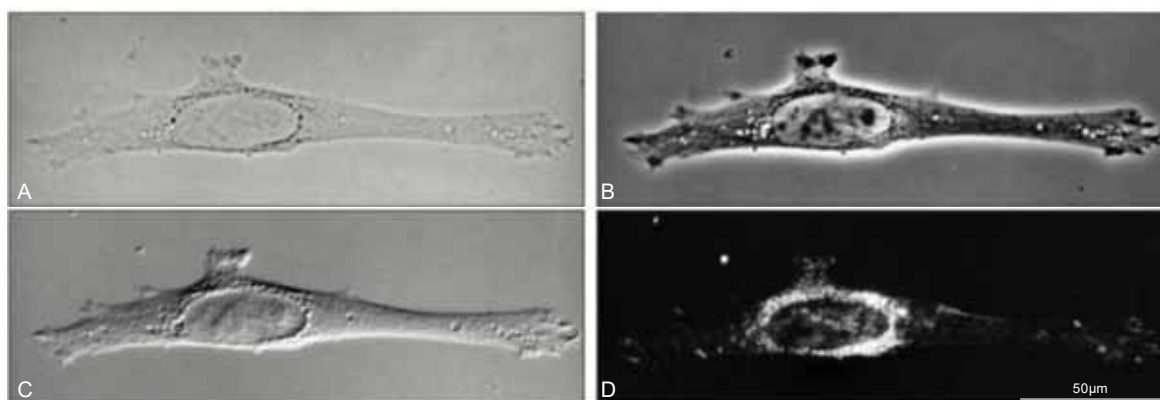


Fig. 1.8. Comparação de imagens obtidas com um microscópio ótico de fundo claro (A), com contraste de fase (B), com contraste de Nomarski (C) e de fundo escuro (D).

#### 1.2.4. Microscópio de fluorescência

Neste microscópio utiliza-se uma lâmpada de mercúrio de elevada pressão que emite radiação entre 600nm e 300nm, Figs. 1.9 e 1.11. Na zona frontal da lâmpada está colocado um sistema de filtros, que permite selecionar o comprimento de onda desejado (ultravioleta, azul ou verde). Depois de passar pelos filtros, a luz de comprimento de onda selecionado, atinge um espelho especial, espelho dicroico, que tem a propriedade de refletir a luz de determinados comprimentos de onda e transmitir outros. Este espelho reflete a luz selecionada, que incide depois no

espécime. As substâncias fluorescentes emitem luz num comprimento de onda mais longo, que atravessa o espelho, e atinge a objetiva (ex. um espelho dicróico de 420nm reflete toda a luz azul e UV, mas é atravessado por luz de comprimentos de onda superiores - fluorescência verde, amarela e vermelha). Para que a luz ultravioleta se possa propagar, é necessário que os condensadores da lâmpada e do microscópio sejam de quartzo. Em alguns casos convém, igualmente, utilizar porta-objetos de quartzo.

Com este tipo de microscópio pode detetar-se a presença de substâncias que emitam luz visível quando irradiadas com luz ultravioleta. Muitas substâncias podem manifestar fluorescência natural, designada autofluorescência. Outras há, porém, que, para se detetar a sua presença, é necessário fazê-las reagir com compostos fluorescentes (ou tornados fluorescentes após reação), os fluorocromos. Neste caso, a fluorescência é induzida.

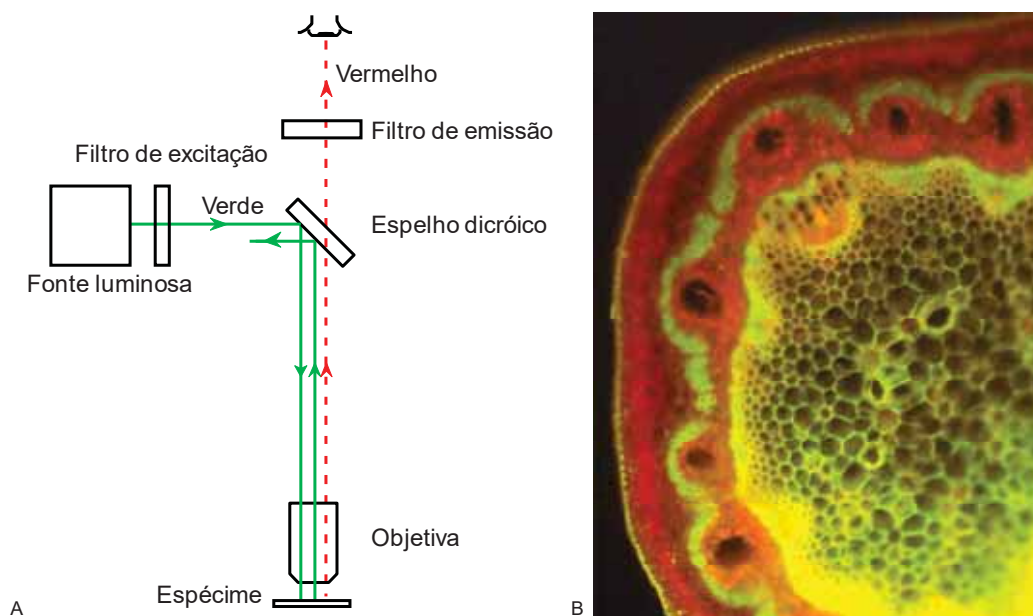


Fig. 1.9. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do microscópio de fluorescência (A). A cheio representa-se o exemplo de luz seleccionada (verde). A tracejado representa-se a luz de maior comprimento de onda emitida pelo espécime (vermelho). Corte transversal de um caule observado com microscópio de fluorescência (B).

### 1.2.5. Microscopia confocal

As células são, em muitos casos, suficientemente delgadas para serem consideradas aproximadamente bidimensionais, requerendo, como tal, uma capacidade de foco reduzida para observar tudo o que há para ver. Contudo, quando se está interessado nas inter-relações das estruturas celulares é necessário obter uma informação tridimensional. Há dois métodos de obter este tipo de imagem em microscopia. Um corresponde a cortar fisicamente o material em secções finas, observar cada uma delas, e juntar as imagens obtidas para reconstruir a estrutura no seu todo. O outro, desenvolvido mais recentemente, corresponde a uma reconstrução de secções óticas, que utiliza a microscopia confocal. Com este segundo método é possível observar, não só secções finas, mas também células vivas.

O microscópio confocal permite obter imagens permanentemente em foco, em qualquer plano focal, dum espécime com uma espessura até cerca de 100µm, Figs. 1.10 e 1.11. Este tipo de microscopia é, regra geral, utilizado com espécimes marcados com fluorocromos.

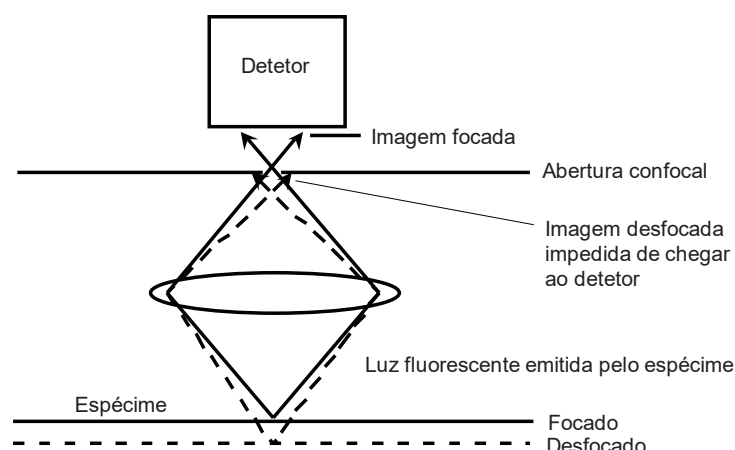


Fig. 1.10. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do microscópio confocal.

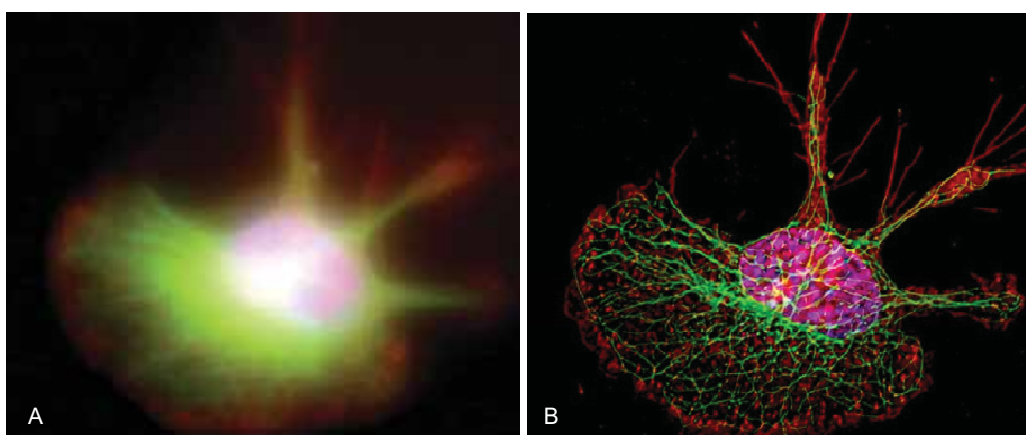


Fig. 1.11. Comparação das imagens obtidas com microscópio de fluorescência convencional (A) e microscopia confocal (B).

Os microscópios confocais fazem um varrimento do espécime com um feixe de luz pontual focado, através duma objetiva, a uma profundidade selecionada. A luz, emitida pelas moléculas fluorescentes do espécime, regressa através da objetiva e é filtrada da luz incidente por um mecanismo idêntico ao do microscópio de fluorescência. Contudo, antes que a luz atinja o detetor passa por uma abertura regulável, que está colocada exatamente na vertical em relação ao plano de foco do feixe de luz pontual. Deste modo impede-se que qualquer outra luz, que não a emitida pelo espécime no plano de foco, chegue ao detetor. Através dum controlo motorizado, podem recolher-se diferentes secções óticas que são armazenadas num computador e posteriormente processadas para formar uma imagem tridimensional.

### 1.3. Como utilizar o microscópio

A metodologia que a seguir se descreve é o método básico de manuseamento do microscópio ótico de luz transmitida, adaptado à observação da maioria dos espécimes, desde que tenham sido corados ou possuam contraste ou cor suficientes. Esta metodologia foi primeiramente descrita, no início deste século, por August Köhler, tendo como objetivo obter um bom campo de

visão com uma iluminação homogênea. Por este motivo é muitas vezes designada como iluminação de Köhler.

### *Focagem*

1. Coloque a preparação na platina, com a lamela virada para cima, e, com o auxílio dos parafusos de movimento da sobre-platina, desloque o objeto a observar para o centro da abertura da platina.

2. Comece por observar a preparação com a objetiva de menor ampliação. Com o auxílio dos parafusos macrométricos aproxime, o mais possível, a objetiva da lamela, tendo o cuidado de evitar o contacto entre ambas. Para focar o objeto, proceda, de forma lenta, ao movimento inverso, controlando a observação através da ocular. Logo que obtenha uma imagem suficientemente nítida, retifique a focagem com os parafusos micrométricos.

### *Alinhamento do Microscópio*

1. Foque a preparação.
2. Feche o diafragma da fonte luminosa, de molde a observar um pequeno círculo.
3. Centre o círculo com os parafusos do condensador.
4. Desloque o condensador na vertical de molde a obter os bordos do diafragma, que delimitam o círculo, perfeitamente focados.
5. Não altere a posição do condensador para a objetiva alinhada. No decurso da observação, ajuste a quantidade de luz abrindo ou fechando o diafragma do condensador.

**Nota:** Depois de utilizar o microscópio não se esqueça de:

- 1) desligar a luz;
- 2) levantar o canhão do microscópio e colocar a objetiva de menor ampliação alinhada com o orifício da platina;
- 3) limpar a platina e as objetivas (se tiver utilizado óleo de imersão, limpe a objetiva com solução adequada)
- 4) tapar o microscópio.

## **1.4. Medições em preparações microscópicas**

As observações em microscopia envolvem muitas vezes a medição do objeto de estudo. A medição pode ser realizada após calibração, de cada objetiva, com auxílio de uma ocular e uma escala (objetiva micrométrica), Fig. 1.12.

### *Calibração da ocular*

1. Coloque a ocular micrométrica em posição no tubo do microscópio e instale a objetiva micrométrica na platina do microscópio.

3. Rode a ocular micrométrica de molde a que as escalas da objetiva e da ocular fiquem paralelas e se sobreponham parcialmente, Fig. 1.12.

4. Desloque a objetiva micrométrica para que o início da graduação das duas escalas se sobreponha (0 e 0,0), Fig. 1.12.

5. Tendo os zeros sobrepostos, verifique em que outro ponto do campo as duas escalas se sobrepõem igualmente. No exemplo da Fig. 1.12, verifica-se que 70 divisões da ocular micrométrica correspondem exatamente a 0,4mm (= 400µm) da objetiva micrométrica, i. e., 1 graduação =  $400\mu\text{m} / 70 = 5,7\mu\text{m}$ . Este valor só é válido para a objetiva utilizada, sendo pois

necessário proceder à calibração para cada uma das outras objetivas.

6. Para a medição de um objeto desconhecido, determina-se primeiro o número de divisões (por ex. 4) e multiplica-se pelo valor micrométrico previamente determinado (por ex. 5,7), obtendo-se a dimensão de 22,8 $\mu$ m.

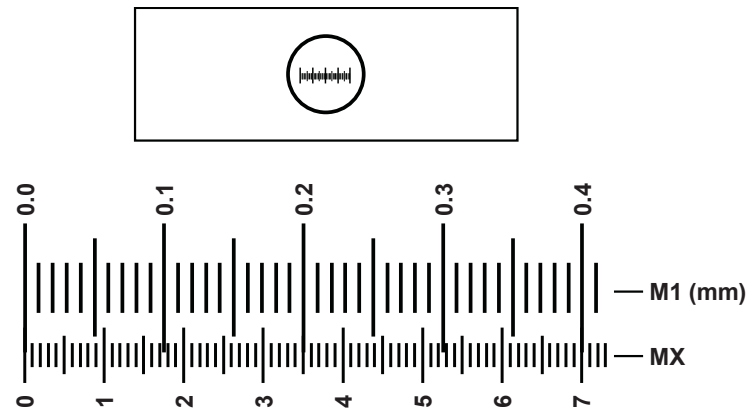


Fig. 1.12. Representação esquemática da calibração da ocular com auxílio de uma ocular e objetiva micrométricas. M1: escala (da objetiva micrométrica). Mx: escala da ocular micrométrica a calibrar.

### Exercício

Com base na calibração da ocular da Fig. 1.13A calcule o comprimento do estoma da Fig. 1.13B.

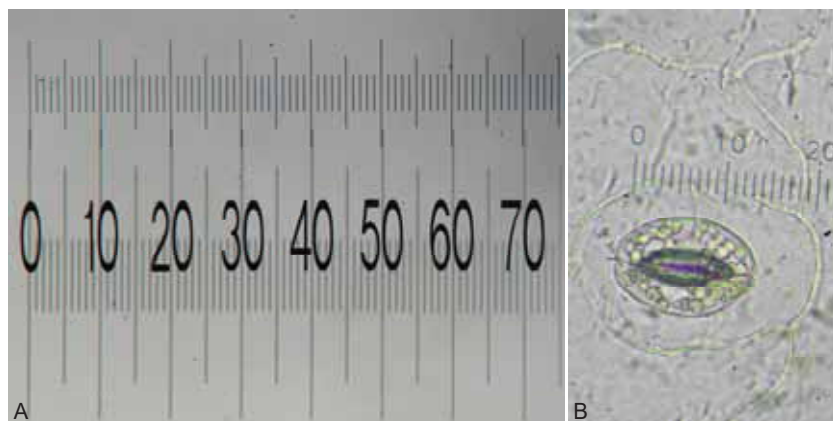


Fig. 1.13. Calibração da ocular micrométrica (em cima) com auxílio de uma objetiva micrométrica (em baixo) (A), e medição do comprimento de um estoma com a ocular micrométrica (B).



## 2. DIVERSIDADE CELULAR

As células são as unidades estruturais e funcionais de todos os seres vivos.

A síntese proteica, regulada pelos ácidos nucleicos, foi, sem sombra de dúvida, um acontecimento crucial, que levou à formação da primeira célula. Por outro lado, o aparecimento de membranas semipermeáveis possibilitou a compartimentação celular, tanto do ponto de vista físico como funcional. Um outro marco importante no processo evolutivo foi o DNA tomar o lugar do RNA como material hereditário.

Crê-se que todos os organismos e todas as células que os constituem tenham evoluído de um ancestral comum. A evolução poder-se-á ter dado por dois processos:

1. Variação ao acaso da informação genética que passou de um indivíduo aos seus descendentes;
2. Seleção da informação genética que permitiu aos seus utentes a sobrevivência e a propagação.

Durante muitas centenas de anos, os biólogos classificaram os organismos vivos em apenas dois grupos: animais e vegetais. Com o desenvolvimento dos microscópios, tornou-se evidente que muitos organismos não se encaixavam bem nem no grupo dos animais, nem no grupo dos vegetais. Por exemplo, não só as bactérias não podem ser consideradas plantas, como organismos como as *Euglenas* apresentam características tanto de plantas como de animais. Com efeito, muitos organismos unicelulares têm entre si mais características em comum, do que com os animais ou as plantas. Este tipo de observações levou à criação de um sistema de classificação, proposto por Whittaker em 1969, que contemplava 5 reinos (Procariotas: Reino Monera; Eucariotas: Reino Protista, Reino Plantae, Reino Animalia, Reino Fungi). Este sistema de classificação não inclui vírus, viroides ou príões, já que não se tratam de formas de vida celulares. Com a descoberta de tecnologias que permitiram a sequenciação e comparação da informação genética das células - nas décadas de 1970-1980 - foi possível estabelecer as relações evolutivas entre os organismos, ou seja, a sua filogenia, na forma de árvores filogenéticas. Carl Woese foi pioneiro no uso de RNA ribossomal (rRNA), existente em todos os tipos celulares, para medir a divergência evolutiva entre organismos. O principal resultado foi a descoberta da existência de duas categorias de procariotas fundamentalmente distintas, o que levou à proposta em 1990 de um sistema natural de classificação dos organismos em três linhagens evolutivas / domínios: *Bacteria* e *Archaea* (ambos com células procarióticas) e *Eukarya* (eucariotas), Tabela 2.1, Fig. 2.1.

Tabela 2.1. Comparação entre domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.

Característica	Domínio		
	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>
Invólucro nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Organitos membranados	Poucos	Ausentes	Muitos
Peptidoglicanos na parede celular	Presentes	Ausentes	Ausentes
Lípidos membranares	Ligação éster Não ramificado	Ligação éter Ramificado	Ligação éster Não ramificado
Ribossomas	70S	70S)	80S
Iniciador tRNA	Formilmetionina	Metionina	Metionina
Operões	Presentes	Presentes	Raros
Plasmídeos	Presentes	Presentes	Raros
Número de RNA polimerases	Uma	Uma	Três
Ribossomas sensíveis ao cloranfenicol e estreptomicina	Sim	Não	Não
Ribossomas sensíveis à toxina da difteria	Não	Sim	Sim



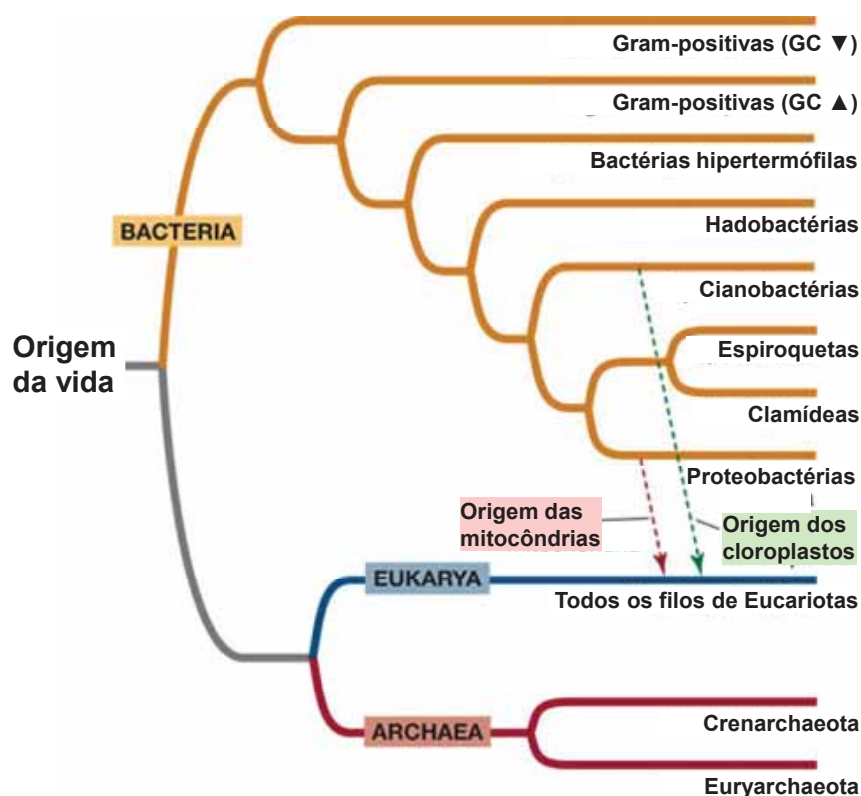


Fig. 2.1. Sistema natural de classificação dos organismos em três linhagens evolutivas (adaptado de Sadava et al. 2012). GC: teor em guanina/citosina.

## 2.1. Procariotas

Os procariotas dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, compreendem as células atuais com características mais primitivas e, por conseguinte, menos complexas. Estes organismos não apresentam compartimentação celular. Ao contrário do que acontece com as células eucariotas, o seu material genético localiza-se num corpo irregular, nucleóide, não rodeado por invólucro nuclear.

Nos procariotas incluem-se as *Archaea* (termoacidófilas, metanogénicas e halófilas) e *Bacteria* (bactérias fotossintéticas, saprófitas ou parasitas, cianobactérias e micoplasmas).

Os procariotas encontram-se nos mais diversos ambientes naturais. Apesar da sua simplicidade, as espécies existentes são capazes de, virtualmente, metabolizar qualquer composto bio-orgânico (açúcares simples, polissacáridos, aminoácidos, proteínas, lípidos e hidrocarbonetos). Muitos conseguem utilizar o CO<sub>2</sub> e o N<sub>2</sub> atmosféricos como fontes de carbono e azoto, respetivamente. Estas características conferem aos procariotas uma enorme aptidão para explorar os diversos nichos ecológicos. Por essa razão, são o tipo celular mais abundante à superfície da terra e nos oceanos.

Apesar de serem frequentemente mencionadas como patogénicas, só uma minoria das espécies conhecidas é realmente responsável por doenças. Muitas mais espécies têm um papel positivo nas nossas vidas e na biosfera: participam nos processos digestivos dos animais, no processamento do azoto e enxofre do solo, como decompositores, e têm ainda um papel importante em muitos processos industriais e agrícolas.

Os procariotas apresentam formas muito diversas, mas a maioria das espécies mais abundantes incluem-se em uma de três categorias, Fig. 2.2:

1. *Bacillus* (em bastonete)
2. *Coccus* (esféricas)
  - Diplococcus* (aos pares)
  - Streptococcus* (em rosário)
  - Staphylococcus* (em agregados)
3. *Spirillus* (em hélice)

Algumas espécies de procariotas possuem flagelos para se locomoverem. Neste caso os flagelos não são formados por microtúbulos envolvidos por membrana plasmática, como acontece nos eucariotas. São formados por uma única fibrilha de flagelina, de natureza proteica, Fig. 2.3.

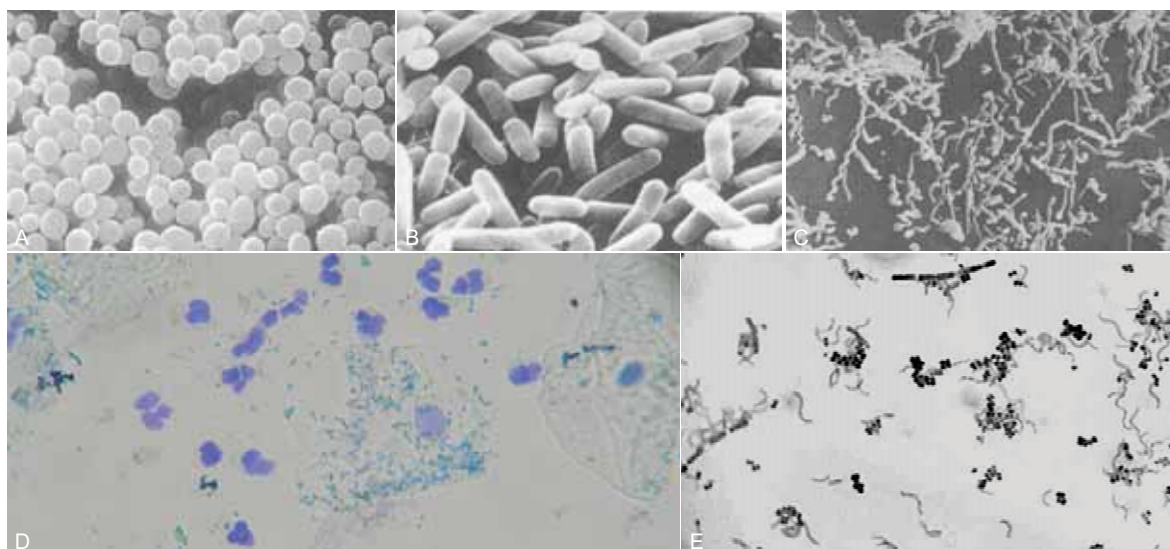


Fig. 2.2. Diferentes formas de procariotas, *Coccus* (A), *Bacillus* (B) e *Spirillus* (C) em microscopia de varrimento (A-C) e em microscopia ótica (D-E).

Os procariotas reproduzem-se, normalmente, por bipartição (reprodução assexuada), mas, em determinadas circunstâncias, podem reproduzir-se por parassexualidade. Nestes casos existe apenas cariogamia. O material genético não passa na sua totalidade de uma bactéria para a outra, pelo que se forma um merozigoto (zigoto parcial).

Algumas formas procariotas têm a capacidade de formar endósporos ou células de resistência. Os endósporos são extremamente resistentes ao calor, radiações e desinfetantes químicos, sobretudo porque o protoplasma está altamente desidratado.

Os procariotas apresentam uma enorme diversidade metabólica, podendo ter vida livre, ser parasitas ou simbioses. Podem ainda ser autotróficos ou heterotróficos. Quanto aos autotróficos, estes podem ser fotossintéticos ou quimiossintéticos.

As bactérias fotossintéticas utilizam a luz como fonte de energia, que captam através de um pigmento, a bacterioclorofila. O pigmento está localizado em estruturas membranares que de alguma forma se assemelham aos tilacoides das plantas superiores. Estas bactérias não libertam oxigénio na fotossíntese porque, em vez da água, utilizam, como molécula redutora, um composto orgânico ou mineral.

Os procariotas quimiossintéticos utilizam diversos compostos como fonte de energia. São de destacar os que promovem a mineralização do azoto orgânico através da nitrificação

(*Nitrosomonas*) e da nitratação (*Nitrobacter*).

Nos procariotas heterotróficos incluem-se os saprófitos, os parasitas e os simbiontes. Neste último grupo encontram-se algumas Azobactérias, como o *Rhizobium*, que fixam o azoto atmosférico.

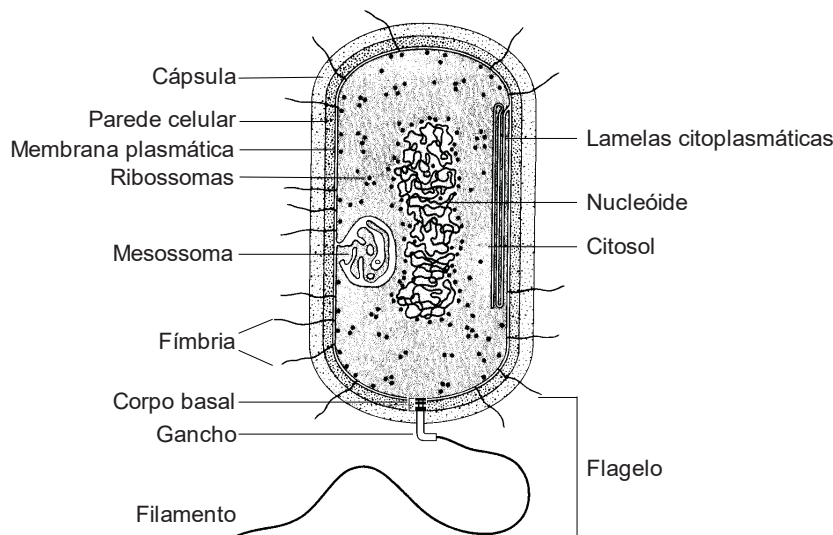


Fig. 2.3. Representação esquemática generalizada da estrutura de uma bactéria.

As *Bacteria* possuem uma parede celular que difere quimicamente da dos vegetais superiores por possuir um peptidoglicano, também designado mureína, mucopéptido ou glicopéptido. Esta macromolécula que se encontra apenas nos procariotas, consiste em dois tipos pouco usuais de açúcares (acetilglucosamina e ácido acetilmurâmico) ligados a pequenos péptidos. Os esqueletos de polissacáridos adjacentes mantêm-se ligados por pequenas sequências de aminoácidos, Fig. 2.4. A composição da parede celular bacteriana está na base da classificação histoquímica das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas.

Hans Christian Gram, bacteriologista Dinamarquês, desenvolveu, por volta de 1800, a chamada técnica de Gram que permite classificar as bactérias em um de dois grupos: Gram-positivas ou Gram-negativas. A base química desta reação permanece mal conhecida. Após fixação pelo calor, as células são coradas com violeta de cristal e iodo, e depois sujeitas à ação de um solvente orgânico. As bactérias Gram-positivas, resistentes à descoloração, mantêm a coloração azul-violeta, enquanto as Gram-negativas a perdem rapidamente. Seguidamente efetua-se uma coloração com safranina para tornar visíveis as Gram-negativas. A coloração é acumulada no interior da célula e não a nível da parede celular. A natureza desta última parece de algum modo impedir a remoção do corante violeta de cristal e iodo. A diferença pode ser simplesmente devido à espessura da parede das Gram-positivas ser muito superior à das Gram-negativas, retardando assim a remoção do corante. Por outro lado, a parede das Gram-positivas tem uma maior percentagem de peptidoglicanos e apenas 1-4% de lípidos, enquanto a parede das Gram-negativas tem uma menor percentagem de peptidoglicanos e 11-22% de lípidos. Os micoplasmas, que não têm parede celular, e as *Archaea*, que não têm peptidoglicanos não são corados pela reação de Gram.

A capacidade de resistir à descoloração pelo etanol ou acetona parece ser dependente da idade das bactérias. Com efeito, verifica-se que enquanto algumas bactérias jovens se comportam como Gram-positivas, as bactérias mais velhas da mesma espécie podem perder a capacidade de

reter a coloração e, portanto, comportam-se como Gram-negativas. Como tal, a reação positiva tem mais valor do que a reação negativa, já que esta última pode ser devida à idade da cultura ou excessiva descoloração com o solvente.

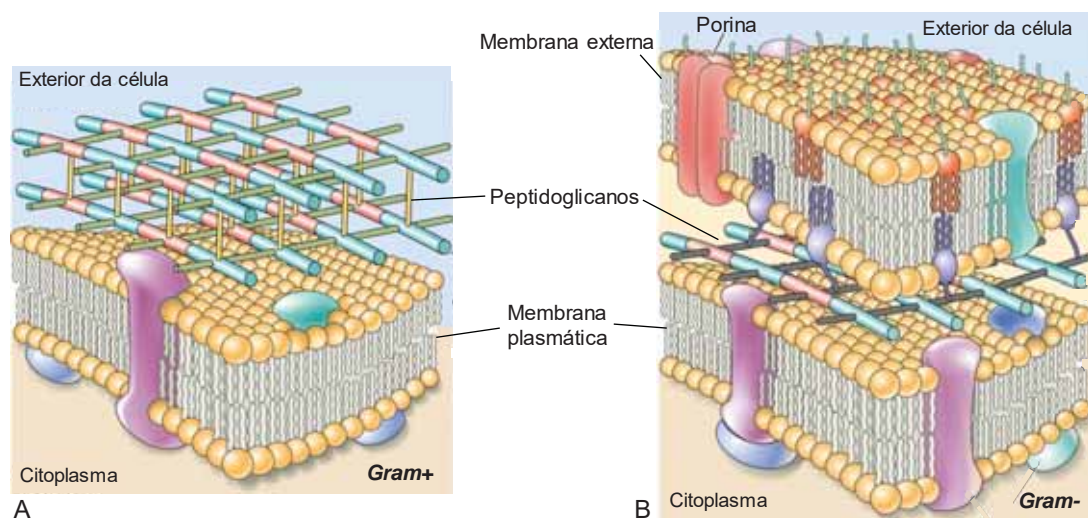


Fig. 2.4. Representação simplificada da composição da parede celular das bactérias Gram-positivas (A) e Gram-negativas (B).

Em Microscopia Eletrónica verifica-se que existem grandes diferenças na ultra estrutura da parede celular dos dois tipos de bactérias. A das Gram-positivas consiste numa única camada relativamente espessa, composta de peptidoglicanos e moléculas de ácido teicóico que se projetam para o exterior. A parede das Gram-negativas tem duas camadas, a interna de peptidoglicanos e, a mais externa, é uma membrana celular externa (com porinas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas). O espaço entre a membrana plasmática e a membrana externa é designado espaço periplasmático. A existência da membrana externa funciona como uma barreira adicional que protege a célula contra o ataque de enzimas, antibióticos e detergentes.

As bactérias Gram-negativas apresentam maior sensibilidade às penicilinas e às sulfamidas devido, possivelmente, à presença da camada adicional de lipopolissacarídeos e proteínas hidrófobas.

### 2.1.1. Bacteria

As *Bacteria* constituem um grupo diverso, com cerca de 80 linhagens / filos / divisões, que vai dos organismos autotróficos quimiossintéticos termófilos extremos, que oxidam o hidrogénio ou reduzem compostos com enxofre, a autotróficos fotossintéticos, representados pelas cianobactérias e pelas bactérias verdes e roxas. As cianobactérias serão as únicas referidas pela sua importância.

#### *Cianobactérias*

As Cianobactérias representam, atualmente, a maior via de entrada de carbono e azoto na biosfera. Estes organismos são os mais autossuficientes que existem na atualidade, podendo viver em apenas ar e água, fazendo apelo a mecanismos que parecem ter permanecido constantes desde há cerca de 2700 milhões de anos. São também dos mais abundantes organismos na Terra com uma biomassa estimada em cerca de mil milhões de toneladas (peso

fresco).

A diversidade morfológica deste grupo é muito grande e serve de base à taxonomia. Consideram-se em geral cinco grupos morfológicos: (1) unicelulares, com divisão por fissão binária/ bipartição; (2) unicelulares formando colónias, com formas e arranjo das células muito variados; (3) filamentos simples (tricomas), que podem diferenciar células designadas heterocistos/heterócitos; (4) filamentos simples, sem diferenciação de heterocistos; e (5) filamentos com verdadeiras ramificações. Estes agrupamentos morfológicos correspondem em geral a linhagens evolutivas distintas, com exceção das unicelulares que são muito diversas / polifiléticas. Em muitos casos existe uma bainha gelatinosa a envolver as células, ou os filamentos (tricomas), facilmente visualizável por montagem em tinta-da-china.

Ao contrário das bactérias fotossintéticas, as cianobactérias efetuam fotossíntese aeróbia, isto é, com libertação de oxigénio, em que o  $\text{CO}_2$  é fixado por formas de RuBisCO (Ribulose-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase) idênticas às presentes nos cloroplastos de células eucarióticas. No seu citoplasma, as cianobactérias possuem membranas citoplasmáticas idênticas aos tilacoides onde existe sempre clorofila *a* - ligada aos dois tipos de centros de reação (fotossistemas I e II) - e dois tipos de complexos de antena com pigmentos acessórios. Na maioria das vezes, estes são ficobilinas, principalmente ficocianina (azulada), e por vezes também ficoeritrina (avermelhada), formando estruturas granulares, os ficobilissomas, que se encontram acoplados à membrana externa dos tilacoides, em contacto com as proteínas e citocromos transmembranares do fotossistema II (PS II  $\rightarrow$  libertação de  $\text{O}_2$ ). Refira-se, a título de curiosidade, que o mar vermelho deve esta designação à predominância de cianobactérias, com ficoeritrinas, do género filamentoso *Trichodesmium* que forma florescimentos superficiais muito extensos e visíveis. Em algumas cianobactérias não existem ficobilissomas e o pigmento acessório é a clorofila *b*. Neste caso inclui-se, por exemplo, *Prochlorococcus* que é uma importante componente do picoplâncton dos oceanos apesar de só ter sido descoberta em 1988. Estima-se que *Prochlorococcus* produza cerca de 1/5 do total de oxigénio atmosférico. De realçar ainda a presença de uma substância de reserva de natureza proteica, a cianoficina, exclusiva deste grupo, e de amido cianofício, semelhante ao glicogénio dos animais e dos fungos.

Em alguns géneros filamentosos observa-se a presença de heterocistos. Os heterocistos são células diferenciadas a partir de células vegetativas normais, de maiores dimensões e de parede espessa que aparecem intercaladas, ou terminais, nos tricomas (filamentos). Estas células são as responsáveis pela fixação do azoto atmosférico e a sua diferenciação é desencadeada em resposta concentrações baixas de azoto orgânico (não atmosférico) no ambiente. A diferenciação dos heterocistos é um processo complexo, onde são ativados e/ou desativados milhares de genes, e tem como principal resultado a síntese e acumulação de complexos enzimáticos designados nitrogenases que são responsáveis pela redução de azoto molecular ( $\text{N}_2$ ) em azoto reativo ( $\text{NH}_3$ ). A atividade das nitrogenases requer um ambiente com baixo teor em oxigénio, pelo que, durante a diferenciação dos heterocistos, os ficobilissomas e o fotossistema II acoplado, responsáveis pela formação de oxigénio, são desativados, mas os fotossistemas I mantêm-se ativos para formação de ATPs. Em algumas zonas da Ásia o arroz pode ser cultivado continuamente sem adição de fertilizantes devido à presença de cianobactérias nos arrozais. Nesses locais, as cianobactérias, particularmente membros do género *Anabaena*, ocorrem em associação com um feto aquático a *Azolla*.

Quando as condições ambientais se tornam adversas formam-se muitas vezes endósporos, ou acinetos, que permitem ao organismo sobreviver em condições de seca, calor ou frio, extremas.

Nas cianobactérias só se conhece reprodução assexuada por divisão ou por fragmentação,



neste último caso em formas filamentosas. A fragmentação dos tricomas (filamentos) ocorre, muitas vezes, ao nível de células que realizam um processo de morte celular programada, as necrídias. Os pequenos segmentos de células vivas, separados pelas células mortas, são denominados hormogónios, Fig. 2.5, e possuem capacidade de movimentação por deslizamento, sendo foto- e quimiotróficos.

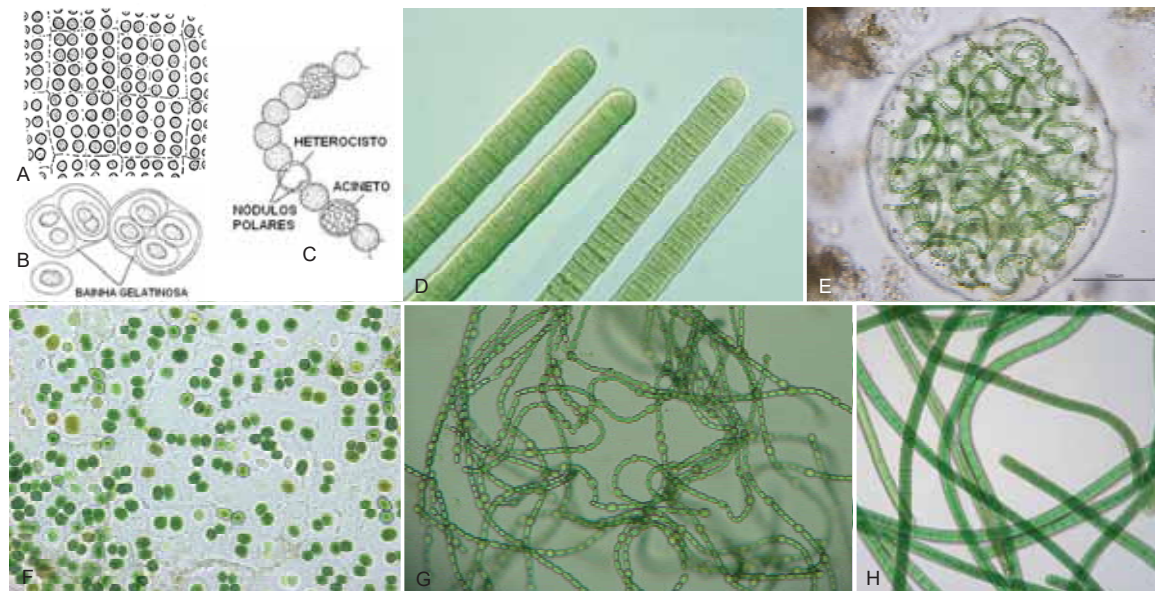


Fig. 2.5. Representação esquemática de cianobactérias: *Microcystis* (A), *Gloeocapsa* (B), *Anabaena* (C), e aspeto em microscopia ótica de *Oscillatoria* (D), *Nostoc* (E), *Gloeocapsa* (F), *Anabaena* (G) e *Lyngbya* (H).

### 2.1.2. Archaea

O domínio *Archaea* é constituído por dois filos, os *Crenarcheota* que incluem espécies termofílicas e hipertermofílicas (*Pyrolobus*) e os *Euryarcheota* que incluem espécies metanogénicas, halófilas extremas e acidófilas extremas (*Thermoplasma*). Tidas inicialmente como ocupantes exclusivos de ambientes hostis, sabe-se hoje que as arqueas de ambientes não extremos, apesar de pouco conhecidas, são também muito abundantes e provavelmente constituem uma grande parte do picoplâncton (organismos  $<1\mu$ ). Morfologicamente variáveis, as *Archaea* diferem das *Bacteria* na sequência de bases no RNA ribossómico, na composição lipídica da membrana plasmática e na ausência de peptidoglicanos na parede celular (ver Tabela 2.1).

## 2.2. Eucariotas

Um dos marcos mais importantes da evolução, foi a transição das células procariotas para as eucariotas, que se traduziu principalmente em: (i) estrutura celular mais complexa com compartimentação intracelular, permitindo maior controlo dos processos celulares; (ii) inclusão dos cromossomas num desses compartimentos (núcleo), permitindo a separação entre transcrição de genes e síntese proteica e maior complexidade e controlo da expressão genética; (iii) maior capacidade de recombinação genética (meiose, cariogamia), potenciando maior aptidão evolutiva.

Muitas proteínas e ácidos nucleicos podem ser considerados como verdadeiros fósseis vivos, no sentido em que a sua estrutura se tem mantido dinamicamente conservada ao longo do processo evolutivo de milhões de anos. É facto que determinadas sequências de aminoácidos e

de nucleótidos aparecem, atualmente, em formas relacionadas de eucariotas. Vários cientistas se têm empenhado no sentido de elucidar a história evolutiva com base no estudo destas sequências. Apesar de haver muita incerteza, os mais recentes estudos baseados em sequências de genes depois de aferidos por datação através do registro fóssil, apontam para a existência do ancestral comum eucariótico entre 1,87-1,68 mil milhões de anos.

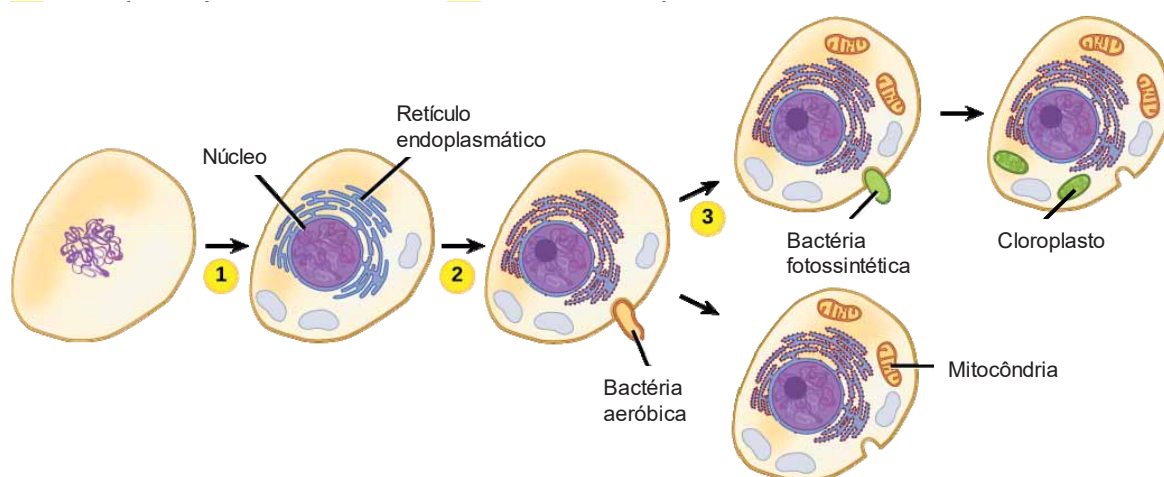


Fig. 2.6. Representação esquemática da teoria da simbiose (adaptado de Clark *et al.* 2018). ① Invaginações da membrana plasmática de um procariota ancestral originaram o retículo endoplasmático e o envólucro nuclear; ② Num primeiro evento endossimbiótico, o eucariota ancestral integrou uma bactéria aeróbica que evoluiu para mitocôndria; ③ Num segundo evento, o eucariota primitivo integrou uma bactéria fotossintética que evoluiu para cloroplasto.

Tendo em conta as numerosas semelhanças entre os genomas mitocondrial e plastidial e o genoma de formas atuais de procariotas de vida livre, a origem dos eucariotas é atualmente interpretada como o resultado de simbioses entre procariotas, Fig. 2.6. Existe um consenso praticamente geral sobre a existência de um único ancestral comum a todos os *Eukarya* (proto-eucariota ou LECA-*Last Eukaryotic Common Ancestor*) e sobre a complexidade e longa duração do processo de transformação celular que lhe veio a dar origem. Existe também grande concordância sobre duas outras características do proto-eucariota: (i) continha um endossimbionte, proto-mitocôndria, derivado de uma alfa-proteobactéria que veio a originar as mitocôndrias (e organitos equivalentes, como os hidrogenossomas) existentes em todas as células eucarióticas; (ii) o seu genoma pode ser considerado como constituindo uma quimera, em que os genes envolvidos no armazenamento e processamento da informação (processos de replicação, transcrição e translação) mostram afinidade com o domínio *Archaea*, enquanto os genes implicados nos processos metabólicos e de manutenção geral ('housekeeping genes') tendem a ser de origem bacteriana. Contudo, subsistem ainda muitas dúvidas e grande polémica sobre qual é precisamente a relação entre *Eukarya* e *Archaea* e sobre o momento exato da aquisição do endossimbionte mitocondrial. Em relação à primeira questão as várias hipóteses dividem-se em dois campos principais: (i) *Eukarya* e *Archaea* são linhagens irmãs, i.e., constituem ramos separados, mas relacionados, sendo dois dos três domínios primários da vida celular; ou (ii) *Eukarya* emergem de dentro dos *Archaea*, i.e., têm um ancestral comum com um sub-grupo dos *Archaea*, e constituem um só domínio. Desta última hipótese resultam apenas dois domínios primários. Quanto ao momento da simbiose com a alfa-proteobactéria (proto-mitocôndria), os dois modelos com mais suporte consideram ou que esta se deu muito cedo e diretamente com um

árquea, dando posteriormente origem à complexidade celular característica eucariótica, ou, em alternativa, que antes da endossimbiose terá ocorrido desenvolvimento significativo de membranas intracelulares endógenas, incluindo eventualmente um proto-núcleo, e outras estruturas celulares, num árquea progenitor que foi o ancestral da linhagem eucariótica. Os defensores do primeiro modelo argumentam com as vantagens energéticas para o proto-eucariota de possuir uma mitocôndria, enquanto os proponentes do segundo modelo dão ênfase à necessidade de o proto-eucariótica já possuir mecanismos celulares que possibilitassem a fagocitose do endossimbionte. Uma das hipóteses atualmente em debate, considera o domínio *Eukarya* uma linhagem irmã de *Archaea* (partilham um ancestral comum com exclusão de *Bacteria*), sendo os 3 domínios monofiléticos.

As células eucariotas são também únicas pelo facto de possuírem um citoesqueleto formado por filamentos de natureza proteica que dá estrutura física ao citoplasma e desempenha papel preponderante na geração de correntes citoplasmáticas, Tabela 2.2.

As células eucariotas, ao contrário das procariotas, possuem grande quantidade de DNA. É importante salientar que, por vezes, apenas 1% do DNA nuclear transporta informação utilizável pela célula, o que tem levado alguns autores a considerar a hipótese dos restantes 99% existirem apenas para aumentar a massa nuclear. Segundo outra hipótese pode tratar-se de uma existência parasítica; determinadas sequências vão-se acumulando na célula ao longo dos anos, explorando os mecanismos celulares para a sua própria reprodução, sem lhe trazer qualquer benefício.

Sabe-se, no entanto, que as porções de DNA nuclear que não codificam proteínas desempenham funções estruturais, condicionando a condensação de parte do material genético, e/ou funções reguladoras, ajudando a “ativar” ou “desativar” os genes que codificam as proteínas, tendo assim papel crucial no controlo de expressão genética nas células eucariotas.

Tabela 2.2. Comparação entre organismos Procariotas e Eucariotas.

	Procariotas	Eucariotas
<b>Organismo</b>	Micoplasmas, Bactérias e Cianobactérias	Protistas, fungos, plantas e animais
<b>Dimensão celular</b>	1-10 µm*	10-100 µm**
<b>Metabolismo</b>	Aeróbico ou anaeróbico	Aeróbico
<b>Organitos</b>	Poucos ou nenhuns	Núcleo, mitocôndrias, plastos, retículo, Golgi, etc.
<b>DNA</b>	DNA circular no citoplasma	DNA longo, organizado em cromossomas, com muitas regiões não codificantes. Cromossomas limitados por invólucro nuclear
<b>RNA e Proteínas</b>	Sintetizados no mesmo compartimento	RNA sintetizado e processado no núcleo; proteínas sintetizadas no citoplasma
<b>Citoplasma</b>	Sem citoesqueleto, correntes citoplasmáticas, endocitose e exocitose	Citoesqueleto composto por filamentos de proteína; correntes citoplasmáticas; endocitose e exocitose
<b>Divisão celular</b>	Bipartição	Mitose ou meiose
<b>Organização celular</b>	Unicelulares, podendo formar colónias	Unicelulares ou pluricelulares, havendo, neste caso, diferenciação de tecidos

\* Podendo atingir 50 µm; \*\* Podendo atingir valores extremos de 0.8 µm e 1 m.

O sucesso da adaptação das bactérias aos diferentes ambientes foi tal que, atualmente, estes organismos representam mais de metade da biomassa total do globo. Poder-se-á então questionar sobre o que motivou o aparecimento dos organismos pluricelulares. Na realidade, estes organismos utilizam, muitas vezes, recursos de difícil exploração para organismos unicelulares. Por outro lado, o facto em si, do aparecimento de organismos pluricelulares, determinou alterações significativas do meio ambiente.



Na concepção moderna, o domínio *Eukarya* é constituído por vários super-grupos: *Protista*, *Plantae* e *Animalia*.

### 2.2.1. Protistas

Os protistas são um vasto grupo de eucariotas que incluem os ciliados, dinoflagelados, apicomplexa, foraminíferos, euglenófitos, diatomáceas, algas castanhas, outras algas, 'fungos' mucilaginosos e aquáticos. Os protistas variam desde unicelulares microscópicos, solitários ou coloniais, até pluricelulares, de grandes dimensões com alguma complexidade (algas castanhas tipo *kelp*). São organismos heterotróficos ou autotróficos, maioritariamente aeróbicos, mas alguns anaeróbicos, que na sua maioria apresentam vida livre, embora se conheçam formas de associação simbiótica ou parasítica. São na sua maioria organismos aquáticos, constituindo o plâncton dos oceanos, lagos e rios.

#### *Protozoários*

A designação de Protozoários foi originalmente dada a organismos unicelulares com características semelhantes a animais. A unicelularidade não significa, contudo, simplicidade e muitos protozoários são estruturalmente complexos.

#### Rizópodes

Neste grupo incluem-se as amibas, organismos que podem atingir 0,6mm de comprimento. As amibas são incolores, de forma irregular e em constante mudança. Tudo indica que o seu movimento resulta da alteração do estado físico do citoplasma, passando de sol (fluido) a gel (mais viscoso) e vice-versa. Para se alimentar, a amiba projeta pseudópodes que envolvem pequenas partículas de alimento e água. O material é em seguida encaminhado para vacúolos digestivos, por um processo de endocitose, onde é degradado, Fig. 2.7.

A amiba reage negativamente à luz forte, a soluções salinas concentradas, a diversos produtos químicos ou a objetos, como agulhas. A reprodução dá-se por divisão binária.

Alguns membros deste grupo produzem uma cobertura calcificada com poros através dos quais saem os pseudópodes.

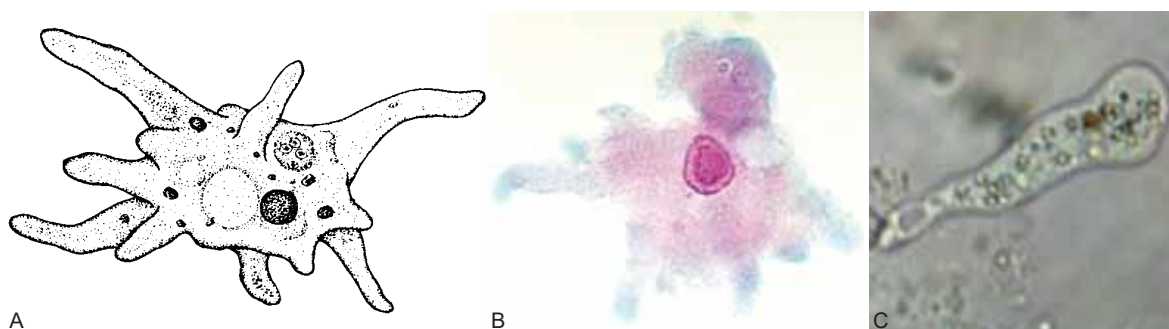


Fig. 2.7. Representação esquemática (A) e microfotografias em microscopia ótica de uma amiba, após coloração com vermelho neutro (B) e sem coloração (C), evidenciando a presença de organitos no citoplasma.

#### Ciliados

Os representantes deste grupo possuem cílios que utilizam na locomoção ou na captura de

alimento. Apresentam formas diversas, características de cada espécie, Fig. 2.8.

Possuem pelo menos dois núcleos: um menor, o micronúcleo relacionado com o processo reprodutor, e um macronúcleo que controla o metabolismo celular e o crescimento. Certos ciliados, como, por exemplo, *Stentor* e *Vorticella*, possuem fibras contrácteis que lhes permitem movimentos de contração.

A paramécia, um ciliado muito comum em infusórios de feno, desloca-se nadando em espiral. Os vacúolos digestivos percorrem rotas definidas no interior da célula, devido a correntes citoplasmáticas.

### Esporozoários

São dois grupos cujos representantes são na sua quase totalidade parasitas, pelo que é extremamente difícil encontrar formas de vida livre.

### Flagelados

Os zoólogos incluem nos flagelados organismos como as Euglenas e os Dinoflagelados por possuírem flagelos, manifestarem reação a estímulos luminosos e possuírem, ocasionalmente, nutrição saprófita. A este grupo pertencem também organismos parasitas como, por exemplos o *Trypanosoma*.



Fig. 2.8. Representação esquemática de ciliados (A, B) e observação em microscopia ótica de paramécias, após coloração com vermelho neutro (C), e de vorticelas, sem coloração (D).

### Euglenoides

Cerca de 1/3 dos 40 géneros de euglenas conhecidas têm cloroplastos com clorofila *a*, *b* e

carotenoides. A *Euglena* e o *Phacus* são organismos desprovidos de parede celular. Subjacente à membrana plasmática e formando com esta o periplasto, existe uma rede de natureza proteica com 6-17% de lípidos ou polissacáridos. O periplasto pode ser rígido, como no *Phacus*, ou não, como na *Euglena*. Estes géneros apresentam em comum um estigma ou mancha ocular que recebe os estímulos luminosos, Fig. 2.9.

Os representantes deste grupo podem ser autotróficos ou heterotróficos. Algumas espécies podem alterar a sua estratégia trófica, dependendo da iluminação e dos nutrientes disponíveis. Os zoólogos consideram-nos protozoários.

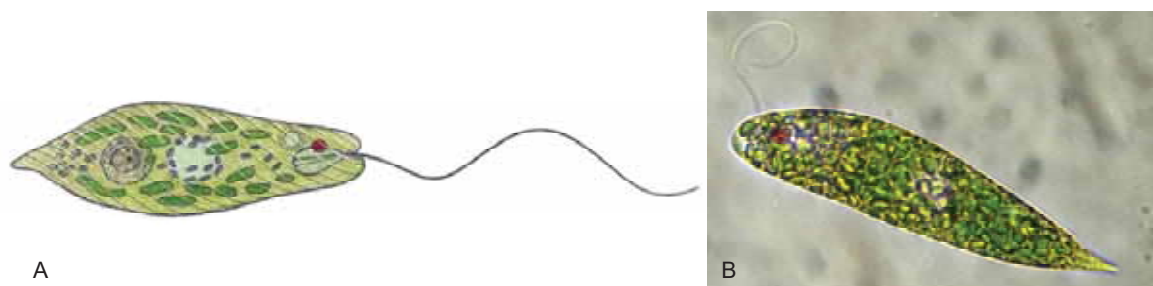


Fig. 2.9. Representação esquemática (A) e observação em microscopia ótica (B) de *Euglena*.

### Dinoflagelados

Os dinoflagelados são um grupo de organismos unicelulares muito importantes no plâncton. Têm uma grande diversidade de estratégias tróficas, mas é frequente considerar que cerca de 50% das espécies são autotróficas. A maioria das espécies são de vida livre, mas há formas simbióticas, como as que ocorrem nas formações de coral, e parasitas. Possuem um revestimento celular muito característico, o anfiessa, constituído por um sistema de membranas que inclui a membrana plasmática e um conjunto de vesículas comprimidas localizadas imediatamente abaixo

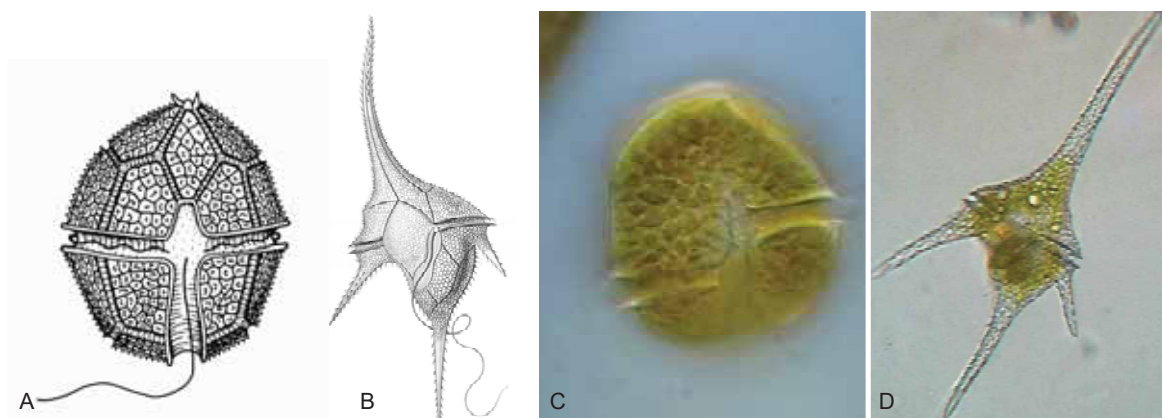


Fig. 2.10. Representação esquemática (A, B) e observação em microscopia ótica (C, D) de dinoflagelados.

deste. As vesículas (alvéolos) por vezes apresentam deposições de celulose conferindo à célula uma robustez semelhante aquela normalmente associada à presença da parede celular nas plantas. Os cloroplastos, quando presentes, resultam de um processo endossimbiótico complexo, sendo a composição em pigmentos dependente do grupo fotossintético que participa no processo. As formas autotróficas mais frequentes apresentam clorofila *a* e clorofila *c2* e o principal pigmento acessório é a peridinina que mascara o verde da clorofila conferindo um tom acastanhado.

Acumulam amido nos plastos e no hialoplasma. Possuem dois flagelos desiguais, um longo, que se projeta posteriormente em relação à direção do deslocamento, e outro que, inserindo-se na mesma região da célula, se dispõe transversalmente em torno do organismo, Fig. 2.10.

### Diatomáceas

As Diatomáceas são organismos de extrema importância em sistemas aquáticos pela sua abundância e diversidade. Há formas planctônicas que ocorrem na massa de água, e bentônicas, vivendo neste caso associadas a diversos tipos de substratos orgânicos e inorgânicos. A parede celular é muito característica, composta predominantemente por uma forma amorfa de sílica hidratada e uma pequena fração de compostos orgânicos, sobretudo proteínas. A parede das diatomáceas designa-se por frústula e é comparável, pela sua natureza e forma, a uma caixa de Petri em vidro, Fig. 2.11.

Para além das clorofilas *a* e *c* e do  $\beta$ -caroteno, as diatomáceas possuem também fucoxantina (xantofila) que lhes confere, geralmente, uma coloração típica castanho-dourado. Como substância de reserva possuem a laminarina, um polissacárido diferente do amido. Nos cloroplastos apresentam ainda pirenoides, estruturas de natureza proteica, onde existe RuBisCO em elevada concentração e funcionam mecanismos de concentração de  $\text{CO}_2$  (semelhantes aos carboxissomas das cianobactérias).

Os primeiros registos fósseis abundantes de diatomáceas são de há 115 milhões de anos no Cretácico Inferior. A acumulação fóssil das suas paredes, ricas em silício, originou os atuais depósitos de diatomito ou terra de diatomáceas. Conhecem-se hoje em dia vários locais onde se acumulam estes depósitos. Este material, semelhante a pó, poroso e extremamente leve contém cerca de 6 mil milhões de frústulas de diatomáceas por litro. Entre as suas várias aplicações, salienta-se a de agente polidor de prata e outros metais, é utilizado em pastas de dentes, para fabrico de tintas refletoras para autoestradas, sinais de trânsito e ainda em matrículas de automóveis de alguns países.

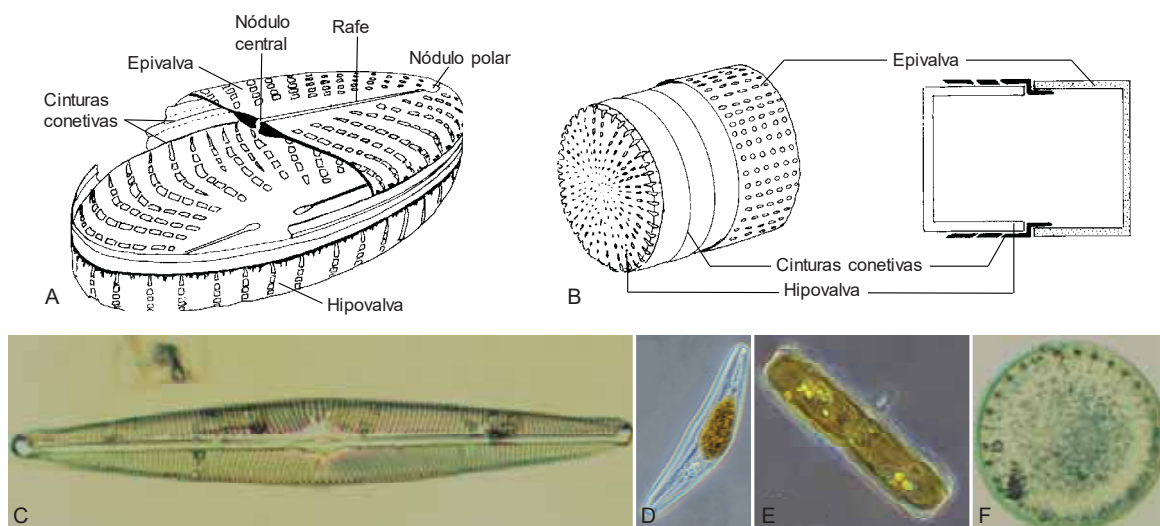


Fig. 2.11. Representação esquemática (A, B) e observação ao microscópio (C, D, E, F) de diatomáceas penais (A, C, D, E) e centrais (B, F).

Considerando a simetria das diatomáceas, é comum classificá-las em penais, com simetria bilateral, ou centrais, com simetria radial. Estas últimas são essencialmente marinhas, Fig. 2.11.

As diatomáceas possuem duas valvas, que encaixam uma na outra, Fig. 2.11. O movimento de vaivém, observado em algumas penais, está associado a uma fenda na frústula, o rafe, Fig. 2.11A e C).

A reprodução assexuada nas diatomáceas processa-se de tal modo que uma das células filhas é sempre mais pequena. Quando essa célula atinge dimensões críticas, intervém a reprodução sexuada. Forma-se então um zigoto sem parede celular rígida, cujo protoplasto se expande atingindo a dimensão característica da espécie e sintetiza uma nova parede celular (frústula).

### *Algas verdes*

Na escala evolutiva, as algas surgem como os organismos eucariotas clorofilinos que mais características de primitividade evidenciam, Fig. 2.12. Embora o grupo *Algae* tenha já sido abandonado como categoria taxonómica e os seus representantes distribuídos por várias Divisões, é possível encontrar algumas características em comum, nomeadamente do ponto de vista reprodutor:

1. Alguns indivíduos, principalmente as algas unicelulares, podem comportar-se como células sexuais ou gâmetas, fundindo-se para formar o zigoto;
2. Os gâmetas podem ser produzidos em gametângios unicelulares especializados ou em gametângios pluricelulares em que todas as células são férteis;
3. Os esporos desenvolvem-se em estruturas unicelulares ou multicelulares (esporângios).

Embora nas bactérias se verifique já a associação colonial, é nas algas verdes que se encontram formas com graus de complexidade variável, ilustrando o tipo de progressão que provavelmente ocorreu na evolução das plantas superiores e dos animais.

As algas verdes podem ser unicelulares, coloniais, pluricelulares filamentosas ou membranosas, cenocíticas ou tubulares, Fig. 2.12. As algas verdes mais simples são unicelulares e elas só se mantêm agrupadas temporariamente, na sequência da divisão celular. A organização colonial surgiu, provavelmente, devido à incapacidade das células se separarem após a divisão. Em algumas colónias já é possível observar diferenciação celular com especialização e divisão de trabalho.

Quando a divisão celular ocorre apenas numa direção, formam-se cadeias de células denominadas filamentos. Certas células do filamento podem dividir-se numa outra direção, originando ramificações. Divisões celulares em dois ou mais planos podem resultar na formação de estruturas “membranosas” ou semelhantes a folhas, com uma ou mais camadas de células de espessura, formando um “parênquima”.

Em algumas algas, a divisão nuclear não é acompanhada da correspondente divisão celular, o que condiciona a formação de uma estrutura vesicular ou tubular multinucleada (estrutura cenocítica).

Nos cloroplastos das algas verdes existem clorofilas *a* e *b*,  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos e xantofilas. As clorofilas predominam, regra geral, sobre os restantes pigmentos, conferindo a cor verde típica dos representantes deste grupo. Os cloroplastos podem ter dimensões e formas diversas e, tal como em muitos grupos de algas, a maioria dos representantes, possui pirenídes que contêm a enzima RuBisCO.

### *Algas vermelhas*

A maioria das algas vermelhas é pluricelular e abundante em águas marinhas. Os seus cloroplastos possuem clorofila *a*, carotenoides, ficoeritrinas e ficocianinas. As paredes celulares



das algas vermelhas contêm polissacáridos mucilaginosos de interesse comercial (agar).

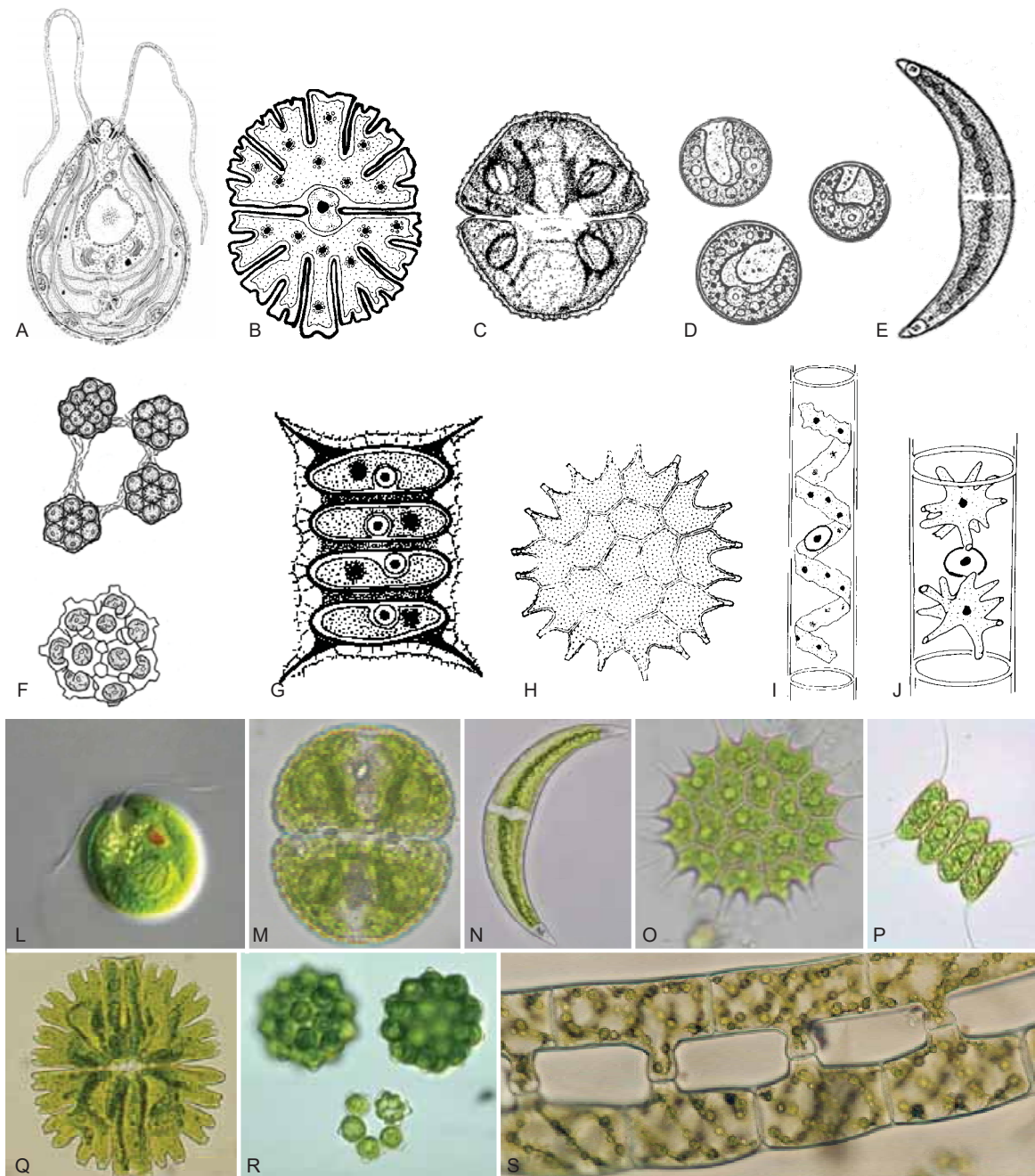


Fig. 2.12. Representação esquemática de algas verdes unicelulares, *Chlamydomonas* (A), *Micrasterias* (B); *Cosmarium* (C), *Chlorella* (D), *Closterium* (E), coloniais, *Coelastrum* (F), *Scenedesmus* (G), *Pediastrum* (H) e filamentosas, *Spirogyra* (I), *Zygnema* (J). Observação ao microscópio ótico de *Chlamydomonas* (L), *Cosmarium* (M), *Closterium* (N), *Pediastrum* (O), *Scenedesmus* (P), *Micrasterias* (Q); *Coelastrum* (R) e *Spirogyra* (S).

### Algas castanhas

Todas as algas castanhas são pluricelulares, variando em dimensão de alguns centímetros a aproximadamente 60m. Os cloroplastos possuem clorofila *a* e *c*, e fucoxantina (um pigmento amarelo-acastanhado que ocorre só nas algas castanhas, nos dinoflagelados e nas diatomáceas).

São comercialmente importantes pela produção de algina, um polissacárido que se acumula nas paredes celulares e que pode representar até 40% do peso seco. A algina é extremamente importante do ponto de vista comercial, pela sua aplicação, entre outras, nas indústrias alimentar, de papel, têxtil, farmacêutica e cosmética, de materiais de limpeza e cervejeira. O iodo é também um elemento importante que se retira das algas castanhas, e pela elevada concentração de azoto e potássio são também utilizadas como fertilizantes. O Mar dos Sargaços deve o seu nome, à invasão das costas do Golfo do México com a alga castanha *Sargassum*, aquando das tempestades tropicais.

### *Fungos Mucilaginosos e Aquáticos*

Estes organismos possuem características de protozoários ou animais durante parte do ciclo de vida e de fungos durante a restante. Os fungos mucilaginosos não possuem paredes celulares no seu estado ativo, sendo o seu corpo constituído por uma massa protoplasmática plurinucleada, o plasmodium. Os plasmodia deslizam sobre material em decomposição, e convertem-se em estruturas estacionárias, de várias formas, quando as condições ambientais se alteram. Os fungos aquáticos têm características em comum com as algas castanhas, das quais parecem ter derivado. Alguns são responsáveis por doenças em peixes e outros organismos aquáticos, e também em videiras e batateiras.

### **2.2.2. Fungos**

Os verdadeiros fungos são filamentosos ou unicelulares e não possuem células móveis. Todos produzem hifas e têm paredes celulares cujo constituinte dominante é a quitina. São maioritariamente organismos decompositores, responsáveis por enormes perdas económicas por doenças e/ou estragos em alimentos. Os líquenes resultam de uma associação entre um fungo e uma alga (alga verde ou cianobactéria), em que a alga fornece o alimento para ambos, enquanto o fungo protege a alga das radiações luminosas intensas, produz uma substância que acelera a fotossíntese da alga e absorve e retém água e minerais para ambos.

### **2.2.3. Animais**

Todos os animais são eucariotas pluricelulares heterotróficos, sem parede celular, cloroplastos ou pigmentos fotossintéticos. A maioria é capaz de se locomover, responde rapidamente a estímulos e reproduz-se sexuadamente. Exceto nas formas mais simples, as células que constituem os animais mostram uma divisão de funções em órgãos específicos.

### **2.2.4. Plantas**

Os membros do Reino Plantae apresentam uma grande diversidade e organização estrutural. Quase todos apresentam cutícula a cobrir as partes aéreas e desenvolveram embriões e tecidos específicos para fotossíntese, condução, suporte, ligação e proteção. O ciclo de vida das plantas alterna entre uma fase haploide gametofítica, e uma diploide, esporofítica. Muitas plantas são de uma importância económica extrema para o Homem.



### 3. A CÉLULA

#### 3.1. Parede celular vegetal

A diferença entre animais e plantas não se situa ao nível das características moleculares fundamentais, como a replicação do DNA, a síntese proteica, a produção de ATP na mitocôndria ou a constituição das membranas protoplasmáticas. A capacidade de as plantas fixarem o CO<sub>2</sub> atmosférico, durante a fotossíntese, e de produzirem uma parede celular rígida, marca, de facto, a diferença entre estes dois grupos de seres vivos.

A parede celular é uma forma particular de matriz extracelular, intimamente associada à face exoplasmática da membrana plasmática da célula vegetal. Embora muitas células animais possuam também componentes da matriz extracelular à superfície da membrana plasmática, a parede celular vegetal é, normalmente mais espessa, mais organizada e mais rígida. Com parede celular rígida, as plantas não têm possibilidade de se mover e, portanto, não desenvolvem sistemas muscular, ósseo e nervoso. Com efeito, a maior parte das diferenças entre animais e plantas (nutrição, digestão, osmorregulação, crescimento, reprodução, comunicação intercelular, mecanismos de defesa e morfologia) está relacionada com a presença da parede celular.

Numa planta, as células jovens são de tamanho reduzido, se comparadas com células adultas. Para permitir o alongamento celular, a parede das células jovens, parede celular primária, é delgada e semirrígida. Na célula adulta, que mantém a parede primária, embora por vezes bastante mais espessa, a deposição secundária de material da parede, parede celular secundária, leva ao aumento inevitável da rigidez.

A parede celular primária, apesar de apresentar, nos diversos grupos vegetais, variações significativas em termos de organização, possui sempre longas fibras de celulose unidas por uma matriz constituída por proteínas e polissacáridos. Os polissacáridos da matriz são essencialmente pectinas e hemiceluloses. A ligação das fibras de celulose aos componentes da matriz faz-se por covalência e por ligações de hidrogénio. Na maioria das plantas, a parede celular primária apresenta percentagens semelhantes de celulose (15-40%), de hemiceluloses (20-30%) e de pectina (30-50%). Na parede celular secundária, a celulose é maioritária (35-50%), sendo as hemiceluloses (25-35%) e a lenhina (10-25%) os outros componentes mais representativos.

Uma molécula de celulose consiste numa cadeia linear de mais de 10 mil resíduos de glucose, ligados covalentemente por uma ligação glicosídica  $\beta(1-4)$ . Este tipo de ligação confere à macromolécula uma estrutura planar, que é estabilizada por ligações de hidrogénio intramoleculares. Entre 18 e 24 moléculas de celulose agrupam-se para formar as micelas (fibrilhas elementares). A junção de 20 a 60 micelas resulta na formação de arranjos paralelos, longos e altamente ordenados, as microfibrilhas. As microfibrilhas estão rodeadas por um grande número de cadeias de celulose livres e por moléculas de hemiceluloses, Fig. 3.1.

Hemiceluloses é o nome dado a um grupo heterogéneo de polissacáridos da matriz que se ligam entre si e às microfibrilhas de celulose, envolvendo-as e interligando-as numa rede complexa. Existem diversas classes de hemiceluloses. O tipo de hemiceluloses de uma célula varia com o seu estágio de desenvolvimento e com a espécie vegetal.

As pectinas são um grupo de polissacáridos da parede, altamente hidratados e ramificados, constituídos por resíduos de ácido galacturónico, esterificado ou não. A presença de inúmeros grupos ácido nas moléculas de pectina, favorecem a formação de complexos com iões Ca<sup>2+</sup>, o que promove a absorção de água. As pectinas são particularmente abundantes na lamela média, cujo função é cimentar as paredes celulares das células adjacentes. Com o alongamento celular, a lamela média sofre rutura em diversos locais, dando origem aos meatos observados em

diversos tecidos.

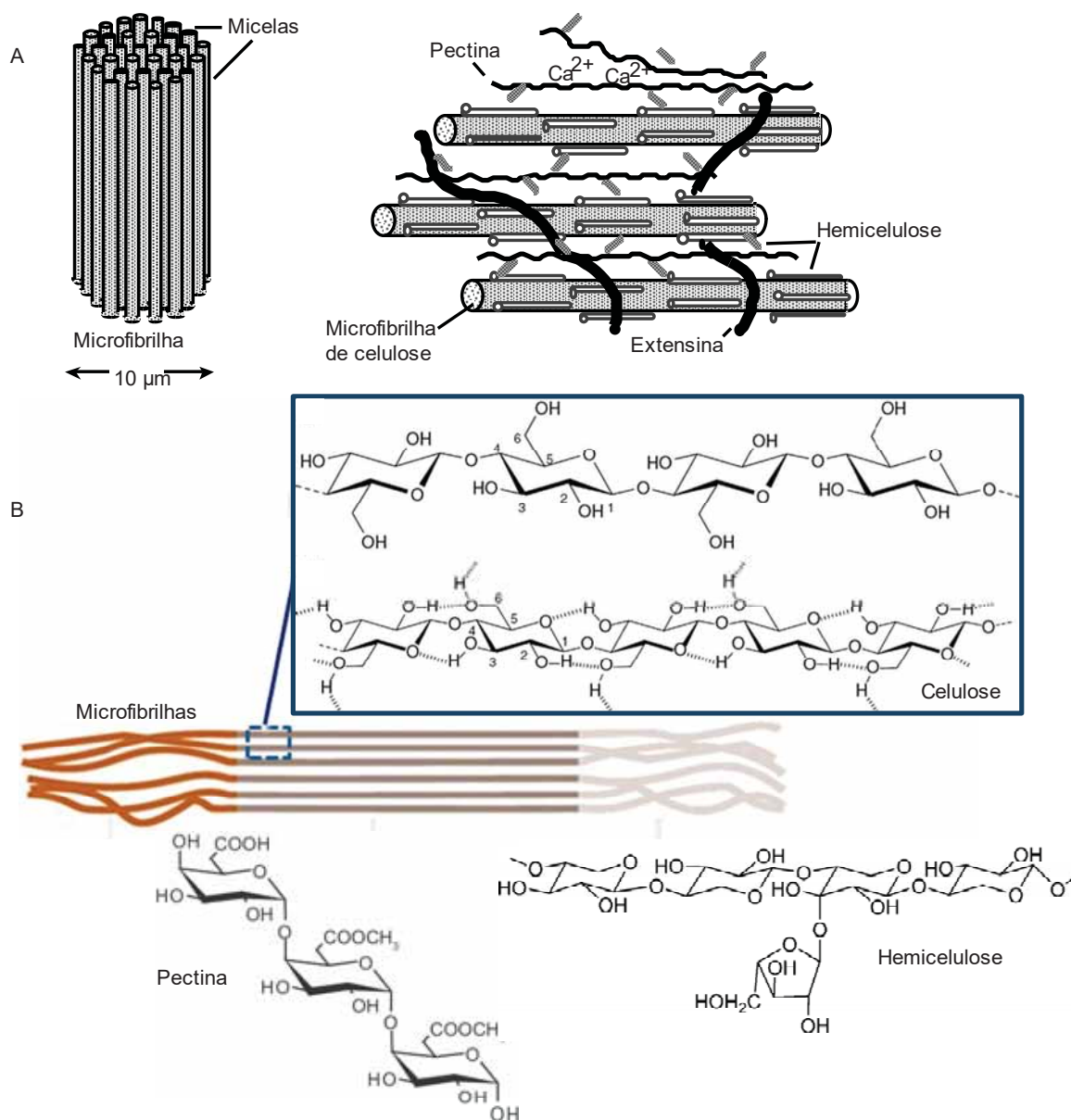


Fig. 3.1. Representação esquemática do arranjo dos constituintes da parede celular primária (A). Estruturas moleculares da celulose, das hemiceluloses e das pectinas (B).

A parede celular primária contém, ainda, quantidades variáveis de proteínas, na sua maioria glicoproteínas, tanto com funções estruturais como enzimáticas. Estas proteínas são de três tipos principais, dependendo do aminoácido mais abundante na sua composição: ricas em hidroxiprolina (HGRP), prolina (PRP) e glicina (GRP). Uma das proteínas HGRP mais importantes é a extensina, dado o seu papel na extensibilidade e formação da parede celular.

De molde a permitir o crescimento e a modelação da forma da célula, a parede celular exhibe uma grande plasticidade. Ora, como as microfibrilas de celulose são estruturas bastante rígidas, as modificações da estrutura da parede devem-se ao deslizamento das microfibrilas, umas em relação às outras. Esses movimentos dependem da orientação das microfibrilas na parede e das ligações entre as diversas componentes da matriz e destes com as microfibrilas de celulose, Fig 3.2.

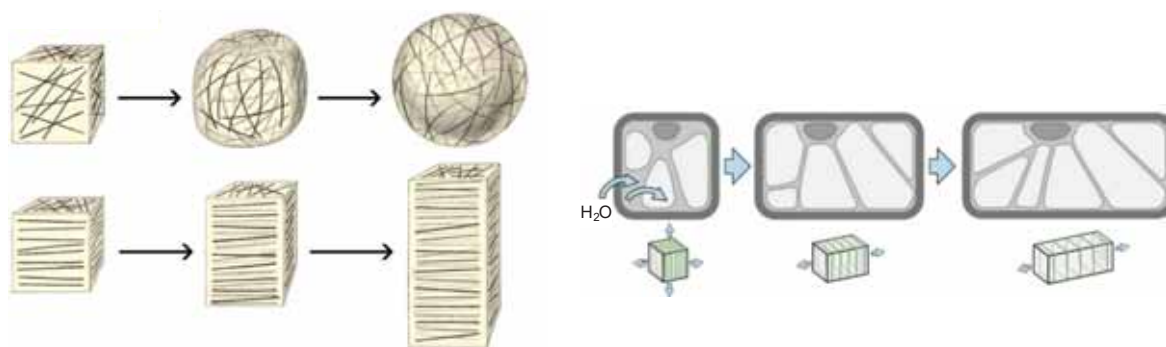


Fig. 3.2. Ilustração do modo como a orientação das microfibrilhas de celulose da parede celular primária determina a orientação do alongamento da célula.

Existem relativamente poucos tipos básicos de células nas plantas superiores e todos eles são facilmente distinguíveis pela forma e estrutura da sua parede. Todas as células definitivas se formam a partir de células com parede celular primária, por um processo de maturação que envolve, em muitos casos, a deposição de novo material da parede.

Quando a célula atinge a sua forma definitiva, regista-se uma certa relaxação dos componentes da parede, devido à tensão a que foram sujeitos durante o período de crescimento. A menor coesão dos diversos componentes é compensada, quer pela deposição de novos materiais na parede celular primária, quer, em muitos casos, pela deposição de novas camadas de composição diversa, dando origem à parede celular secundária. A deposição da parede celular secundária ocorre entre a membrana plasmática e a parede celular primária. Faz-se, normalmente, em camadas sucessivas com orientação diversa, Fig. 3.3.

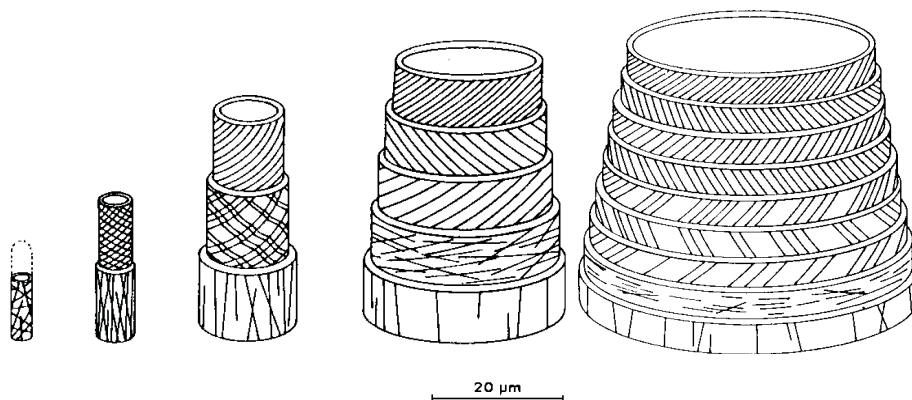


Fig. 3.3. Representação esquemática da deposição da parede celular secundária.

A forma e a composição da parede estão relacionadas com a função da célula no tecido. No floema, por exemplo, tecido responsável pelo transporte dos produtos da fotossíntese, sobretudo a sacarose, das células fotossintéticas para os restantes órgãos da planta, a sua diferenciação envolve a deposição de grande quantidade de celulose e hemiceluloses na parede. Por seu turno, no xilema, tecido especializado no transporte de água e iões da raiz para o resto da planta, as células, de forma tubular, possuem parede celular secundária extremamente espessa e rica em lenhina. Já o colênquima, tecido vivo de suporte, localizado à periferia dos órgãos vegetais, possui uma parede celular primária espessa, de natureza pectocelulósica, muito rica em água, Fig. 3.4.

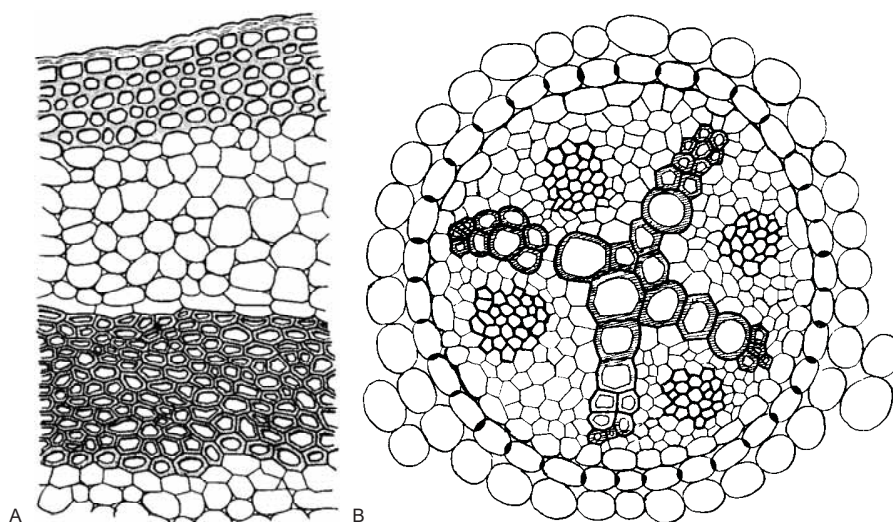


Fig. 3.4. Exemplo de modificações da parede durante a formação de células especializadas: colênquima e esclerênquima do caule (A), floema, xilema e endoderme da raiz (B).

A parede pectocelulósica pode ser considerada uma estrutura semipermeável porque os espaços entre as microfibrilhas de celulose podem apresentar dimensões entre 3,5-5,2nm, o que não permite que compostos com massa molecular superior a cerca de 15.000 u a atravessem livremente. Sendo, no entanto, permeável à água e à generalidade das substâncias nela dissolvidas, a troca de materiais entre células contíguas está grandemente facilitada. Excetuam-se os casos em que a parede é impregnada com compostos impermeáveis como, por exemplo, a suberina.

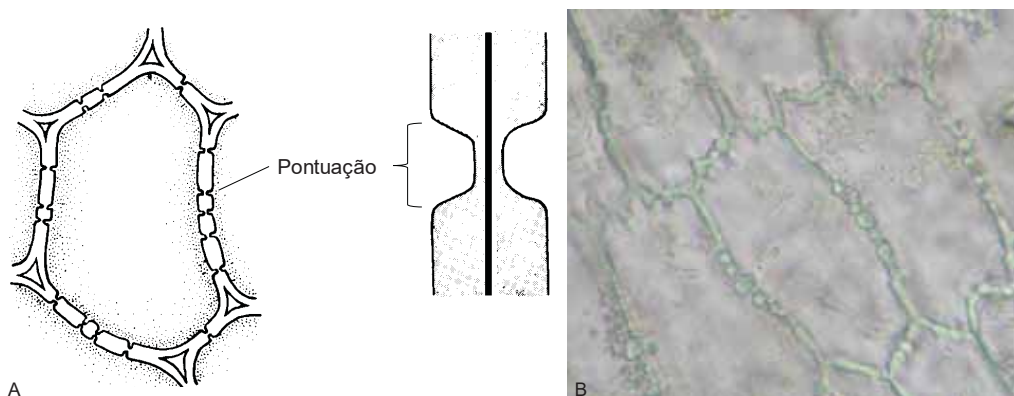


Fig. 3.5. Representação esquemática de pontuações (A) e observação de pontuações em microscopia ótica (B).

Quando as células possuem parede relativamente espessa, as trocas são consideravelmente favorecidas pela existência de pontuações. Uma pontuação consiste numa zona da parede onde, no decurso da diferenciação celular, não ocorreu deposição de novo material. As pontuações surgem assim como zonas de estrangulamento da parede como se observa no pericarpo do fruto da roseira ou no caule do craveiro, Fig. 3.5.

Quando existem pontuações, os plasmodesmos localizam-se preferencialmente a esse nível. Se não existem, os plasmodesmos distribuem-se, mais ou menos uniformemente, por toda a

parede, Fig. 3.6.

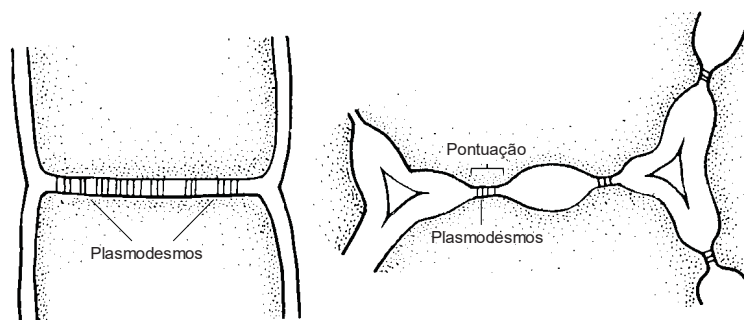


Fig. 3.6. Ilustração da distribuição dos plasmodesmos numa parede celular sem e com pontuações.

### 3.1.1. Alterações químicas da parede celular

A celulose, as hemiceluloses e as pectinas são, geralmente, os constituintes mais abundantes na parede celular. No entanto, em muitos casos, como consequência do processo de diferenciação, estes componentes são minoritários, existindo outras substâncias como, por exemplo, a lenhina, a suberina e a cutina, que conferem à parede características especiais. As alterações químicas da parede, resultantes da deposição de compostos diversos, podem afetar tanto a rigidez como a permeabilidade.

#### Lenhificação

A lenhina é um heteropolímero de natureza fenólica com uma estrutura complexa baseada em três álcoois (cumarílico, coniferílico e sinapílico) que não forma microfibrilhas. Este composto confere maior resistência à parede uma vez que substitui os componentes da matriz. A lenhina pode impregnar total ou parcialmente a parede celular como, por exemplo, nas células do esclerênquima, do tecido esclerenquimatoso, ou nos vasos lenhosos, Fig. 3.7.

As células de parede lenhificada estão adaptadas a funções de suporte, graças às propriedades mecânicas e à resistência das paredes reforçadas, e a funções de condução, que são favorecidas pelo carácter hidrófobo da lenhina. A capacidade de elaborar paredes celulares lenhificadas caracteriza as plantas vasculares ou Traqueófitas. O reforço adicional fornecido pela lenhina foi determinante para a aquisição do porte ereto e para a conquista do meio terrestre. Em consequência da impermeabilização da parede celular, todas as células de paredes totalmente lenhificadas são células mortas desprovidas de protoplasma. É possível distinguir, por métodos histoquímicos, células com parede celulósica de células com parede lenhificada. Utilizando azul de toluidina, um corante metacromático<sup>1</sup>, as paredes lenhificadas coram de azul enquanto as paredes celulósicas coram de rosa. Fazendo uma coloração dupla com verde iodo e carmim aluminado, a parede celulósica surge corada de rosa enquanto a parede lenhificada apresenta coloração verde. As lenhinas podem ser ainda postas em evidência com outros reagentes, entre os quais o floroglucinol, que reage com paredes lenhificadas dando uma cor vermelha em meio ácido, Fig. 3.7. As lenhinas absorvem os raios ultravioletas, a um comprimento de onda entre 250 e 280nm e apresentam uma autofluorescência amarela, Fig. 1.9B.

<sup>1</sup> Corante metacromático – corante que tem a capacidade de corar, seletivamente e de forma distinta, as estruturas celulares com tons de cor diferentes das do corante em solução aquosa diluída.



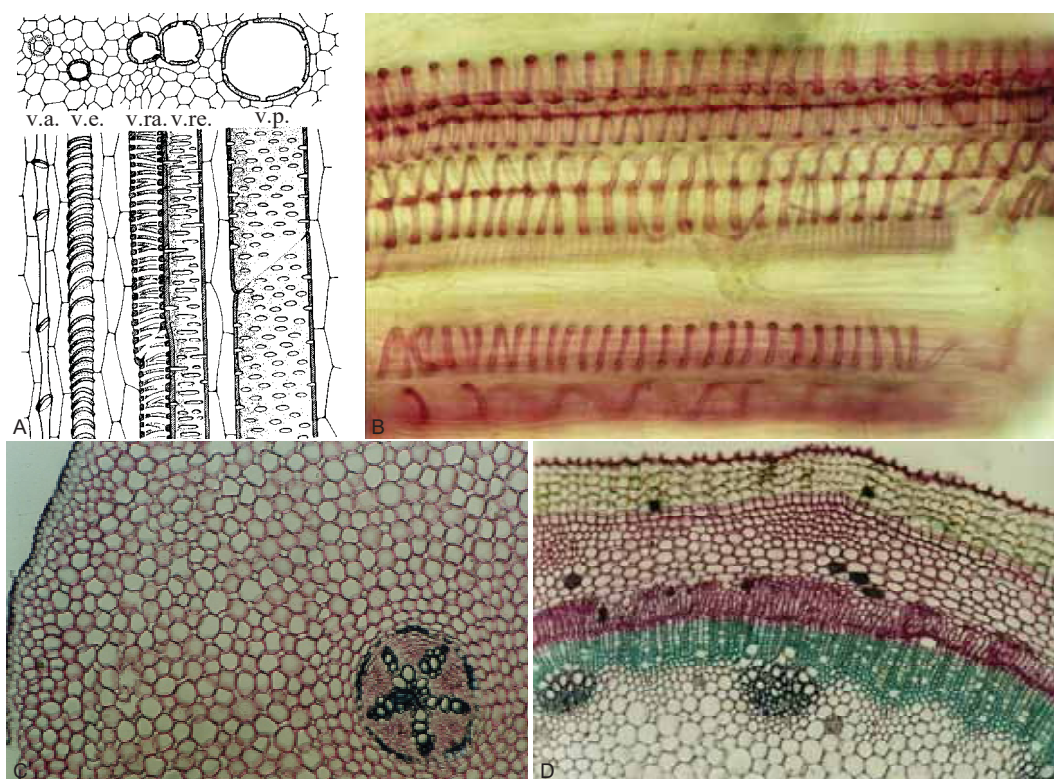


Fig. 3.7. Representação esquemática da parede celular lenhificada dos vasos xilêmicos, v.a.: vasos com espessamento anelar; v.e.: espiralado; v.ra.: raído; v.re.: reticulado; v.p.: pontuado (A). Observação, em microscopia ótica de vasos xilêmicos corados com Floroglucinol e de paredes celulares celulósicas (B), lenhificadas e suberificadas em cortes transversais de raiz (C) e caule (D).

### Paredes de Reserva

As sementes acumulam substâncias que asseguram uma autonomia nutritiva para a germinação, enquanto a planta ainda não é fotossintética. Essas substâncias acumulam-se preferencialmente no citoplasma ou nos plastos. Menos conhecido é o facto de muitas plantas acumularem, temporariamente, glúcidos particulares que são depositados massivamente nas paredes celulares, conduzindo à sua hipertrofia, Fig. 3.8. Aquando da hidratação germinativa, essas substâncias são mobilizadas, e os produtos de hidrólise são exportados para as regiões de crescimento. Os tipos moleculares predominantes são a manose (mananos e glucomananos) e a glucose e xilose (xiloglucanos ou amiloides).

As paredes celulares das células do albúmen das palmeiras e de famílias como a das Liliáceas, Iridáceas, Rubiáceas e Umbelíferas são particularmente ricas em manose. Estes espessamentos tornam as sementes muito duras, como é o caso das sementes de *Phytelephas macrocarpa*, justamente apelidadas de marfim vegetal. As paredes celulares das células do embrião do ciclâmen, do tamarindo ou da balsamina são ricas em xiloglucanos, também denominados amiloides, por reagirem positivamente ao soluto de Lugol, reagente habitualmente utilizado na deteção do amido.

### Cutinização e Cerificação

As células da epiderme possuem paredes celulares laterais e basal de natureza celulósica mais ou menos delgada. Durante a diferenciação, a parede celular celulósica externa destas células torna-se mais espessa e cobre-se por uma cutícula que é constituída, essencialmente, por



cutina, um polímero insolúvel, e por ceras, facilmente extraídas por solventes orgânicos. A superfície da cutícula apresenta muitas vezes estrias orientadas de modo variável, que correspondem a pregueamentos da sua superfície, Fig. 3.9B.

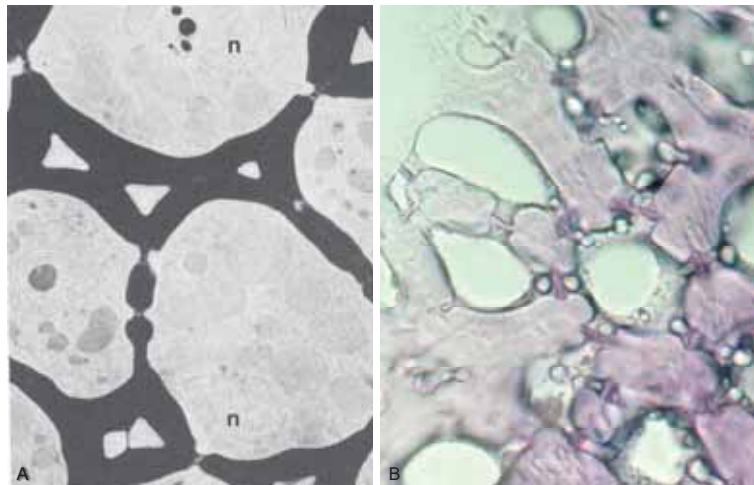


Fig. 3.8. Paredes celulares de reserva ricas em xiloglucanos. n – núcleo.

A cutícula assegura múltiplas funções: regula o grau de hidratação da superfície e a emissão de voláteis, limita a lixiviação pelas águas da chuva e defende a planta da força abrasiva do vento, da ação de poluentes e de infeções, entre outros.

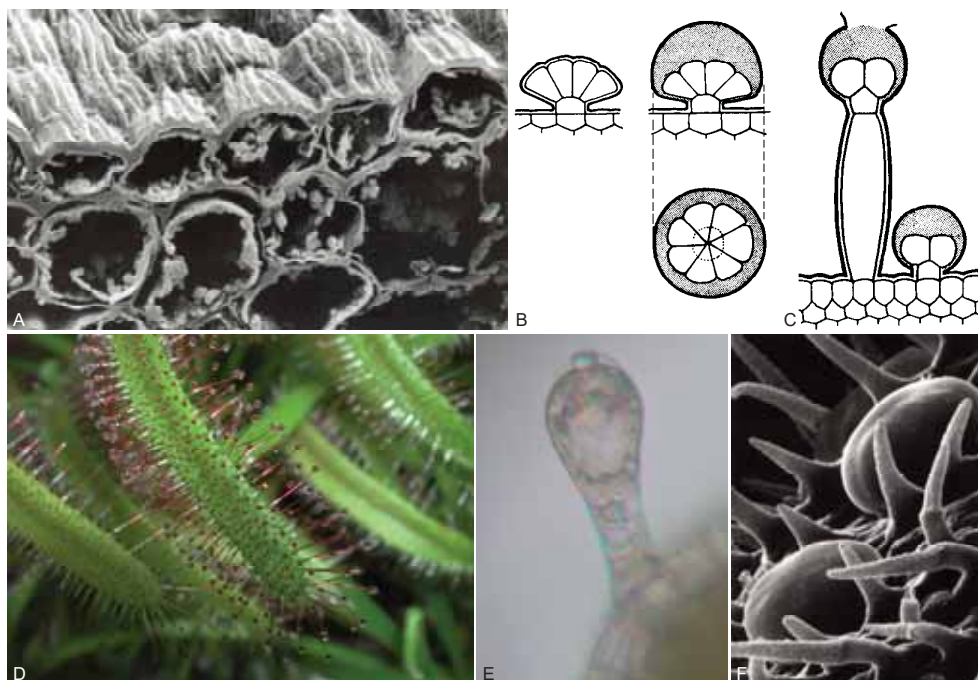


Fig. 3.9. Observação da cutícula em microscopia eletrônica de varrimento (A). Representação esquemática de tricomas secretores, alguns com cutícula destacada (B e C). Observação de tricomas à lupa (D), em microscopia ótica, com secretado no espaço sub-cuticular (E) e em microscopia eletrônica de varrimento (F).

A cutícula é uma estrutura composta por substâncias lipófilas e, como tal, detetável por

corantes gerais de lípidos (Negro Sudão e Vermelho Sudão III). A sua espessura é variável, relativamente delgada em órgãos jovens ( $0,5-1\mu\text{m}$ ), tornando-se mais espessa com a maturação celular, podendo atingir  $10-20\mu\text{m}$  na folha da oliveira e do loureiro.

A cutina é um polímero de ácidos gordos, que forma uma extensa rede à superfície do corpo da planta, e que aparece frequentemente impregnada e coberta por ceras, Fig. 3.9A, que aumentam a impermeabilidade da epiderme. A acumulação das ceras é muitas vezes tão abundante (5g de cera por folha) que podem ser extraídas e utilizadas comercialmente, como no caso de *Copernicia cerifera*.

Muitas estruturas epidérmicas, designadas tricomas, podem sintetizar e acumular essências voláteis. Os tricomas, *lato sensu*, são estruturas uni- ou pluricelulares, que têm nos vegetais essencialmente dois tipos de funções: protetora (tricomas de cobertura) ou secretora (tricomas glandulares), Fig. 3.9. Nestes últimos, a essência secretada é, muitas vezes, temporariamente acumulada, entre a parede celular e a cutícula destacada, num espaço designado espaço sub-cuticular. Por rutura da cutícula liberta-se a essência, que em seguida se evapora, Fig. 3.9B e C.

### Mineralização

A parede celular pode ser impregnada por carbonato de cálcio [ $\text{CO}_3\text{Ca}$ ], oxalato de cálcio [ $(\text{COO})_2\text{Ca}$ ] (ambos designados por calcificação) ou por sílica (silicificação).

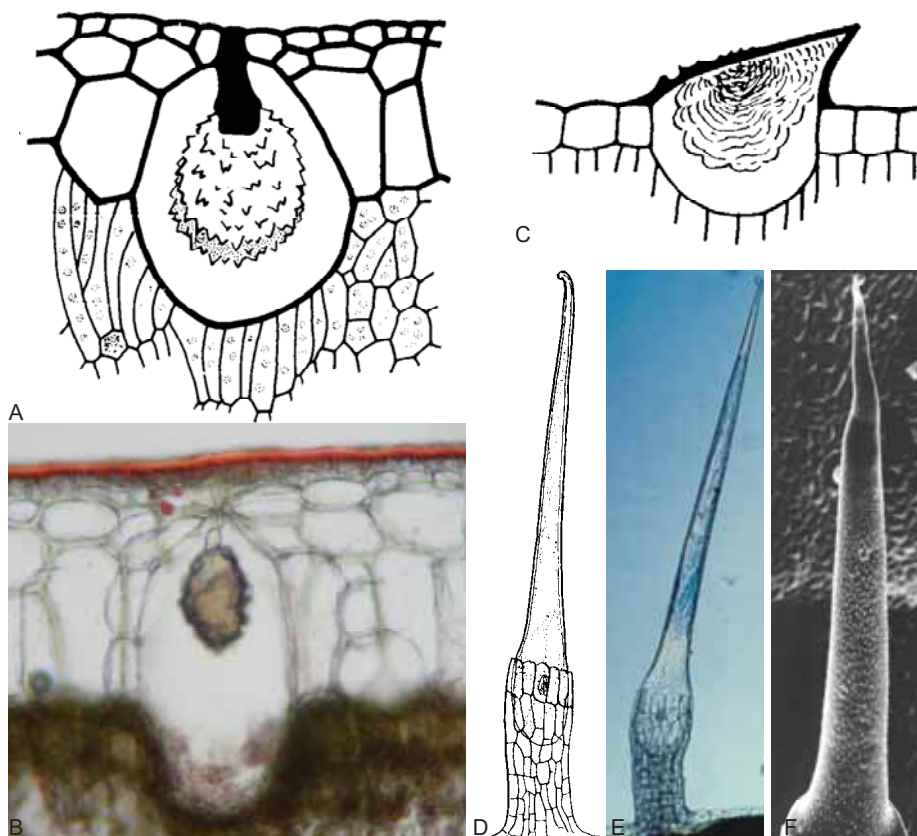


Fig. 3.10. Representação esquemática e observação em microscopia ótica de cystólitos em folhas de *Ficus elastica* (A e B) e *Humulus lupulus* (C). Representação esquemática e observação em microscopia ótica e em microscopia eletrónica de varrimento do tricoma silicificado de *Urtica dioica* (D-F).

O fenómeno da calcificação é frequente no talo de algumas algas vermelhas, como a *Coralline*

e *Lithothamnio*, tornando-as rígidas e quebradiças. Os cystólitos são, igualmente, depósitos de calcário que aparecem no interior da célula, fixos a uma excrescência da parede. Observam-se, com muita facilidade, na epiderme das folhas de *Ficus elastica* e de *Humulus lupulus*, Fig. 3.10.

A silicificação consiste na deposição de óxido de silício hidratado amorfo ou opalino  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ . As diatomáceas representam um caso de silicificação parietal massiva. Um exemplo característico da silicificação nos vegetais superiores é o dos tricomas de urtiga, Fig. 3.10. Neste caso, o reforço apical silicioso permite que estes funcionem como minúsculas seringas.

### Suberificação

A suberificação consiste na deposição de camadas sucessivas de suberina na face interna da parede celular, Fig. 3.11. Uma vez terminada a suberificação, e antes da morte da célula, deposita-se uma camada de celulose. A suberina tem uma natureza química próxima da da cutina, um polímero de ésteres de ácidos gordos e de fenóis.

A suberificação tem um papel protetor e impermeabilizador. Podemos encontrar exemplos de suberificação nas células da camada suberosa da rizoderme, e nas células da endoderme, Fig. 3.11. Também as células do súber, um tecido de crescimento secundário, têm paredes celulares suberificadas em maior ou menor grau. Como o súber constitui uma camada impermeável que impossibilita as trocas gasosas, ela é interrompida regularmente por lenticelas, constituídas por um conjunto de células parenquimatosas arredondadas, com numerosos meatos entre si. A suberificação pode ainda ocorrer em consequência da destruição acidental da epiderme (feridas ou picadas).

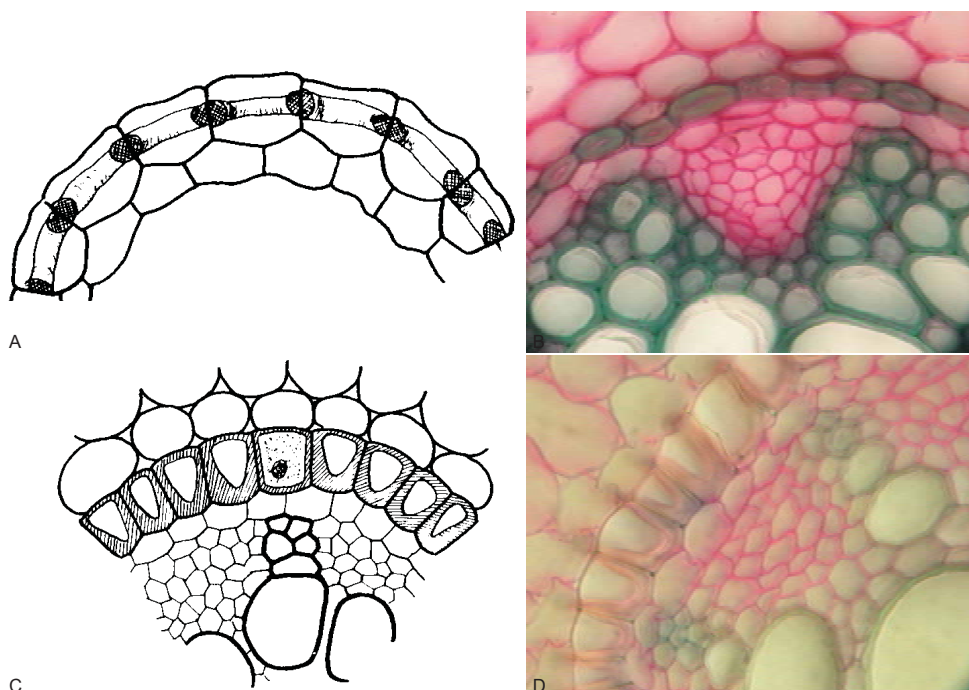


Fig. 3.11. Representação esquemática da endoderme de *Taxus baccata* (espessamento em banda, Bandas de Caspary) (A) e de *Iris florentina* (espessamento em U) (C) e observação em microscopia ótica (B, D).

### Esporoderme

A parede dos grãos de pólen e dos esporos é, geralmente, constituída por duas camadas: uma

externa, a exina e uma interna, a intina. A exina apresenta, normalmente, ornamentações características (papilas, pontuações, bordos dentados, etc.), Fig. 3.12. Enquanto a exina é constituída por esporopolenina, uma substância de natureza lipídica, a intina é rica em celulose. Graças ao facto de ser uma substância dura e resistente aos ataques químicos e de microrganismos e bem assim por possuir ornamentações características, a esporopolenina persiste nos sedimentos e permite a reconstituição da paleoflora.

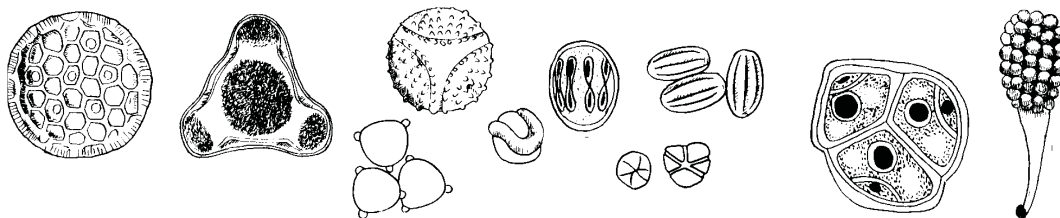


Fig. 3.12. Representação esquemática de diversos grãos de pólen.

### 3.2. Matriz extracelular nas células animais

A matriz extracelular é uma estrutura constituída por proteínas e polissacáridos que envolve todas as células animais de tecidos sólidos e órgãos. Esta matriz fornece não só um suporte físico para o desenvolvimento das células, mas é também responsável por um conjunto de sinais bioquímicos e biomecânicos cruciais para a morfogénese, diferenciação e homeostasia tecidulares.

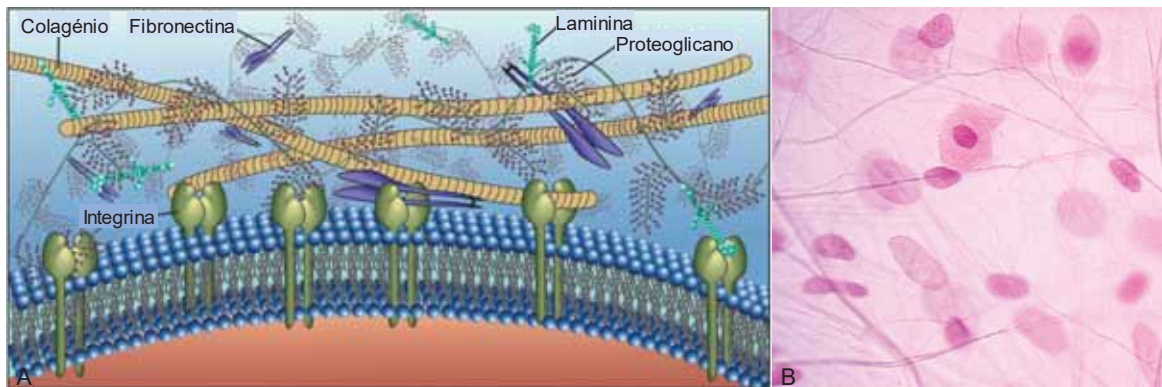


Fig. 3.13. Representação esquemática dos diversos componentes da matriz extracelular animal e da sua relação com a membrana plasmática (A). Observação de tecido conjuntivo laxo em microscopia ótica (B).

A matriz extracelular é constituída por fibras proteicas embebidas numa rede gelificada de glicosaminoglicanos (polissacáridos) e proteoglicanos (complexos glicoproteicos). Possui ainda algumas proteínas adesivas que ligam os componentes da matriz uns aos outros e estes às células (moléculas de adesão celular), Fig. 3.13A. A variação na abundância relativa de cada um dos componentes é responsável pela diversidade das matrizes extracelulares e, consequentemente, pela diversidade dos tecidos animais. A cartilagem, por exemplo, possui uma percentagem elevada de polissacáridos originando uma estrutura gelificada compacta, enquanto no tecido ósseo a matriz é endurecida pela deposição de fosfato de cálcio. O tecido conjuntivo, como por exemplo o laxo e o cartilágneo, é aquele em que a matriz extracelular é mais abundante, sendo essencialmente constituída pela própria matriz extracelular, na qual estão



dispersas as células, Fig. 3.13B.

O colagénio é a principal proteína estrutural da matriz extracelular animal que faz parte de uma grande família de proteínas com mais de 20 tipos diferentes (colagénios). Estas proteínas caracterizam-se por formar hélices triplas em que 3 cadeias polipeptídicas, do mesmo tipo, se enrolam umas nas outras, Fig. 3.14A. Na sequência de aminoácidos que constitui os colagénios, a glicina ocorre sempre de 3 em 3 posições, sendo que, nas 2 intermédias, a prolina e a hidroxiprolina são os aminoácidos mais frequentes, Fig. 3.14B.

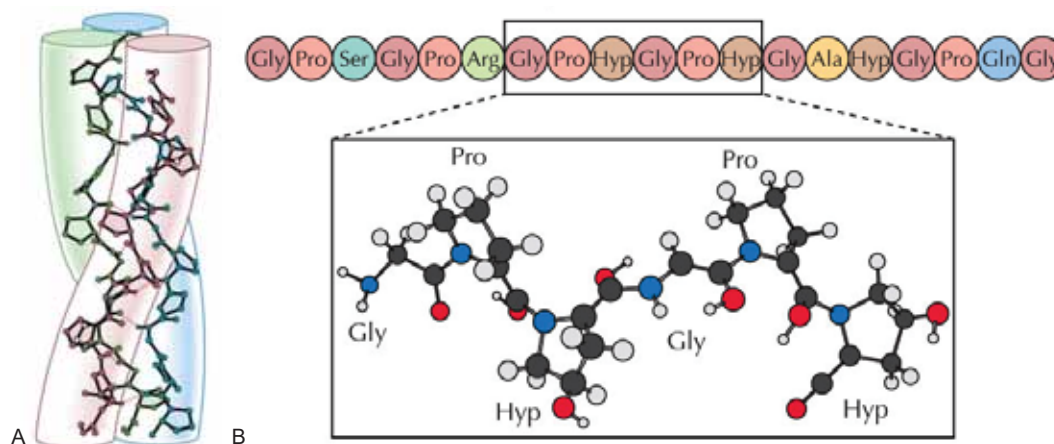


Fig. 3.14. Representação esquemática da hélice tripla de colagénio (A) e da sequência de aminoácidos que constituem a molécula de colagénio (B).

As fibrilhas de colagénio formam-se apenas no espaço extracelular, após a secreção dos pró-colagénios (precursores solúveis do colagénio). A associação das moléculas de colagénio em fibrilhas é fortalecida pela formação de ligações covalentes cruzadas, Fig. 3.15A. As fibrilhas associam-se umas com as outras para formar fibras de colagénio, com vários microns de diâmetro, Fig. 3.15B.

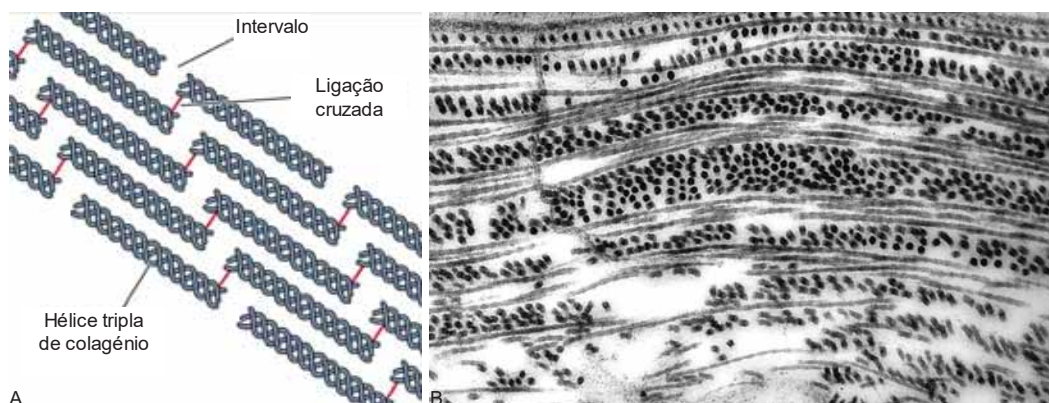


Fig. 3.15. Representação esquemática da organização das fibrilhas de colagénio (A). Observação das fibras de colagénio em microscopia eletrônica de transmissão (B).

Para além das fibras de colagénio, a matriz extracelular animal contém, ainda, fibras elásticas, particularmente abundantes em órgãos que se expandem e contraem, como é o caso dos pulmões. Estas fibras são constituídas, principalmente, por uma proteína, a elastina, que se associa através de ligações intercruzadas para formar uma rede. A rede de elastina funciona

como uma faixa elástica permitindo a expansão e a retração do tecido ou órgão ao seu estado inicial.

As proteínas fibrosas estruturais da matriz extracelular (colagénio, elastina) estão envolvidas numa rede gelificada constituída por polissacáridos, denominados glicosaminoglicanos, e proteoglicanos (GAGs), Fig. 3.16A. Dado que possuem grupos sulfato, os GAGs têm muitos grupos aniónicos (ionizados negativamente) pelo que, tal como as pectinas da parede celular vegetal, se ligam a cationes e retêm água, formando géis. Na sua grande maioria os GAGs estão ligados a proteínas formando os proteoglicanos.

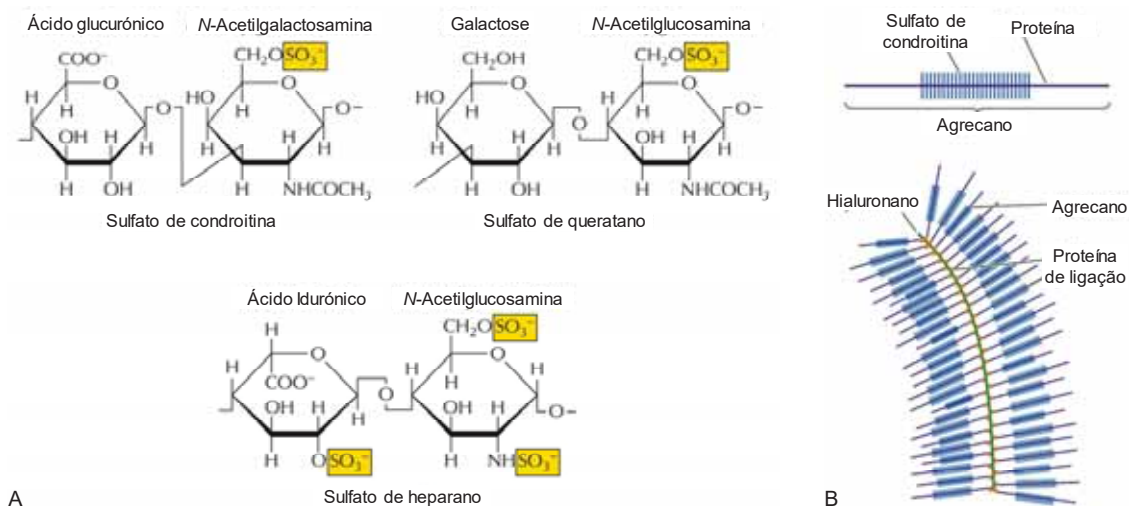


Fig. 3.16. Estrutura química de glicosaminoglicanos (A). Representação esquemática da estrutura resultante da ligação de proteoglicanos ao hialuronano (B).

Diversos proteoglicanos ligam-se ao hialuronano para formar complexos supramoleculares. Exemplo disso é o agrecano, o proteoglicano maioritário da cartilagem, Fig.3.16B. Os complexos de hialuronano/proteoglicanos, de grandes dimensões, acabam por ficar aprisionados nas fibras de colagénio. Ao mesmo tempo, interagem com o próprio colagénio e com outras proteínas da matriz constituindo redes gelificadas.

As proteínas adesivas constituem o 3º grupo de constituintes da matriz extracelular animal. São responsáveis pela ligação entre os diversos componentes da matriz e entre esta e a superfície das células. A fibronectina, as lamininas, a entactina, são exemplos de proteínas adesivas que possuem locais de ligação para o colagénio e para os GAGs, estabelecendo ligações cruzadas entre aqueles dois componentes da matriz extracelular, Fig. 3.13A. Algumas dessas proteínas adesivas possuem, ainda, locais de ligação a recetores da membrana plasmática, responsáveis pela ligação das células à matriz extracelular.

### 3.2.1. A diversidade celular nos diferentes tecidos animais

Todas as células que constituem um determinado organismo partilham o mesmo código genético nos seus núcleos. No entanto, as células não são todas idênticas. Muitos organismos multicelulares são compostos de diversos tecidos, grupos de células especializadas numa função comum.

Nos animais existem 4 tipos principais de tecidos: epitelial, conjuntivo, nervoso e muscular.



### Tecido epitelial

Os epitélios são camadas de células que cobrem a superfície do corpo e delimitam as suas cavidades internas tais como os pulmões e os intestinos.

As células podem ser colunares (mais altas que largas), pavimentosas (achatadas) ou cúbicas. Os tecidos epiteliais podem ser simples, estratificados ou pseudo-estratificados, Fig. 3.17.

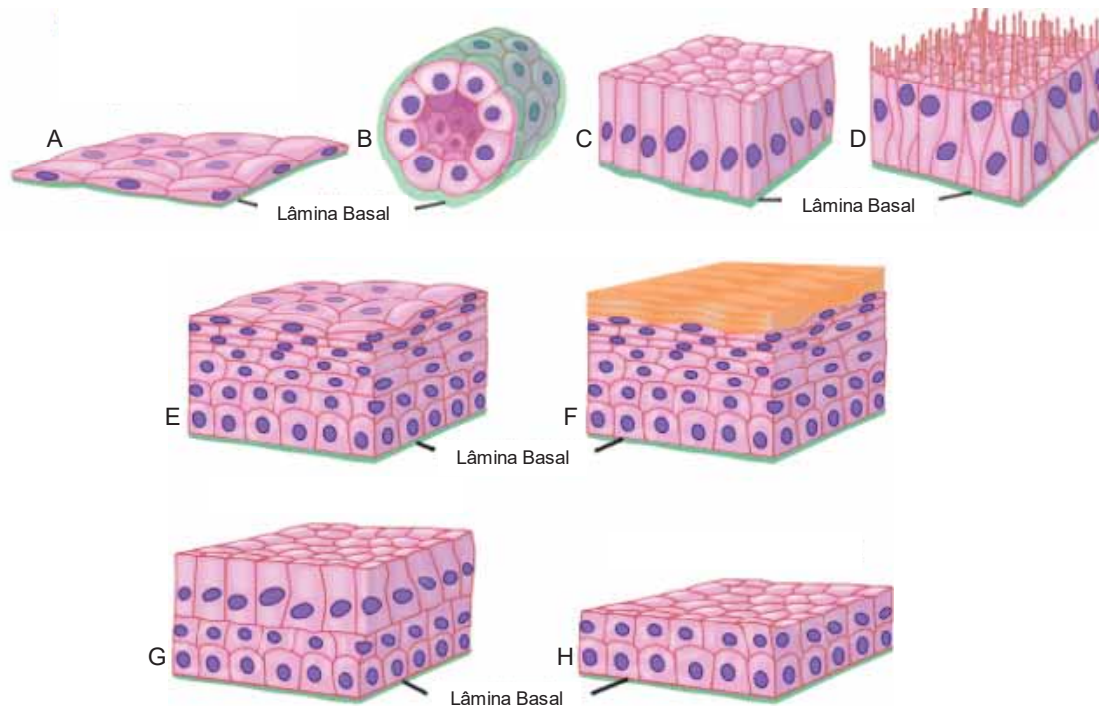


Fig. 3.17. Representação esquemática de diversos tipos de epitélios: escamoso simples (A), cuboidal simples (B), colunar simples (C), colunar pseudo-estratificado (D), escamoso estratificado (E), escamoso estratificado queratinizado (F), colunar estratificado (G), cuboidal estratificado (H).

Tratando-se de tecidos de revestimento e proteção, as suas células não apresentam, regra geral, matriz extracelular na zona de justaposição.

Frequentemente, imediatamente abaixo da membrana plasmática no domínio basal das células epiteliais, surge uma zona de matriz extracelular mais densa, designada lâmina basal, que estabelece a transição/ligação ao tecido conjuntivo subjacente.

### Tecido conjuntivo

Constitui um grupo de tecidos, muito diversificado, com funções de armazenamento (tecido adiposo), de suporte mecânico (tecido ósseo, cartilagem) ou de ligação entre outros tecidos (tecido conjuntivo laxo). Frequentemente, o tecido conjuntivo surge logo abaixo de tecido epitelial, Fig. 3.18.

O tecido conjuntivo é caracterizado, na maioria dos casos, por ser constituído por poucas células num grande volume de matriz extracelular, a qual é constituída por diversos tipos de fibras embebidas numa substância fundamental, Fig. 3.19. A mais abundante destas fibras é o colagénio, uma proteína que constitui cerca de 1/3 das proteínas do corpo humano. A elastina é outra proteína abundante na matriz extracelular de células de alguns tecidos conjuntivos.

Dependendo do tipo de tecido conjuntivo, os componentes predominantes da matriz

extracelular são diversos. No tecido conjuntivo laxo, a matriz extracelular é rica em fibras de colagénio e de elastina, embebidas numa rede polissacarídica. Neste tipo de tecido, as células

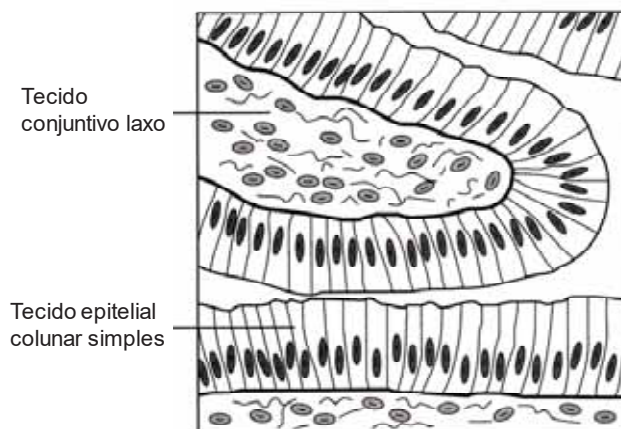


Fig. 3.18. Representação esquemática da frequente localização do tecido conjuntivo, relativamente ao tecido epitelial.

predominantes são os fibroblastos, que produzem as fibras e os componentes da substância fundamental, Fig. 3.19A. O tecido cartilágneo é caracterizado por uma matriz extracelular em que predomina a rede polissacarídica gelificada, composta por glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Os condrócitos são células facilmente observáveis em lacunas dispersas na matriz extracelular, Fig. 3.19B. No caso do tecido ósseo, a matriz extracelular é rígida devido à deposição de fosfato de cálcio. Os osteócitos são as células que se destacam, Fig. 3.19C.

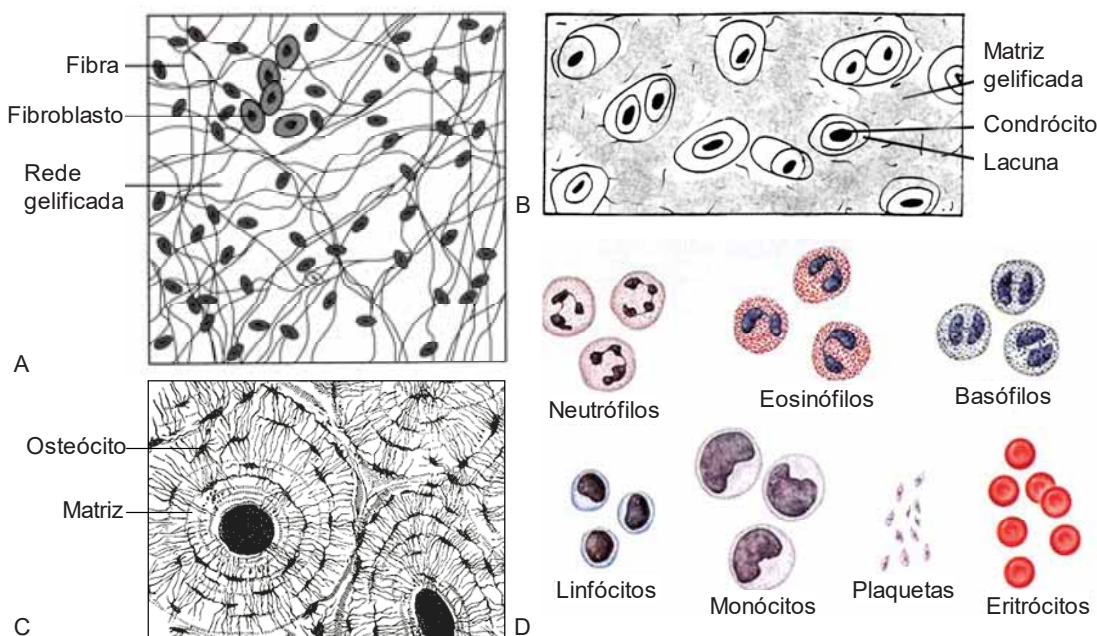


Fig. 3.19. Representação esquemática de diversos tipos de tecido conjuntivo. Conjuntivo laxo (A). Cartilágneo (B). Ósseo (C). Sanguíneo (D).

Existem casos particulares de tecidos conjuntivos que constituem exceções à regra. No tecido sanguíneo, os diversos tipos de células que o constituem encontram-se dispersos numa matriz líquida (o plasma), que não é produzida pelas células, Fig. 3.19D. No caso do tecido adiposo, a

matriz extracelular é quase inexistente, sendo as células bastante volumosas devido à grande acumulação de gorduras.

### *Tecido nervoso*

O tecido nervoso apresenta uma matriz extracelular bem desenvolvida, onde se encontram dispersos dois tipos básicos de células, Fig. 3.20. Os neurónios, envolvidos na condução do impulso nervoso, são o principal tipo de células deste tecido e apresentam prolongamentos, os axónios, que podem atingir mais de 1 metro de comprimento. O outro tipo de células são células da glia, ou neuroglias, com função de suporte e proteção dos neurónios.

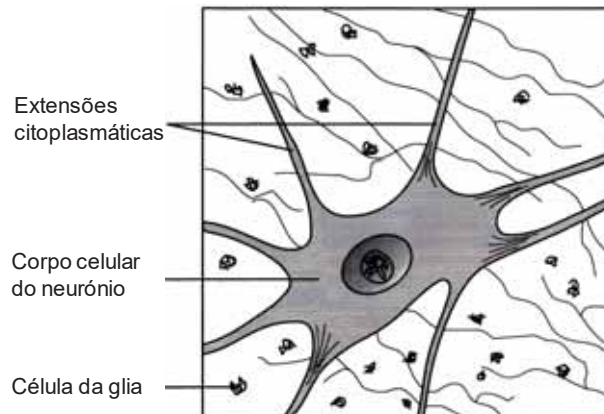


Fig. 3.20. Representação esquemática de tecido nervoso.

### *Tecido muscular*

O tecido muscular pode ser de 2 tipos: liso e estriado. As células do músculo liso são alongadas e finas, Fig. 3.21A, e encontram-se geralmente nas paredes de órgãos tubulares tais como o intestino e os vasos sanguíneos. As células musculares lisas contraem-se lentamente e são capazes de manter o estado de contração durante um longo período de tempo.

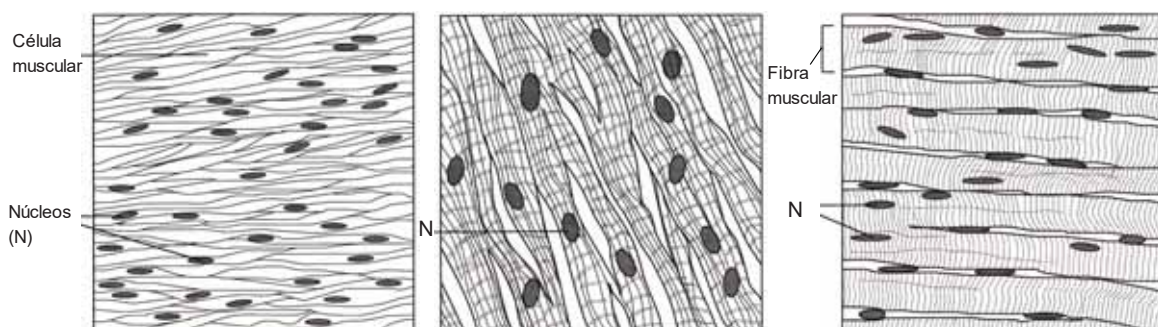


Fig. 3.21. Representação esquemática de tecido muscular. Liso (A). Estriado cardíaco (B). Estriado esquelético (C).

Existem dois tipos de músculo estriado, o cardíaco e o esquelético, Fig. 3.21B, C. O músculo cardíaco constitui as paredes das cavidades do coração. É constituído por células ramificadas, ligadas entre si, e a sua contração automática ritmada leva ao batimento cardíaco. Cada músculo esquelético é um feixe de centenas a milhares de fibras, sendo cada fibra uma célula gigante, com muitos núcleos (sincício), resultante da fusão de várias células.

### 3.3. Membrana plasmática

Todas as membranas protoplasmáticas são constituídas por uma bicamada fosfolipídica, na qual estão integradas as proteínas membranares, Fig. 3.22. Enquanto algumas proteínas se ligam à superfície polar dos lípidos, as proteínas extrínsecas, outras penetram na bicamada, podendo mesmo atravessá-la, as proteínas intrínsecas. As proteínas extrínsecas e as porções das proteínas intrínsecas que ocorrem à superfície da face exoplasmática possuem, frequentemente, resíduos de oligossacáridos, i.e., são glicoproteínas. Estes hidratos de carbono (oligossacáridos) parecem estar envolvidos num grande número de fenómenos fisiológicos, designadamente no reconhecimento e adesão celulares.

Embora possam existir lípidos neutros nas membranas, o duplo folheto é constituído, essencialmente, por fosfolípidos. À semelhança do que se passa com as proteínas, a distribuição dos lípidos na membrana é assimétrica. Assim, só existem glicolípidos na sua face exoplasmática.

Pese embora a unidade estrutural de todas as membranas protoplasmáticas, existem diferenças significativas entre as diversas membranas de uma mesma célula, no que diz respeito à composição fosfolipídica e proteica.

A bicamada fosfolipídica é impermeável à maioria das moléculas polares. De molde a assegurar o transporte destas moléculas através da membrana, existem proteínas específicas que promovem, de forma seletiva, a transferência dos diversos solutos. Muitas dessas proteínas são enzimas com locais específicos de ligação para as moléculas a transportar. Outras há que formam canais através dos quais pequenas moléculas podem deslocar-se por difusão, segundo gradientes de concentração e/ou eletroquímicos.

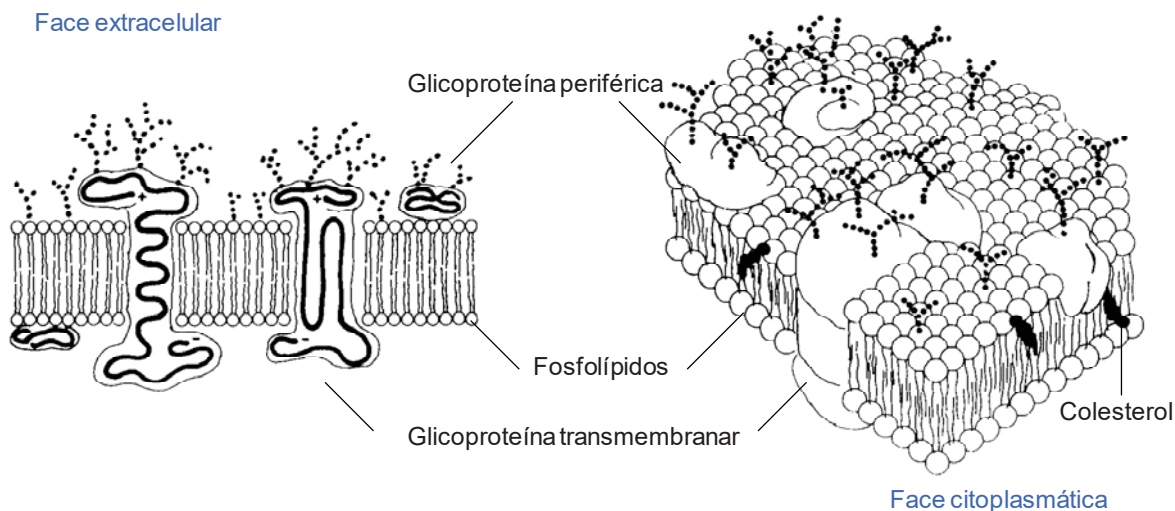


Fig. 3.22. Representação esquemática tridimensional de uma secção da membrana plasmática (também designada de plasmalema ou membrana celular).

Para assegurar o seu metabolismo, uma célula viva tem necessidade de trocar substâncias com o meio exterior, incluindo outras células. Essas trocas fazem-se através da membrana plasmática, que separa o meio intracelular do meio extracelular.

O transporte das mais diversas substâncias pode ser determinado por fenómenos de difusão. Neste caso, trata-se de transporte passivo, em que o movimento das moléculas de água e do soluto é determinado pela diferença de concentração entre os meios intra- e extracelulares, i.e.



pelo gradiente de concentração, ou devido à existência de potenciais de membrana, i.e. pelo gradiente eletroquímico.

As moléculas de água estão em constante movimento através da membrana plasmática, via aquaporinas. Esse movimento não se traduz em alterações visíveis da forma ou do tamanho da célula devido ao fluxo ser o mesmo em ambas as direções. Quando a concentração de um qualquer soluto difere, no interior e no exterior da célula, o fluxo da água é direcionado no sentido da maior concentração de soluto podendo, em consequência disso, a célula contrair-se ou dilatar-se, consoante os casos. Se a membrana plasmática é permeável às moléculas do soluto, então este difunde-se, sendo o seu fluxo inverso ao do da água.

Existem formas de transporte que não podem ser explicados por simples processos de difusão. Nesses casos intervêm transportadores específicos que tanto promovem o transporte a favor de gradientes de concentração, difusão facilitada, como contra esses gradientes. Quando o transporte é efetuado contra gradientes de concentração, transporte ativo, a célula tem necessidade de recorrer a moléculas de elevado potencial químico como, por exemplo, o ATP.

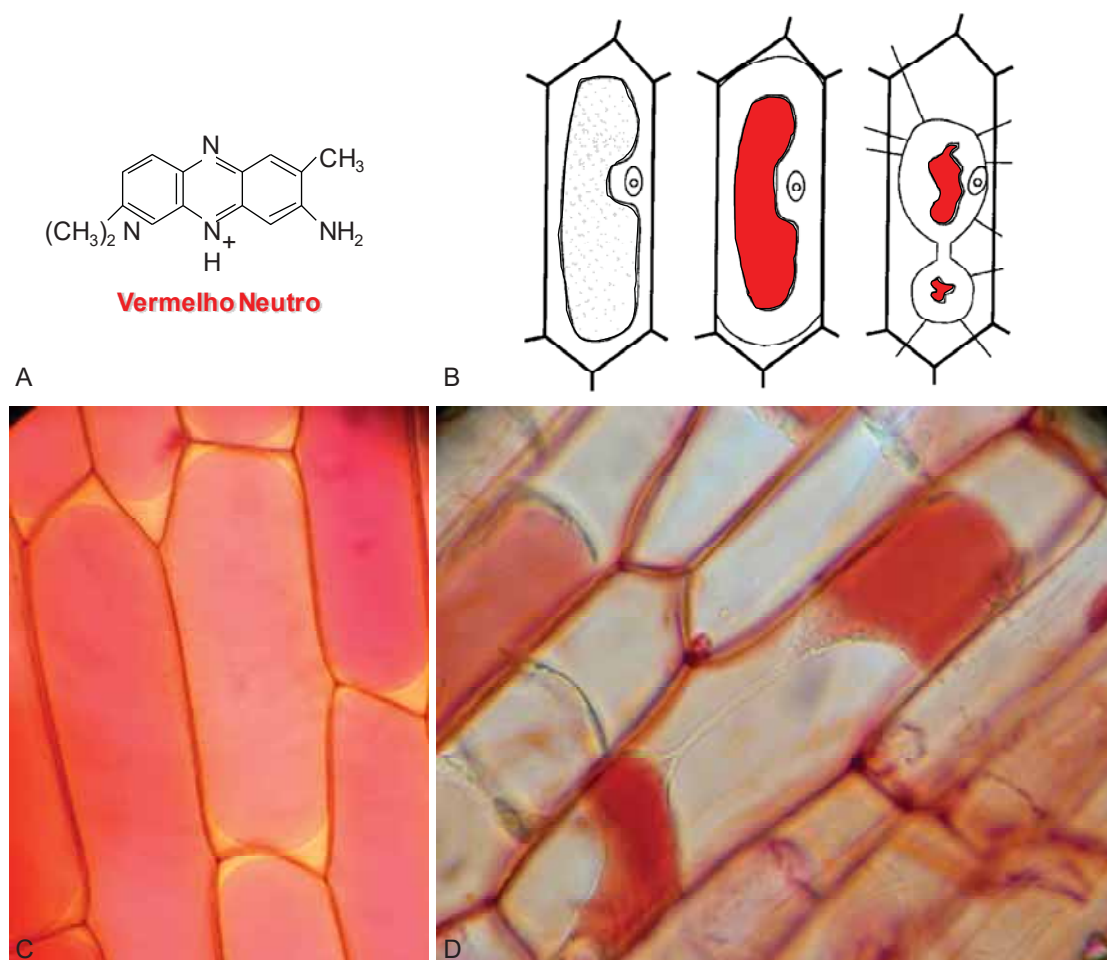


Fig. 3.23. Vermelho neutro (A). Resposta da célula vegetal (célula túrgida, início de plasmólise convexa e plasmólise côncava/convexa com trabéculas citoplasmáticas) às alterações da tonicidade do meio extracelular (B a D).

A água é o constituinte essencial da célula, representando 70-90% da massa total da componente citoplasmática. O teor em água da célula vegetal pode variar muito com o estágio fisiológico da planta ou com as condições hídricas do meio. No entanto, o grau de hidratação do

hialoplasma varia muito pouco. Com efeito, a perda e a acumulação de água verifica-se ao nível dos vacúolos, como pode ser comprovado pelos fenómenos de plasmólise e de turgescência, Fig. 3.23. Quando uma célula é colocada num meio com tonicidade superior à do fluido vacuolar (meio hipertónico) a água tende a sair do vacúolo, conduzindo à diminuição do seu volume, e à retração do citoplasma. Este fenómeno, designado plasmólise, é reversível, por deplasmólise, se o meio onde se encontram as células for substituído por uma solução hipotónica. Neste caso, a tonicidade do meio é inferior à do fluido vacuolar e, como tal, a água tende a entrar para os vacúolos, levando a um aumento do seu volume e pressionando o hialoplasma contra a parede celular. A célula diz-se, nesse caso, túrgida.

Os fenómenos de plasmólise e deplasmólise podem ser estudados recorrendo a corantes seletivos e vitais como o vermelho neutro, Fig. 3.23A. O corante seletivo é aquele que cora fundamentalmente uma estrutura celular para o qual é específico, neste caso, os vacúolos. Diz-se vital porque, apesar de corados, os vacúolos não manifestam alterações das suas propriedades vitais, pelo menos num curto período de tempo.

O vermelho neutro difunde-se até ao vacúolo acabando por se fixar ao coloide vacuolar eletronegativo. Os corantes vitais são, em regra, eletropositivos.

### 3.4. Movimentos de ciclose

Para que a atividade metabólica celular ocorra, é necessário que os substratos, as enzimas, os cofatores e os produtos do metabolismo intermediário se encontrem, virtualmente, em todos os locais do protoplasma. Em células de pequenas dimensões, como as das bactérias e a maioria das células animais, a simples difusão permite a rápida deslocação dos diversos solutos ao longo da célula. Sendo as células vegetais de grandes dimensões, algumas com 1 cm de comprimento, este processo é ineficaz. Basta recordar que o tempo despendido por uma molécula para percorrer, por difusão, um determinado espaço varia na razão direta do quadrado da distância percorrida. Não é, portanto, de surpreender, que algumas células vegetais apresentem correntes citoplasmáticas intensas, movimentos de ciclose, que arrastam solutos e organitos, Fig. 3.24. Estas correntes são direcionadas e permitem não só o contacto entre substratos e enzimas, produzidos em locais distantes da célula, como o transporte intercelular via plasmodesmos.

As correntes citoplasmáticas parecem ser geradas por filamentos de actina e miosina, tendo os microtúbulos a responsabilidade do direcionamento. A velocidade dos movimentos de ciclose varia com a intensidade luminosa, a temperatura e certos agentes químicos.

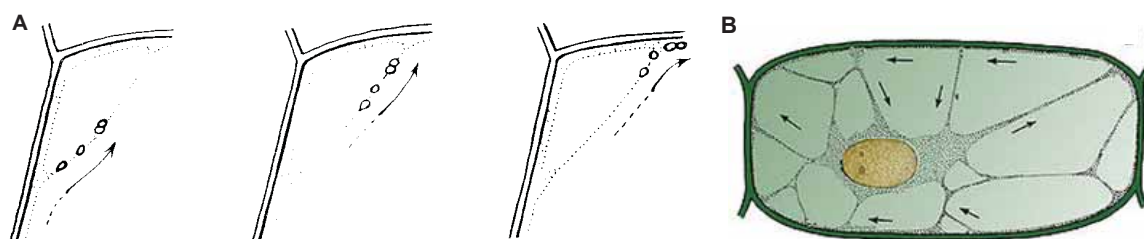


Fig. 3.24. Representação esquemática de movimentos de ciclose, pondo em evidência a deslocação de gotículas lipídicas através das trabéculas citoplasmáticas em células epidérmicas da escama de *Allium cepa* (A) e em células da epiderme adaxial da folha de *Tradescantia* sp. (B).



### 3.5. Vacúolos e inclusões vacuolares

Nas células vegetais observa-se um número variável de vacúolos cuja membrana, o tonoplasto, tem a capacidade de manter constante o pH ácido do fluido vacuolar. O volume ocupado pelo conjunto dos vacúolos, vacuoma, varia numa célula de 5 a 95%, dependendo do tipo de célula, Fig. 3.25. Na célula vegetal têm como função transportar ou armazenar nutrientes, metabolitos e produtos finais do metabolismo.

Os vacúolos surgem na célula jovem provavelmente por dilatação de cisternas do retículo ou por fusão de vesículas derivadas quer do retículo quer das cisternas do complexo de Golgi. Nas células meristemáticas, o vacuoma é reduzido e formado por pequenos vacúolos globulares ou filamentosos, dificilmente observáveis ao microscópio ótico. No decurso da diferenciação celular, os vacúolos são, entre os organitos celulares, os que apresentam desenvolvimento mais notável. Os minúsculos vacúolos das células meristemáticas fundem entre si originando, muitas vezes, no final da diferenciação, um único vacúolo de grandes dimensões, Fig. 3.25.

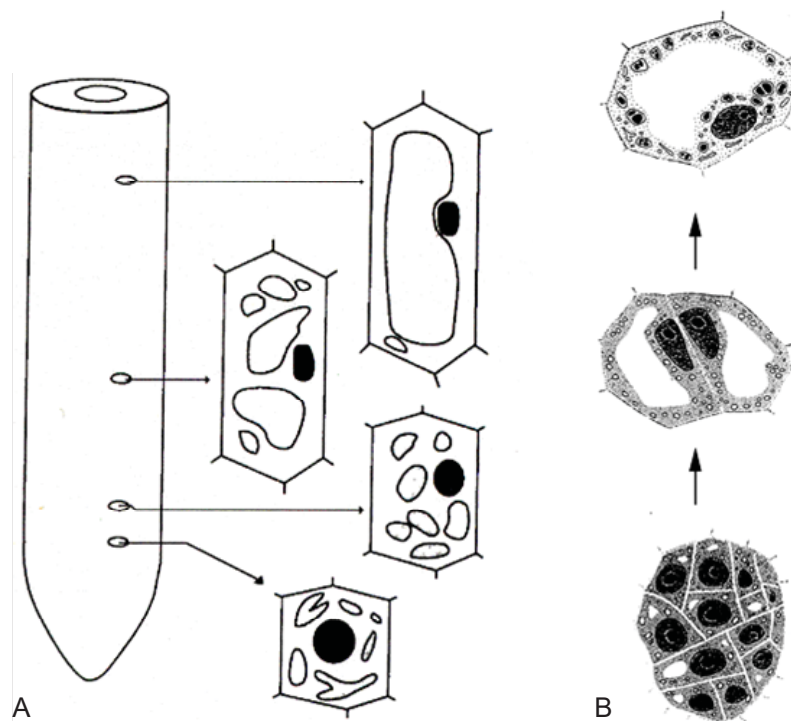


Fig. 3.25. Representação esquemática da evolução vacuolar numa raiz (A). Representação do aspeto celular da evolução vacuolar (B).

A simples função de ocupação de espaço pelos vacúolos, é extremamente importante nos vegetais, uma vez que estes têm de crescer para captar energia solar. A estabilidade mecânica conferida pela combinação da rigidez da parede celular e da pressão hídrica nos vacúolos, permite que as células vegetais atinjam dimensões apreciáveis. A produção de células de grandes dimensões, preenchidas unicamente por citosol, seria dispendioso quer em termos de síntese inicial quer em termos de manutenção. Embora algumas células sintetizem mais hialoplasma à medida que se diferenciam, a maioria acumula água em pequenos vacúolos, que coalescem formando um único vacúolo. Esse vacúolo pode ser atravessado por trabéculas citoplasmáticas e, muitas vezes, o hialoplasma aparece comprimido numa pequena faixa, entre o tonoplasto e a parede celular.

O fluido vacuolar é essencialmente constituído por água contendo, em solução ou suspensão, diversas substâncias. O vacúolo pode armazenar muitos tipos de compostos, em particular, substâncias potencialmente nefastas para a célula quando em concentrações elevadas no resto do citoplasma.

A permeabilidade diferencial da membrana plasmática e do tonoplasto determina que o hialoplasma e o vacúolo apresentem composição diversa, relativamente a certos solutos.

Como a resistência mecânica do tonoplasto é relativamente baixa, a pressão hídrica deve manter-se aproximadamente igual no hialoplasma e no vacúolo; ambos devem atuar conjuntamente no controlo do balanço osmótico, mantendo desse modo a turgidez celular.

### 3.5.1. Conteúdo vacuolar

O conteúdo vacuolar é complexo, e a natureza dos compostos aí acumulados é variável em função da espécie, do tipo celular e do estágio fisiológico. Algumas substâncias acumulam-se exclusivamente no vacúolo (antocianinas, inulina, etc.), enquanto outras podem encontrar-se igualmente no hialoplasma (sacarose, malato, aminoácidos). Entre os produtos armazenados no vacúolo encontram-se alguns de utilidade metabólica imediata. Algumas plantas captam CO<sub>2</sub> durante a noite e armazenam-no no vacúolo sob a forma de malato, até que, em presença de energia luminosa, o possam utilizar na síntese de açúcares. O vacúolo pode acumular também macromoléculas, por períodos mais ou menos longos, como é o caso do armazenamento de proteínas em muitas sementes.

Alguns dos compostos armazenados no vacúolo podem desempenhar papel na interação planta / animal. Como exemplo, refira-se a acumulação de antocianinas nas pétalas, como forma de atrair os polinizadores. Os compostos do vacúolo nem sempre têm um papel tão inofensivo. As plantas sintetizam e armazenam no vacúolo, grande variedade de compostos tóxicos que são libertados quando as células são ingeridas ou, de alguma forma, danificadas. Estes compostos vão desde alcaloides extremamente tóxicos até inibidores da digestão, de sabor desagradável.

As substâncias incorporadas no vacúolo podem ser agrupadas segundo a sua natureza em:

#### *Sais minerais*

A acumulação de nitratos, em particular nitrato de potássio, fosfatos e iodetos é comum em certas algas como *Fucus* e *Laminaria*.

#### *Substâncias orgânicas*

Entre as substâncias orgânicas acumuladas no vacúolo encontram-se os ácidos orgânicos (ácido málico na maçã, ácido cítrico no limão, ácido oxálico nas azedas), pigmentos, cumarinas, proteínas, taninos, aminoácidos, alcaloides (morfina e cafeína) e glúcidos (glucose e frutose em diversos frutos, sacarose na cana de açúcar e na beterraba sacarina, inulina nas raízes da chicória), Fig. 3.26A.

A inulina, extraída pela primeira vez da *Inula helenium*, é um glúcido de reserva acumulado nos órgãos subterrâneos, em particular das plantas da família das Compostas e das Campanuláceas, muitas vezes até 15% do seu peso seco. A inulina é constituída por várias unidades de frutofuranose unidas por ligações  $\beta(2-1)$  com um resíduo de sacarose terminal, Fig. 3.26A. Enquanto a célula está viva, este glúcido existe em solução coloidal no interior do vacúolo. Por desidratação artificial, numa série ascendente de álcoois, ocorre a sua cristalização de encontro à parede celular. Formam-se numerosos cristais que se agregam, dando origem a uma estrutura em

forma de leque, Fig. 3.26B e C.

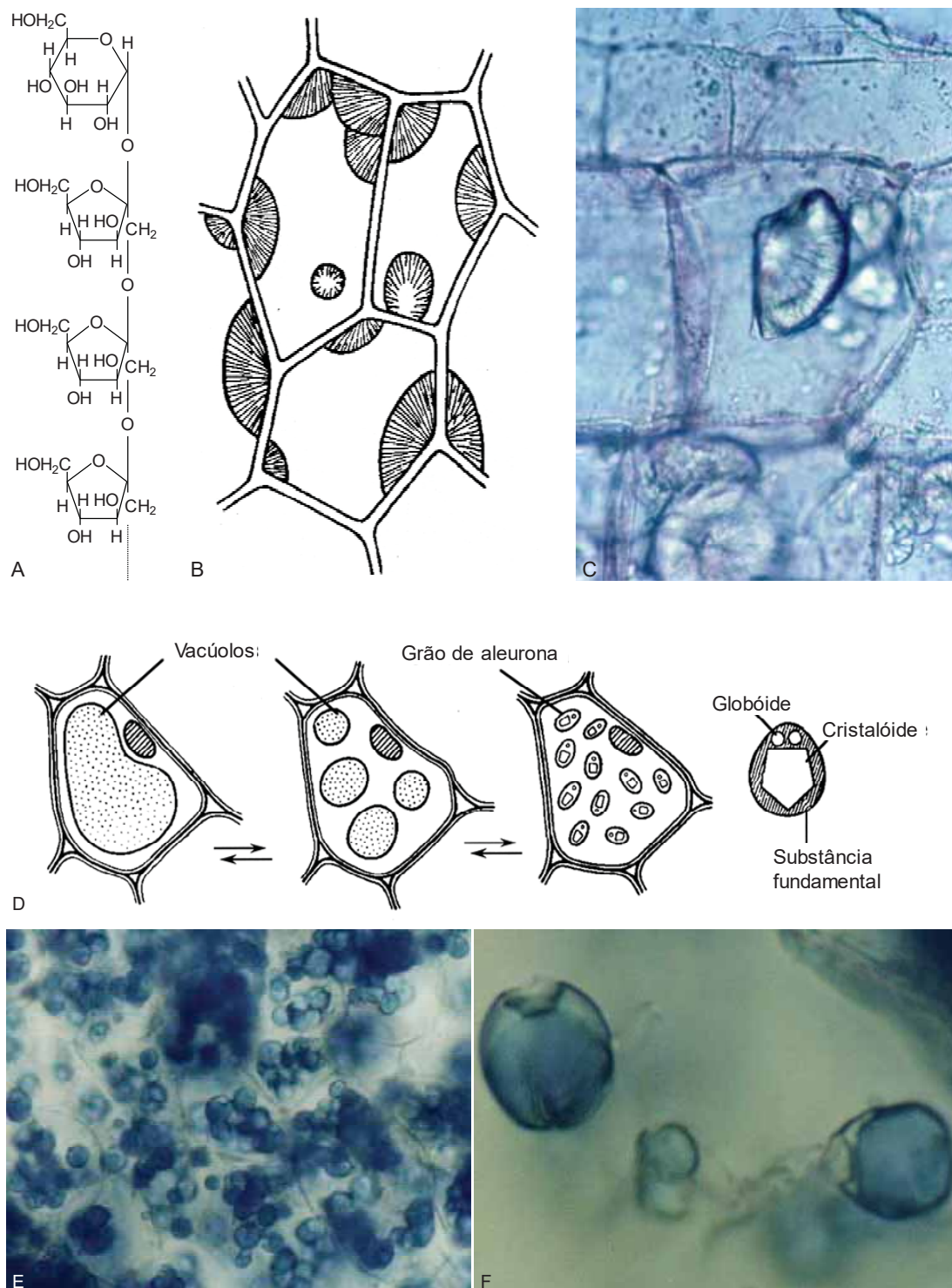


Fig. 3.26. Fórmula da inulina (A). Formação dos esferocristais de inulina por desidratação em álcool do conteúdo vacuolar (B, C). Formação de grãos de aleurona durante a fase de maturação da semente (da esquerda para a direita) e sua hidratação durante a fase de germinação (da direita para a esquerda) (D). Observação dos grãos de aleurona em microscopia ótica (E, F).

A acumulação de proteínas no vacúolo é também frequente, em particular sob a forma de corpos proteicos entre os quais se salientam os grãos de aleurona. Em algumas sementes fortemente desidratadas, as células do tecido de reserva não apresentam vacúolos de conteúdo líquido. Nas sementes jovens e ainda não desidratadas, o parênquima de reserva é formado por células com grandes vacúolos. Durante a maturação, a desidratação dos tecidos está associada à fragmentação dos vacúolos noutros mais numerosos e de menores dimensões. Durante esta fase são aí lançadas substâncias de reserva, essencialmente proteínas. Numa fase final, o conteúdo dos vacúolos solidifica, constituindo-se os grãos de aleurona. No caso da semente de rícino, estes grãos, bastante volumosos, apresentam uma substância fundamental contendo um ou dois globoides (constituídos essencialmente por um sal derivado do hexafosfato de inositol) e uma importante inclusão proteica, de contorno poligonal, o cristaloide, Fig. 3.26D. O cristaloide e a substância fundamental são essencialmente constituídos por proteína.

Durante a germinação, as células da semente sofrem uma re-hidratação. Os grãos de aleurona aumentam de volume e dissolvem-se por ação de enzimas. Os vacúolos assim formados aumentam de tamanho, fundem-se e dão origem a um único vacúolo de grandes dimensões. Durante a germinação o vacuoma evolui de forma inversa à observada durante a maturação, Fig. 3.26D.

Por vezes, o fluido vacuolar é corado devido à presença de pigmentos, genericamente denominados antocianinas. Numerosas flores e frutos assim como folhas de certas plantas ornamentais, devem a sua cor à presença das antocianinas. As antocianinas possuem dois núcleos benzénicos, A e B, ligados a um anel heterocíclico central, contendo oxigénio, Fig. 3.27. A cor das antocianinas depende quer do grau de hidroxilação ou metilação do anel B (a hidroxilação, e é responsável pelas tonalidades azuis, enquanto a metilação pelas tonalidades vermelhas), quer do grau de quelação (os iões metálicos são quelados por alguns hidroxilos e modificam a cor inicial, em geral na direção da tonalidade azul), quer do pH, quer dos hidratos de carbono associados à molécula. Estes pigmentos são, em geral, vermelhos em meio ácido e azuis ou púrpura em meio alcalino. No entanto, são instáveis em meio de elevada alcalinidade porque, nessas condições, o anel heterocíclico tem tendência a cindir.

### *Oxalato de cálcio*

O ácido oxálico é um ácido dicarboxílico, Fig. 3.28. No vacúolo, este ácido pode formar oxalatos solúveis de sódio e potássio, ou oxalatos insolúveis e cristalinos na presença de catiões divalentes como o cálcio, magnésio, bário ou estrôncio. A formação de cristais de oxalato de cálcio é uma biomineralização que merece algum detalhe, já que é um processo tipicamente vegetal. A cristalização ocorre em muitas espécies (folhas de begónia, rícino, cebola, etc.), mas apenas em certas células, de maiores dimensões, ditas cristalíferas, dispersas no parênquima e nos tecidos condutores. As acumulações de oxalato de cálcio aparecem como cristais de formas muito diversas, que dependem da espécie, do grau de hidratação e das condições de cristalização (pH, velocidade): cristais prismáticos (nas escamas externas do bolbo da cebola), cristais em agulha ou ráfides (no pericarpo da banana, nas folhas do *Aloe* sp.) maclas de cristais em pirâmide ou drusas (na folha de *Nerium oleander*, no caule de *Humulus lupulus*), etc., Fig. 3.28. Num mesmo órgão podem existir diferentes formas.

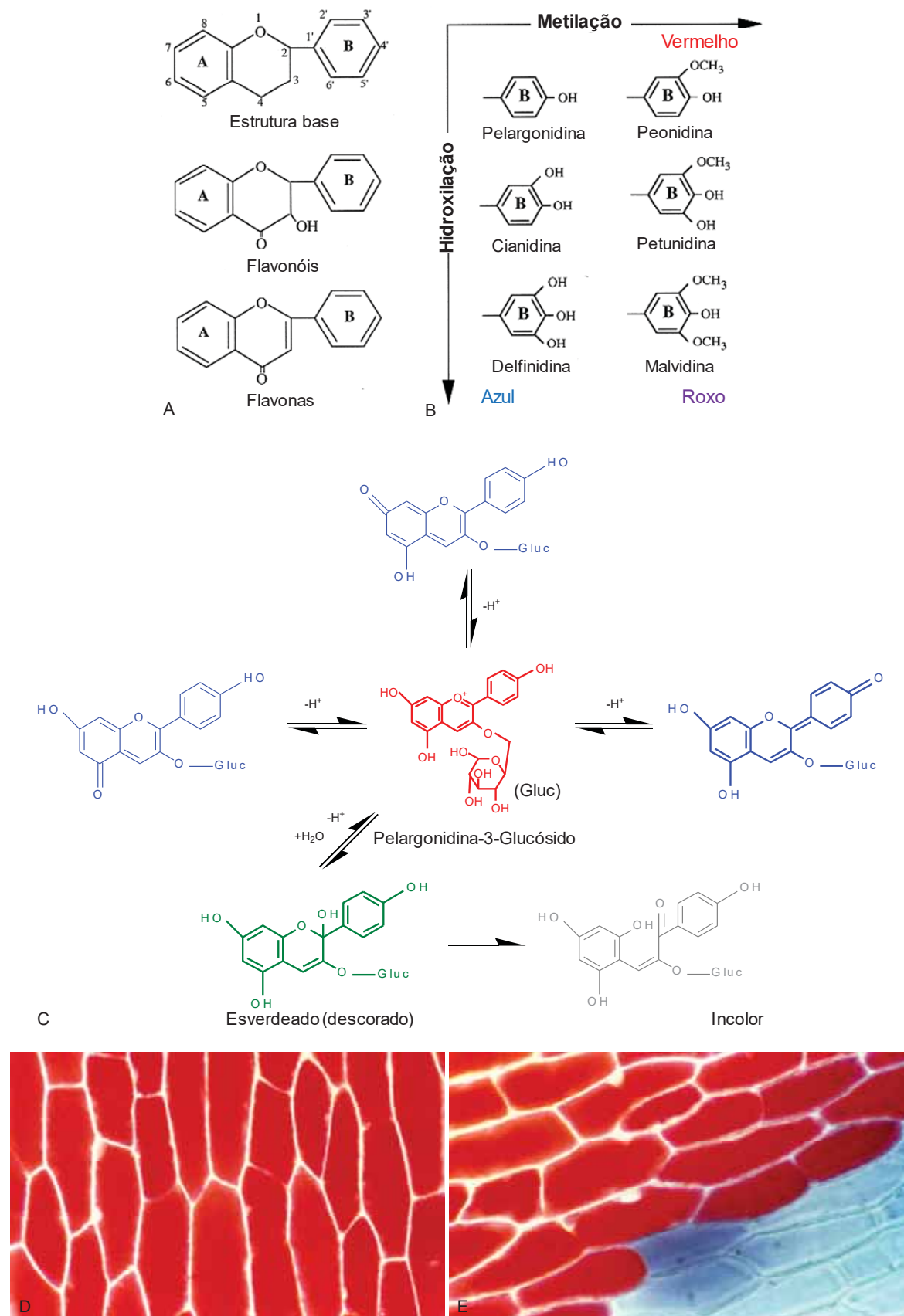


Fig. 3.27. Estrutura base das antocianinas (A). Relação entre a cor das antocianinas e o grau de hidroxilação e metilação do anel B (B). Variação estrutural das antocianinas em solução aquosa a diferentes valores de pH (C). Observação de vacúolos corados em microscopia ótica (D, E).



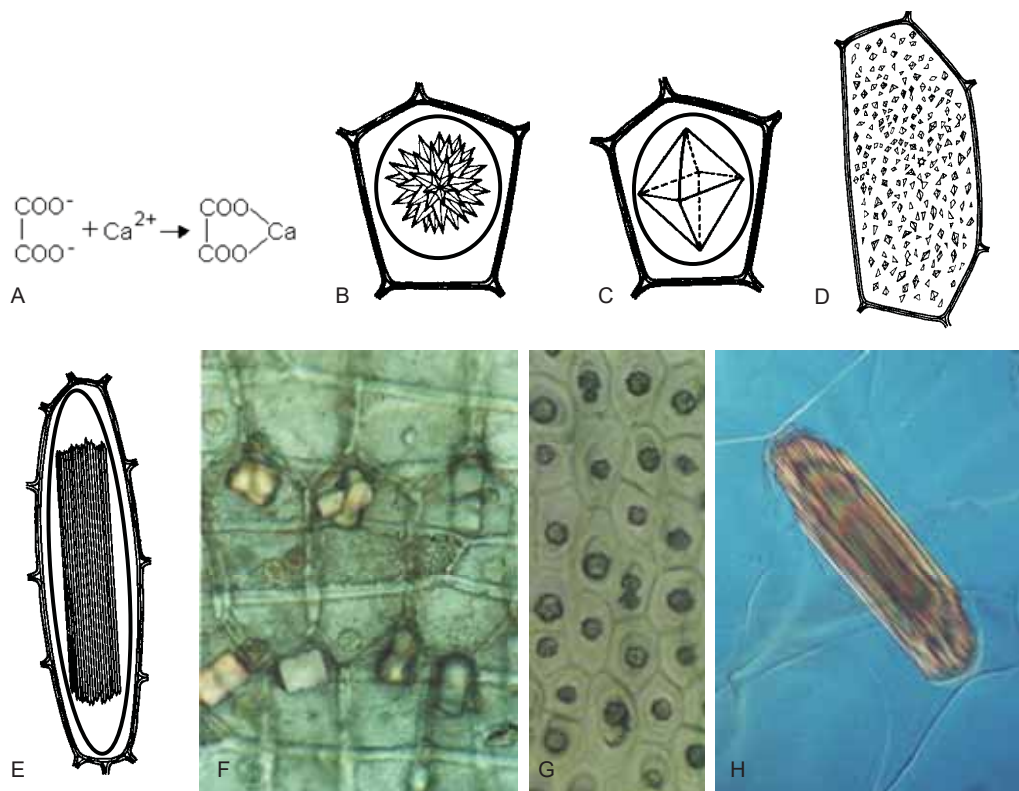


Fig. 3.28. Conversão do ácido oxálico em oxalato de cálcio (A). Representações esquemáticas de cristais de oxalato de cálcio: drusa (B), cristal tetraédrico (C), pequenos cristais dispersos (D) e feixe de ráfides (E). Observações em microscopia ótica: cristais prismáticos (F), drusas (G) e feixe de ráfides (H).

Os diferentes tipos de substâncias que podem ser acumuladas no vacúolo, acima descritas, podem ainda ser agrupadas segundo derivam do metabolismo primário da planta, i.e. são intermediários normais do metabolismo celular resguardados temporária ou permanentemente do hialoplasma (ácido málico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido ascórbico, sacarose, inulina, aminoácidos e proteínas), ou do metabolismo secundário, i.e. de vias biossintéticas mais especializadas (antocianinas, cumarinas, taninos, alcaloides). Este último grupo de substâncias, tido durante muito tempo como desperdícios fisiológicos, é atualmente considerado como um conjunto de compostos que intervém numa maneira subtil nos equilíbrios naturais e nas relações planta / animal e planta / patógenos, quer como agentes de atração, quer como repelentes e meios de defesa.

### 3.6. Plastos

Como se referiu anteriormente, são basicamente duas as características que diferenciam as células vegetais das células animais: a presença de parede celular e a capacidade de realizar a fotossíntese.

A nutrição vegetal está dependente da produção de compostos orgânicos durante a fotossíntese. Nos vegetais superiores esta função ocorre nos cloroplastos. Os produtos da fotossíntese podem ser utilizados diretamente em diversos processos biossintéticos, armazenados sob a forma de amido, um polissacárido osmoticamente inerte, ou convertidos em sacarose, um açúcar de baixo peso molecular, que é transportada até outros tecidos da planta, consoante as suas necessidades metabólicas.



Os cloroplastos fazem parte de um grupo mais vasto de organitos, intimamente relacionados, os plastos. Possuem como características comuns, dimensão superior à das mitocôndrias, invólucro constituído por duas membranas e genoma próprio. De acordo com a coloração que manifestam, é possível distinguir cloroplastos (verdes), cromoplastos (amarelos, alaranjados ou vermelhos) e amiloplastos e leucoplastos (incolores). Os dois primeiros tipos são muitas vezes referenciados como cromatóforos.

Todos os plastos evoluem a partir de proplastos, organitos relativamente pequenos, que se encontram nas células meristemáticas. Estes proplastos desenvolvem-se de acordo com as necessidades e condições ambientais de cada célula em diferenciação. Se a célula se desenvolve na escuridão, os proplastos evoluem para estioloplastos, organitos com arranjo membranar interno semicristalino e com protoclorofilida, um precursor amarelo da clorofila. Se expostos à luz, os estioloplastos originam cloroplastos, por conversão da protoclorofilida em clorofila bem como pela síntese de mais componente membranar, pigmentos, enzimas e componentes da cadeia de transporte eletrónico.

### 3.6.1. Cloroplastos

Os cloroplastos são organitos citoplasmáticos existentes nas células vegetais fotossintéticas, Fig. 3.29. Nas células dos vegetais superiores o seu número é variável. Apresentam-se, em geral, sob a forma de discos lenticulares de 3-10µm de diâmetro e 1-2µm de espessura. São facilmente observados ao microscópio ótico devido à presença de clorofila que lhes confere a coloração verde característica.

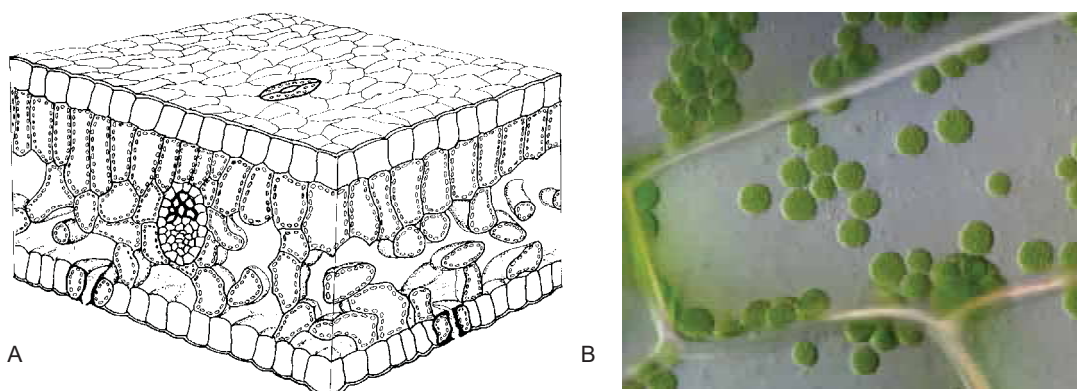


Fig. 3.29. Distribuição dos cloroplastos numa folha de um vegetal superior (A). Observação, em microscopia ótica, de cloroplastos numa folha de *Elodea* sp<sup>2</sup> (B).

As clorofilas *a* e *b* e os carotenoides (carotenos, xantofilas e licopenos) são os pigmentos mais importantes nos cloroplastos dos vegetais superiores. Estes pigmentos apresentam espectros de absorção característicos e são os responsáveis pela absorção de energia luminosa, que fazem graças à presença de ligações duplas conjugadas. Do ponto de vista químico, as clorofilas são complexos porfirino-magnesianos. Por seu turno, os carotenoides são pigmentos de natureza terpénica, lipossolúveis e de cor amarela, laranja ou vermelha.

Nas algas castanhas, a cor verde, devida às clorofilas *a* e *c*, está mascarada por um caroteno de cor amarelo-acastanhada, a fucoxantina. As algas vermelhas e azuis possuem, além dos carotenoides, clorofila *a* e pigmentos de natureza proteica, as ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina e

<sup>2</sup> *Elodea canadensis* é uma espécie exótica e invasora em Portugal pelo que não é permitida a sua plantação e propagação.

aloficocianina). Outros tipos de clorofila, nomeadamente *c*, *d* e *e*, existem apenas em alguns grupos vegetais. Por seu turno, a bacterioclorofila encontra-se apenas nas bactérias autotróficas.

Em microscopia eletrónica observa-se o invólucro cloroplastidial constituído por duas membranas: a membrana externa e a membrana interna. Em alguns casos, a membrana interna invagina-se originando uma rede complexa de túbulos, o retículo periférico.

O invólucro cloroplastidial delimita o estroma onde se encontram diversos sáculos achatados de natureza membranar, os tilacoides.

Os tilacoides estão, regra geral, orientados segundo o eixo maior do cloroplasto. Em termos anatómicos, distinguem-se dois tipos de tilacoides: os tilacoides dos grana (discos achatados e empilhados uns sobre os outros que correspondem, em microscopia ótica, às zonas de verde mais intenso) e tilacoides do estroma (membranas tilacoidais polimórficas que aparecem no estroma, unindo entre si tilacoides de *grana* diferentes ou de um mesmo *granum*, Fig. 3.30.

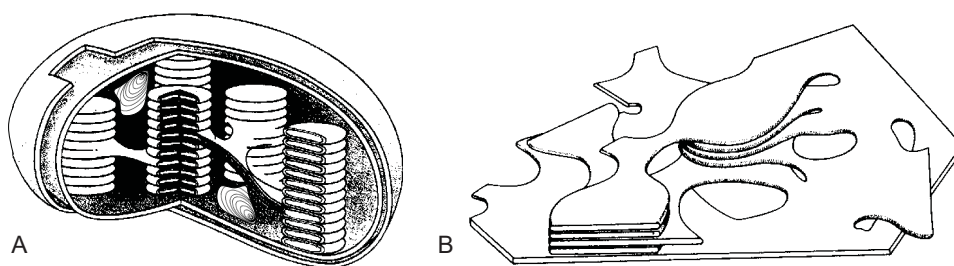


Fig. 3.30. Representação esquemática da estrutura de um cloroplasto (A) e da organização dos tilacoides dos grana e do estroma (B).

No estroma finamente granular, observam-se diferentes inclusões: glóbulos osmiófilos ou plastoglóbulos, grãos de amido, ribossomas e DNA plastidial agrupado em nucleoides. Dos constituintes do estroma, apenas os grãos de amido são observáveis em microscopia ótica, surgindo como estruturas refringentes quando não corados.

### Diversidade estrutural dos cloroplastos

A estrutura cloroplastidial descrita é típica dos vegetais superiores. Nas algas verdes, por exemplo, os tilacoides formam pilhas de contorno mais ou menos irregular. Nas algas castanhas e nas diatomáceas os tilacoides agrupam-se em conjuntos de três ao longo do eixo maior do cloroplasto. Já nas algas vermelhas, os tilacoides estão todos separados uns dos outros. Como se referiu, nestas algas, a cor verde da clorofila está mascarada por pigmentos vermelhos de natureza proteica, as ficobilinas. Estes pigmentos associam-se formando partículas, ficobilissomas, ligadas à face estromática dos tilacoides.

Os cloroplastos sem grana ocorrem igualmente nos vegetais superiores, como na cana-de-açúcar e no milho. Este tipo de cloroplastos existe apenas nas células que envolvem os feixes libero-lenhosos das folhas. Nas restantes células, os cloroplastos apresentam estrutura típica.

A forma e o número dos cloroplastos variam de organismo para organismo. Numerosas algas unicelulares ou filamentosas possuem apenas um ou dois cloroplastos por célula, que são de dimensões superiores aos observados nos vegetais superiores. É o caso da *Spirogyra*, *Zygnema* e *Mougeotia*, Fig. 3.31.

Para além da forma e dimensão diferente, os cloroplastos das algas possuem ainda um índice de primitividade não detetada nos vegetais superiores, que é a presença de pirenoide. O pirenoide

é uma estrutura, de natureza proteica, diferenciada do estroma, que apresenta em microscopia eletrónica uma estrutura finamente granular, e em redor do qual se acumula o amido. Esta particularidade torna-os facilmente identificáveis em microscopia ótica, recorrendo ao reagente Lugol, que revela o amido depositado em torno do pirenoide.

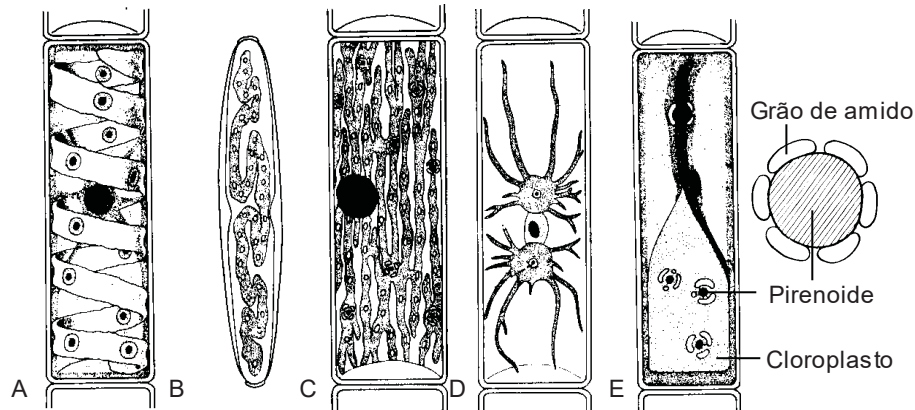


Fig. 3.31. Diversidade morfológica dos cloroplastos das algas: *Spirogyra* sp. (A), *Pleurosigma angulatum* (B), *Oedogonium* sp. (C), *Zygnema* sp. (D), *Mougeotia* sp. (E), com pormenor de um pirenoide.

### 3.6.2. Leucoplastos

Os leucoplastos (plastos incolores) existem em órgãos vegetativos expostos à luz (epiderme e tricomas glandulares) e em órgãos subterrâneos (raízes, bolbos e tubérculos), Fig. 3.32.

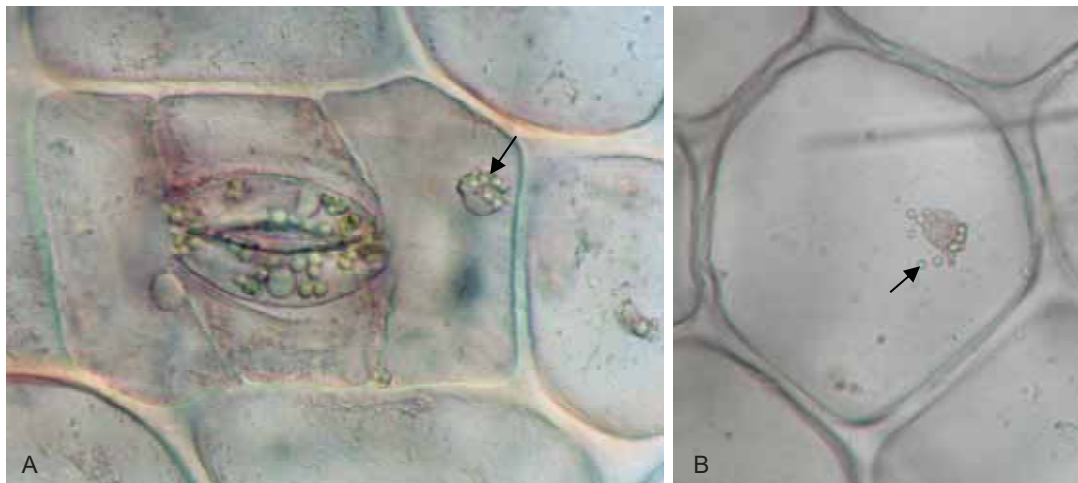


Fig. 3.32. Observação, em microscopia ótica, de leucoplastos rodeando o núcleo (↓).

Os leucoplastos totalmente diferenciados não possuem ribossomas 70S, típicos dos plastos, nem sistema tilacoidal autónomo, independente do invólucro plastidial. O estroma é, muitas vezes, menos denso do que o dos cloroplastos. A membrana interna do invólucro pode invaginar-se, formando um reticulado interno.

Os leucoplastos podem acumular amido ou proteínas ou participar na síntese de óleos essenciais e resinas em células glandulares (canais secretores do pinheiro, tricomas glandulares das Labiadas, entre outros).

### 3.6.3. Amiloplastos

Os amiloplastos existem sobretudo em caules subterrâneos, raízes tuberculosas e sementes. Dizem-se polimórficos dadas as diferentes formas que assumem, em função do número e volume dos grãos de amido acumulados: lenticulares, piriformes, cónicos ou poligonais. Também a sua dimensão pode variar de 1-175µm. Este tipo de plastos acumula grande quantidade de amido, não possui pigmentos e a sua ultra estrutura é muito simples. O estroma reduz-se a uma estreita faixa, comprimida entre os grãos de amido e o invólucro plastidial, e as estruturas membranares são raras.

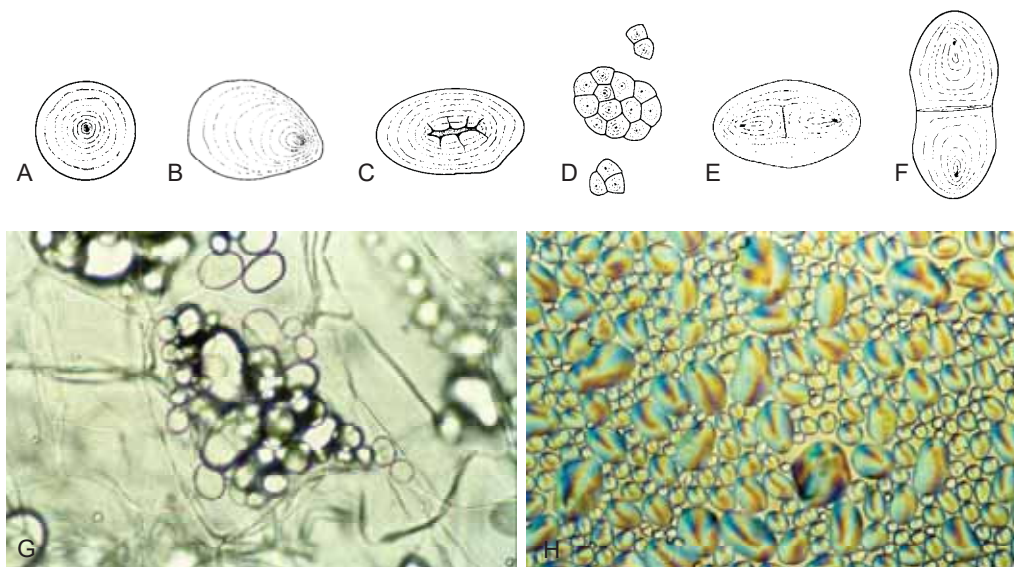


Fig. 3.33. Representação esquemática de diversos tipos de grãos de amido simples de: trigo (A), batata (B), feijão (C), aveia (grãos simples associados) (D); semi-composto da batata (estrias comuns) (E) e composto da batata (F). Observação de grãos de amido em microscopia ótica (G, H).

A deposição do amido faz-se em camadas sucessivas em torno de um ponto, o hilo, Fig. 3.33. Em determinadas circunstâncias, a deposição do amido é tão elevada que este acaba por ocupar todo o plasto.

As estrias mais ou menos concêntricas, que se observam em torno do hilo dos grãos de amido de algumas espécies, devem-se à deposição de amilose e amilopectina. Ambas são polissacáridos com ligações  $\alpha$  (1-4) mas com características físico-químicas diferentes: enquanto a amilose é um polímero linear solúvel em água quente, a amilopectina é um polímero ramificado e insolúvel. A proporção entre estes dois constituintes depende do tecido e da espécie em estudo (por exemplo, a amilose representa 16% nos grãos de amido da banana, 20% na batata, 25% no trigo e 50% em algumas variedades de pera), e determina a tonalidade apresentada quando corados com o reagente de Lugol.

### 3.6.4. Cromoplastos

A coloração dos cromoplastos deve-se à presença de xantofilas (amarelo), carotenos (laranja) ou licopenos (vermelho). Estes pigmentos existem no estroma sob a forma de gotículas ou de estruturas cristalinas.

Os cromoplastos são observados em células epidérmicas de pétalas de algumas flores



(gladiolos, amores-perfeitos, chagas, túlipas, calêndulas, entre outros), no pericarpo de alguns frutos (tomate, fruto da roseira, entre outros) e em algumas raízes como, por exemplo, a da cenoura, Fig. 3.34.

Do ponto de vista da microscopia ótica, é possível distinguir dois tipos de cromoplastos relativamente à sua morfologia: fibrilhares, de forma alongada, e globulares, de secção arredondada. Já do ponto de vista ultra estrutural, são propostos vários tipos de cromoplastos (fibrilhares, globulares, cristalinos, membranosos, tubulares ou reticulotubulares), dependendo das estruturas que, no interior do cromoplasto, contêm os pigmentos carotenoides.

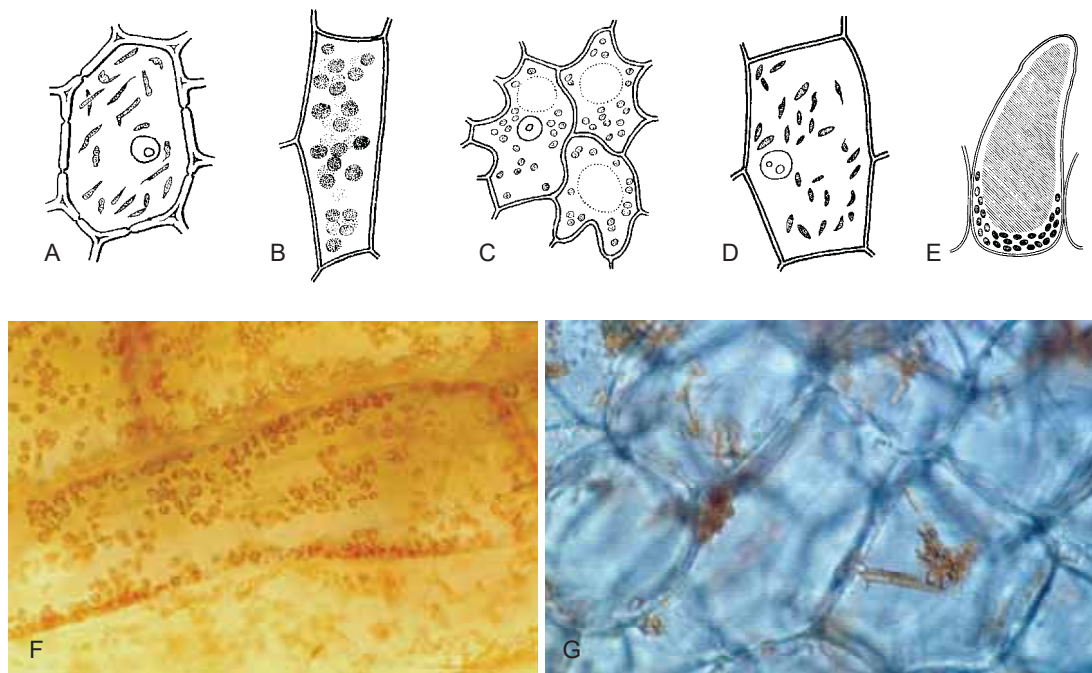


Fig. 3.34. Representação esquemática de diferentes tipos de cromoplastos. *Rosa canina* (A), *Calendula vulgaris* (B), *Forsythia suspensa* (C), *Gladiolus* sp. (D), *Viola tricolor* (E). Observação de cromoplastos em microscopia ótica (F, G).

### 3.6.5. Proteoplastos

Este tipo de plastos, também designados aleuoplastos ou proteinoplastos, é pouco frequente. Observam-se no saco embrionário de algumas espécies e no parênquima radicular de algumas orquídeas. As proteínas acumulam-se no estroma sob a forma de corpos cristalinos, de feixes ou fibrilhas.

### 3.6.6. Oleoplastos

Também designados por elaioplastos, este tipo de plastos ocorre com pouca frequência. Observam-se sobretudo em células epidérmicas. Acumulam lípidos no estroma sob a forma de plastoglóbulos ou gotículas lipídicas.

## 3.7. Núcleo

O núcleo é a unidade estrutural e funcional de importância vital para a célula, responsável pelas características hereditárias sob a forma de DNA replicável.



Nos eucariotas, o núcleo existe em todas as células, exceto nos eritrócitos dos vertebrados superiores. A sua forma determinada pelo tipo de célula e pressão vacuolar, é variável: esférica, oblongo, discoide, lobulada ou ameboide. De igual modo, tanto a sua dimensão (que está estritamente relacionada com a massa citoplasmática: relação núcleo/citoplasma) como a sua localização na célula variam com o tipo celular, Fig. 3.35.

De um modo geral, as células não possuem mais de um núcleo. No entanto, não é raro observarem-se células, como por exemplo no fígado, com dois núcleos. Atendendo ao modo de formação, as células polinucleadas são designadas plasmódios (quando a multiplicação nuclear não é acompanhada pela correspondente citocinese) ou sincícios (quando resultam da fusão de várias células).

Ao microscópio ótico, os núcleos apresentam-se como zonas mais ou menos refringentes, raras vezes com movimentos muito lentos de rotação e oscilação. Após coloração com corantes básicos, observam-se, no seio do nucleoplasma pouco corado, o nucléolo e zonas mais cromófilas, constituindo estas a rede de cromatina.

A presença de invólucro nuclear, separando o nucleoplasma do hialoplasma, é a principal característica que permite distinguir os organismos eucariotas dos procariotas. Ao microscópio eletrónico, o invólucro nuclear aparece como uma diferenciação local do retículo endoplasmático, caracterizada pela presença de numerosos poros, poros nucleares, Fig. 3.35, e ribossomas na face hialoplasmática da membrana externa. O espaço entre a membrana interna e a externa é designado espaço perinuclear.

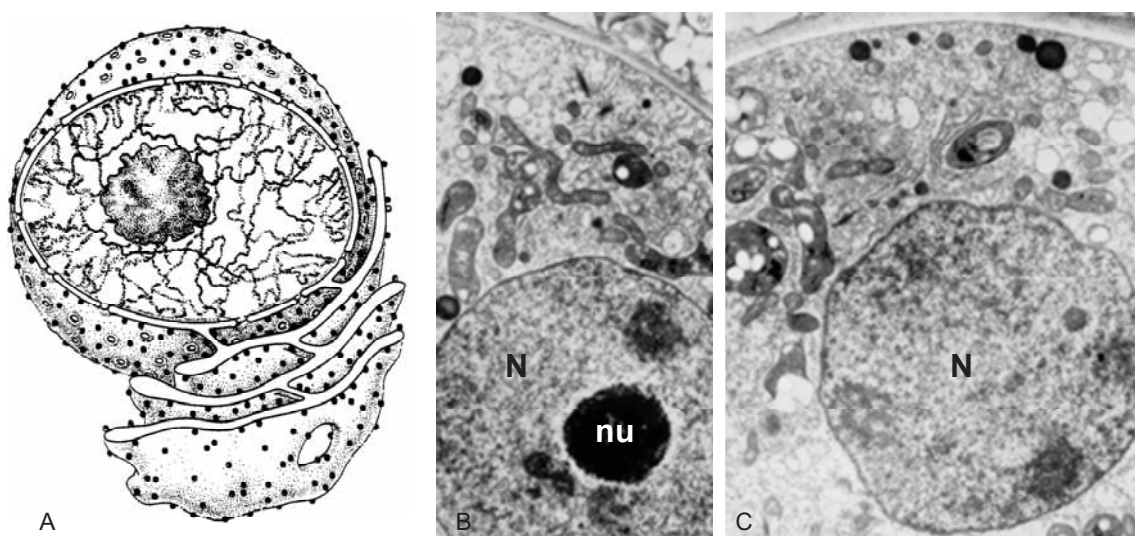


Fig. 3.35. Representação esquemática do núcleo interfásico (A). Núcleo interfásico observado em microscopia eletrónica de transmissão (B, C). N – núcleo, nu – nucléolo.

Nos eucariotas, o nucleoplasma é um gel proteico com propriedades comparáveis às do citoplasma.

Os nucléolos, Fig. 3.35, são estruturas densas, esféricas ou ovóides, em número definido nos núcleos profásicos e interfásicos de todos os organismos superiores. Os nucléolos são diferenciações cromossómicas funcionais, responsáveis pela síntese da quase totalidade do RNA ribossomal.

A cromatina é uma zona densa, de estrutura fibrilar, que cora com corantes básicos (os grupos fosfato dos ácidos nucleicos, carregados negativamente, fixam corantes com carga

positiva) sendo a este nível que o DNA cromossómico se associa às histonas (proteínas acidófilas).

O tempo que medeia duas divisões celulares sucessivas designa-se interfase. Durante este período, o núcleo, núcleo interfásico, aparentemente em repouso, controla a síntese proteica, a glicólise, a síntese de ATP, e outros processos vitais. Pouco tempo antes da divisão celular, o núcleo assegura a duplicação da informação hereditária, promovendo a síntese de novo DNA. O controlo da atividade celular deve-se à transmissão, para o citoplasma, da informação contida no DNA, por intermédio do RNA mensageiro.

### 3.7.1 Ciclo celular

O período de vida de uma célula começa quando esta se forma por divisão da célula mãe e acaba quando a célula dá origem a uma célula filha, ou quando ocorre morte celular. O ciclo celular compreende um conjunto de fenómenos que ocorrem numa célula, desde que se forma, por divisão da célula-mãe, até ao momento em que dá origem a células filhas. O ciclo celular pode ser dividido em duas fases: a fase M, que compreende a mitose e citocinese, e a interfase, Fig. 3.36. A duração do ciclo celular requer períodos variáveis de tempo, dependendo do tipo de célula e de fatores externos, como a temperatura e a disponibilidade de nutrientes.

A maior parte do ciclo é preenchida pela interfase, delimitada pelo final de uma divisão e pelo início da seguinte. A duração desta fase varia em função da natureza e condições fisiológicas da célula: as células intestinais dividem-se duas vezes por dia, enquanto as células hepáticas uma a duas vezes por ano. A interfase pode ser dividida nos seguintes períodos: G1, S e G2 (G de "gap" = intervalo, S de síntese), Fig. 3.36.

O período G1 é o que sucede a uma mitose, sendo a sua duração variável de célula para célula. Neste período, enquanto se verifica um aumento significativo do volume do citoplasma, a quantidade de DNA permanece constante. Ao mesmo tempo os vários organitos aumentam de número. No final da fase G1 a célula pode entrar em fase G0 (diferenciação celular) ou na fase S (proliferação celular).

No período S, a totalidade do DNA nuclear é replicada. No período G2, o núcleo e a célula preparam-se para entrar em divisão: dividem-se as mitocôndrias e outros organitos.

### 3.7.2. Mitose

Pela mitose formam-se dois núcleos filhos com o mesmo número de cromossomas do núcleo original e morfológica e geneticamente equivalentes entre si. Por mitose e citocinese (divisão celular) os organismos crescem por aumento do número de células e reparam tecidos danificados, substituindo células feridas ou mortas. No indivíduo adulto, estima-se que 25 milhões de células por segundo estão em divisão. Estas células destinam-se a substituir células velhas e mortas. Os eritrócitos velhos, por exemplo, são renovados a uma velocidade de 100 milhões/min. Nas plantas, a divisão nuclear e celular ocorre em áreas específicas de células embrionárias, os meristemas, localizados nas extremidades de caules e raízes e no câmbio. Nas células animais é possível observar diferentes estádios de mitose em embriões.

Durante a divisão nuclear ou mitose, Fig. 3.37, 3.39, regista-se uma alteração progressiva da estrutura e morfologia dos cromossomas. Embora a mitose seja um processo contínuo, ela é dividida, por conveniência, em quatro etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase.

A duração da mitose varia com o tecido e organismo. Contudo, normalmente a prófase é o processo mais longo e a anáfase o mais curto. Numa raiz os períodos de tempo são,

normalmente: prófase 1-2h, metáfase 5-15min, anáfase 2-10min, e telófase 10-30min. A interfase dura normalmente 12-30h.

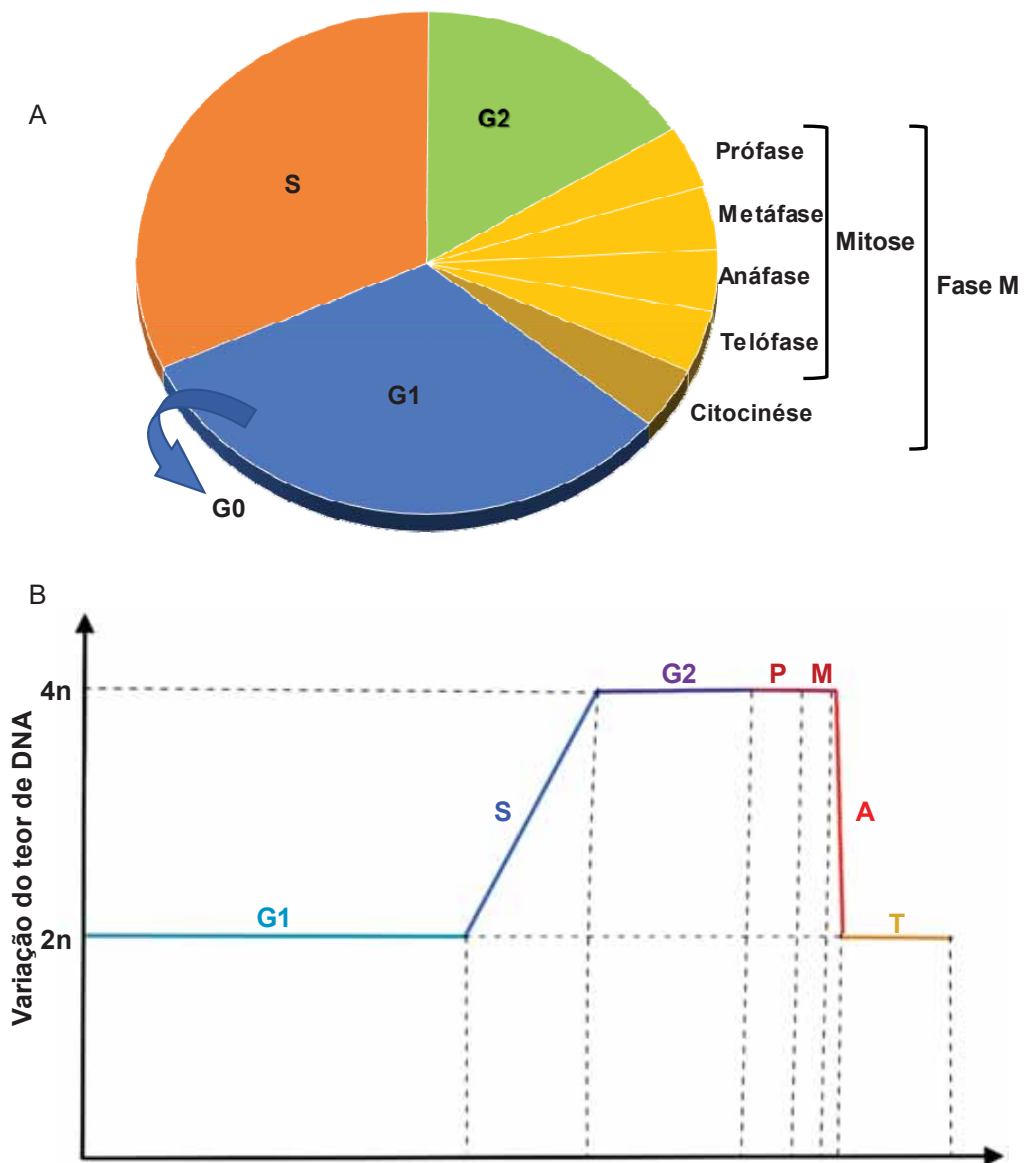


Fig. 3.36. Cronologia do ciclo celular (A) e variação da quantidade de DNA durante as diversas fases (B).

### Prófase

É caracterizada pela condensação dos cromossomas, o desaparecimento dos nucléolos e do envólucro nuclear e formação dos microtúbulos do fuso acromático. Se no período que antecede a prófase a célula apresenta centríolos, estes dividem-se e deslocam-se para os polos logo que o fuso se forma. Os cromossomas tornam-se distintos ao microscópio ótico, em consequência do seu progressivo encurtamento e engrossamento por espiralação. Por vezes é possível verem-se os cromátídeos ligados pelo centrómero (sequência específica de DNA necessária à ligação do cromossoma ao fuso). O aparecimento dos cromátídeos deve-se à replicação do DNA cromossómico durante a fase S da interfase do ciclo celular.

Na fase final da prófase, o fuso acromático alonga-se entre dois polos diametralmente opostos

e os cromossomas alinham-se ao centro do fuso. As células animais possuem centríolos, estruturas envolvidas na organização do fuso acromático, que estão ausentes das células vegetais. Diferenciam-se os cinetocoros, sob a forma de condensações lineares situadas de cada lado dos centrómeros. Os cinetocoros funcionam como centros organizadores de microtúbulos (MTOCs).

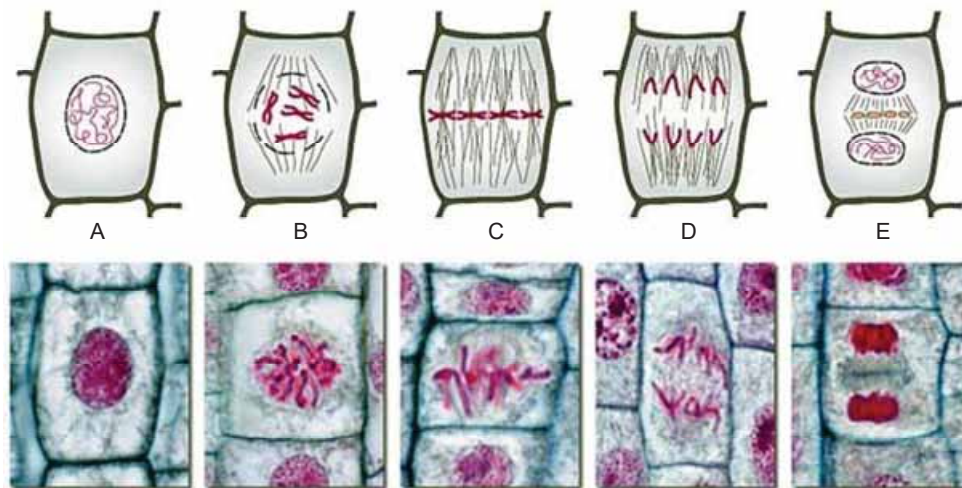


Fig. 3.37. Diversas fases do ciclo celular em células vegetais: interfase (A), prófase (B), metáfase (C), anáfase (D) e telófase (E).

### Metáfase

Na metáfase, os centrómeros dos cromossomas estão ligados a fibras do fuso e alinhados ao longo da placa celular. Os centrómeros são duplicados e cada cromátídeo converte-se num cromossoma individualizado. Cada um dos cromossomas, assim formados, está ligado a uma fibra do fuso fixa a um dos polos.

### Anáfase

O início da anáfase é caracterizado pela ascensão dos cromossomas para os polos. É nesta fase que substâncias como a colquicina, que interferem na formação e função dos microtúbulos, inibem a mitose. Sem microtúbulos, essenciais à deslocação dos cromossomas em direções diametralmente opostas na célula, o núcleo não se pode dividir em dois. Contudo, os centrómeros separam-se, permitindo a separação dos cromátídeos e, conseqüentemente a duplicação do número de cromossomas na célula.

Durante a anáfase tem início um processo denominado citocinese, que divide a célula em duas.

### Telófase

Na fase final da mitose, ou seja, na telófase, os cromossomas atingem os polos do fuso acromático ao mesmo tempo que se inicia o seu processo de descondensação. Durante a telófase reaparece o nucléolo bem como o invólucro nuclear.

Embora a citocinese seja um processo distinto do da divisão nuclear ela é muitas vezes com ele síncrono, tornando-se mais evidente no final da telófase. Este processo decorre de modo

diferente em células animais e vegetais. Nas células animais observa-se a formação de uma depressão na zona mediana da célula, com o envolvimento de elementos do citoesqueleto, que vai aprofundando cada vez mais, até que as células acabem por se separar. Nas células vegetais a formação da nova parede celular começa na zona mediana da célula e vai crescendo para as extremidades opostas, até encontrar as paredes laterais da célula mãe. A formação da nova parede celular começa com a construção do seu precursor, a placa celular. O primeiro sinal da formação da placa celular começa no final da anáfase – início da telófase, com o aparecimento do fragmoplasto, na zona mediana da célula em divisão. O fragmoplasto corresponde ao conjunto de microtúbulos que se dispõem na zona média de cada lado da placa celular, aos quais estão associadas vesículas que contêm material denso aos eletrões. Depois da formação do fragmoplasto as vesículas Golgianas movem-se para a zona mediana da célula, e fundem-se entre si originando a placa celular. Esta vai crescendo por adição de mais vesículas até a célula ficar separada em duas. As membranas das vesículas dão origem à membrana plasmática, enquanto os produtos de secreção, contidos nas vesículas, contribuem para a formação da parede celular. Os plasmodesmos primários formam-se nesta altura por aprisionamento de porções de RE entre as vesículas Golgianas que se fundem.

### 3.7.3. Meiose

A meiose é uma forma de divisão nuclear de importância fundamental entre os organismos com reprodução sexuada que resulta na formação de células reprodutoras designadas gâmetas nos animais e esporos nos vegetais. Em contraste com a mitose, da meiose resulta diversidade genética. Os gâmetas não só são geneticamente diferentes da célula mãe, como são diferentes entre si. A meiose ocorre nos eucariotas cujas células contêm número diploide de cromossomas ( $2n$ ). A diploidia, entendida numa perspetiva genética, implica que a informação contida num cromossoma esteja também armazenada num segundo cromossoma nuclear, cromossoma homólogo.

Durante a meiose, os cromossomas replicados no núcleo são segregados pelos quatro núcleos filhos (células haploides), recebendo cada um deles metade do número de cromossomas da célula mãe (célula diploide). Embora estes núcleos possuam apenas metade do número de cromossomas, eles estão dotados da informação genética completa porquanto recebem um membro de cada um dos pares de cromossomas homólogos. A segregação dos cromossomas homólogos faz-se ao acaso, durante a anáfase, o que explica a grande variabilidade genética que caracteriza os organismos com reprodução sexuada. É importante salientar que para essa variabilidade contribui também um processo denominado “crossing-over” que tem lugar durante a prófase da primeira divisão nuclear.

A meiose, à semelhança da mitose, pode ser dividida em fases características, Figs. 3.38-3.40:

#### Meiose I

##### *Prófase I*

1. Leptóteno. Os cromossomas, embora delgados e compridos (*Lepto* - delgado), tornam-se visíveis à medida que vão espiralando. Nesta fase, os cromossomas aparecem formados por dois cromátídeos.

2. Zigóteno. Os cromossomas homólogos emparelham-se (*Zigo* = conjugação) através de sinapses, formando díadas cromossómicas. O complexo sinaptonémico mantém ligados os cromossomas homólogos.



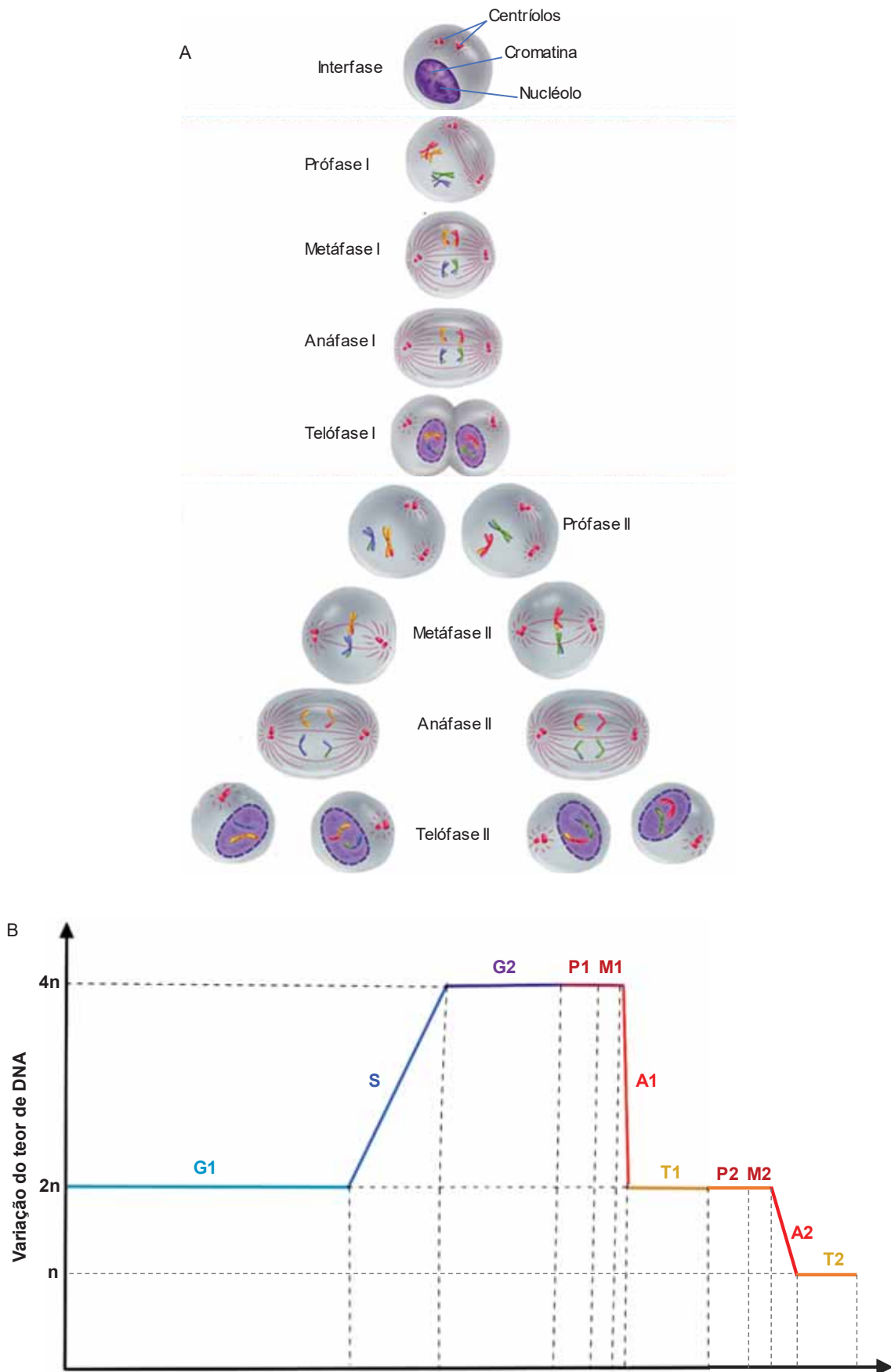


Fig. 3.38 Representação esquemática dos diversos estádios da meiose (A) e variação da quantidade de DNA durante as diversas fases (B).

3. Paquíteno. É nesta fase que os cromátídeos dos cromossomas homólogos se sobrepõem ("crossing-over" ou quiasmas) e trocam pequenas porções de DNA, o que determina novas combinações genéticas nas gerações futuras. Durante esta fase os cromátídeos tornam-se bem evidentes devido ao aumento de espessura e diminuição de comprimento (*Paqui* = grosso) resultantes de um elevado grau de espiralação.

4. Diplóteno. Esta fase é caracterizada pelo início da separação dos cromossomas homólogos, exceto ao nível dos quiasmas. Cada díada cromossómica é constituída por quatro cromátídeos, tétrada cromatídica.

5. Diacinese. Com a diacinese termina a prófase I. Os cromossomas separam-se e afastam-se (*Dia* = separar) ao mesmo tempo que se desorganiza o invólucro nuclear e se forma o fuso acromático.

### *Metáfase I*

Nesta fase as díadas alinham-se na placa celular. Os centrómeros dos cromossomas homólogos ligam-se a fibras do fuso que emergem de polos opostos.

### *Anáfase I*

Os cromossomas homólogos separam-se uns dos outros e migram para polos opostos do fuso.

### *Telófase I*

Com a telófase I termina a primeira divisão meiótica do núcleo. Os cromossomas homólogos, cada um formado por dois cromátídeos, encontram-se separados nos respetivos polos, sendo por isso visíveis duas áreas nucleares. Em muitos organismos forma-se um novo invólucro nuclear e observa-se alguma desespiralação dos cromossomas.

### *Intercinese*

A intercinese é um período muito curto que separa o final da telófase I e o início da prófase II. Durante este período, o DNA dos dois núcleos formados durante a primeira divisão nuclear da meiose não sofre qualquer replicação.

## Meiose II

### *Prófase II*

Embora cada núcleo possua apenas metade do número de cromossomas, esta fase é em tudo idêntica à prófase de mitose. Cada cromossoma é composto pelos dois cromátídeos.

### *Metáfase II*

Esta fase é idêntica à metáfase mitótica. Os cromossomas, com os dois cromátídeos, migram para o centro do fuso acromático.

### *Anáfase II*

Na anáfase II os cromátídeos de um mesmo cromossoma separam-se e dá-se a sua ascensão para os polos opostos do fuso.

## Telófase II

Esta fase é também idêntica à telófase mitótica. Forma-se o invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomas que migrou para os respetivos polos e tem início a desespiralação cromossómica.

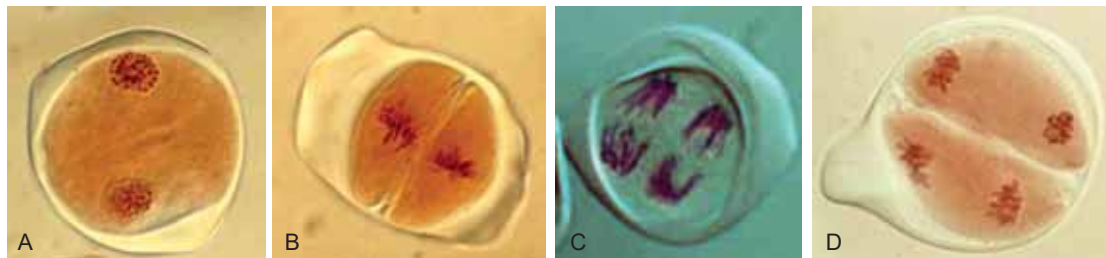


Fig. 3.39 Aspeto, em microscopia ótica, de diversos estádios da meiose II: prófase II (A), metáfase II (B), anáfase II (C) e telófase II (D).

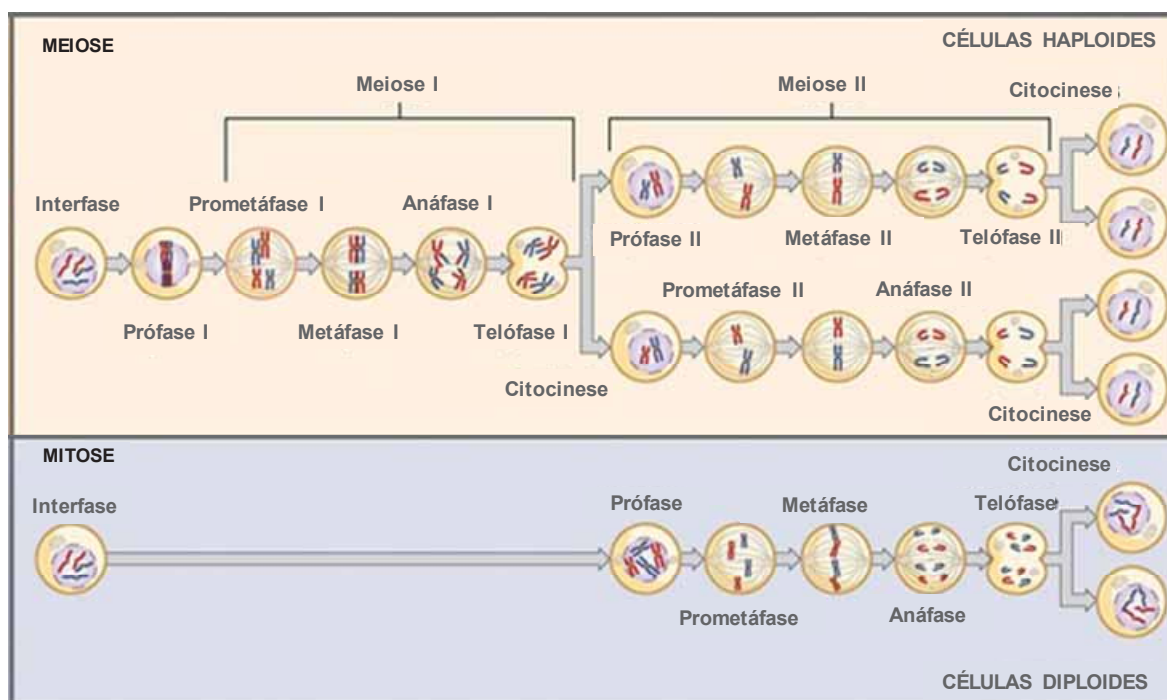


Fig. 3.40 Representação esquemática comparativa da mitose e da meiose.

#### 4. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO E DE TRANSMISSÃO

O estudo morfológico de organismos bem como das suas células pode ser efetuado tanto por microscopia ótica como por microscopia eletrónica de varrimento ou de transmissão. Existem várias diferenças entre os três tipos de microscopia, Tabela 4.1, Fig. 4.1.

Tabela 4.1. Comparação entre microscopia ótica, microscopia eletrónica de varrimento e de transmissão.

	Microsc. Ótico	Microsc. Eletrónico de Varrimento	Microsc. Eletrónico de Transmissão
<b>Fonte de Radiação</b>	Filamento de Tungsténio	Filamento de Tungsténio	Filamento de Tungsténio
<b>Tipo de radiação</b>	Fotões	Elétrões	Elétrões
<b>Meio de propagação</b>	Atmosfera	Vácuo $<10^{-4}$ Pa	Vácuo $<10^{-6}$ Pa
<b>Lentes</b>	Vidro ou Quartzo	Eletromagnéticas	Eletromagnéticas
<b>Resolução</b>	$\approx 200$ nm	$\approx 5$ nm	$\approx 0,14$ nm
<b>Profundidade de foco</b>	Reduzida	Muito elevada	Elevada
<b>Modo de ampliação</b>	Substituição das lentes	Alteração da largura de varrimento	Alteração da corrente das lentes de ampliação
<b>Contraste</b>	Absorção/ Reflexão	Elétrões secundários	Dispersão/Difração
<b>Observação</b>	Direta da imagem luminosa	Conversão de elétrões em fotões e análise em monitor de televisão	Conversão de elétrões em fotões por um alvo fluorescente
<b>Espessura do espécime</b>	$> 0,5 \mu\text{m}$	$< 10$ mm	$< 1 \mu\text{m}$
<b>Preparação de espécime</b>	Fácil	Relativamente fácil	Difícil

##### 4.1. Microscopia eletrónica de transmissão

No microscópio eletrónico de transmissão o feixe de elétrões emitido pelo filamento atravessa o espécime. Os elétrões do feixe, emitidos pelo filamento, são acelerados por uma diferença de potencial gerada entre o ânodo e o cátodo e direcionados para o espécime pelas lentes do condensador (Sistema de iluminação). Depois de atravessarem a amostra e a objetiva, os elétrões são encaminhados para o sistema de lentes formadoras da imagem. Este sistema é constituído por três lentes: a lente intermediária, a 1ª projetora e a 2ª projetora (Sistema de imagem). A imagem é observada pela projeção dos elétrões que atravessam o espécime num alvo impregnado com sulfureto de zinco. As moléculas do alvo são excitadas pelo impacto dos elétrões e, quando regressam ao estado fundamental, emitem luz visível, Fig. 4.2.

No microscópio eletrónico, a manipulação das lentes faz-se variando a corrente que por elas passa, o que determina alteração do respetivo campo magnético. A coluna através da qual fluem os elétrões encontra-se sob vácuo. Quando a pressão no seu interior não é adequada, os elétrões são deflectidos pelas moléculas de ar residual.

Embora seja possível obter feixes de elétrões altamente energéticos e, por conseguinte, penetrantes, a microscopia eletrónica de transmissão de rotina requer secções ultrafinas ( $\approx 60$ - $90$  nm de espessura) do material a observar. Para se obterem estas secções de material biológico, torna-se necessário recorrer a métodos que lhe confiram a rigidez necessária, como por exemplo a congelação. No entanto, o método mais comum consiste na impregnação do tecido com resinas sintéticas do tipo da Araldite. Como estas resinas não são miscíveis com a água, o tecido deve ser previamente desidratado.

PODER DE RESOLUÇÃO	ESCALA	EXEMPLO
	$10^1$	
	$10^0$	1,8 m Altura de um Homem
	$10^{-1}$	200 mm Raio do ovo de avestruz, célula gigante
	$10^{-2}$	
	$10^{-3}$	5 mm Raio duma célula de alga gigante
	$10^{-4}$	
	$10^{-5}$	15 $\mu$ m Raio do núcleo
	$10^{-6}$	10 $\mu$ m Comprimento de um cromossoma
	$10^{-7}$	1 $\mu$ m Dimensão de uma mitocôndria
	$10^{-8}$	430 nm Dimensão do vírus do mosaico do tabaco
	$10^{-9}$	100 nm Dimensão de um gene
	$10^{-10}$	15 nm Raio do vírus do mosaico do tabaco
		10 nm Raio de pequenos vírus
		6 nm Raio das mais pequenas partículas de ouro
		5 Å Raio de uma molécula de aminoácido

Fig. 4.1. Comparação do poder de resolução dos diferentes microscópios.



Fig. 4.2. Foto e representação esquemática do microscópio eletrónico de transmissão

De molde a suportar todos estes tratamentos, o material biológico tem de ser fixado com o objetivo de estabilizar quimicamente a ultra estrutura da célula, Fig. 4.3. O melhor fixador para um



tecido particular é aquele que preserva maior número de estruturas. Muitas variáveis podem influir na qualidade do resultado. Um dos grandes problemas encontrados na preparação de material para microscopia eletrônica é a escolha do fixador adequado. Além disso, o pH, a tonicidade da solução fixadora, a temperatura e a duração da fixação são fatores a ter em conta.

#### 4.1.1. Fixação

Os fixadores químicos são de dois tipos: coagulantes e não coagulantes. No primeiro caso encontram-se o álcool, a acetona e o ácido acético e no segundo os aldeídos (formaldeído e glutaraldeído) e o tetróxido de ósmio.

Na prática, é normal recorrer-se à fixação dupla aldeído/ósmio a fim de estabilizar o maior número de componentes das estruturas celulares. Na fixação aldeídica, pré-fixação, utiliza-se frequentemente o glutaraldeído. O grau de estabilidade das moléculas fixadas é função do aldeído utilizado, dimensão do material, composição do tampão, duração do processo, temperatura, concentração e rapidez de penetração. A fixação deve ocorrer em meio tamponado, pH 7.2-7.5, e a temperatura próxima de 4°C, para evitar as alterações “pós-mortem”, resultantes da ação de enzimas hidrolíticas libertadas em consequência da rutura de algumas células. A dimensão do material é também um fator determinante. Este não deve possuir mais de 1 mm<sup>3</sup> para possibilitar uma adequada penetração do fixador. O tempo de fixação deve ser ajustado a cada situação, devendo resultar do compromisso entre uma boa fixação e uma pequena extração. À pré-fixação segue-se uma pós-fixação com tetróxido de ósmio em solução aquosa, a 4°C.

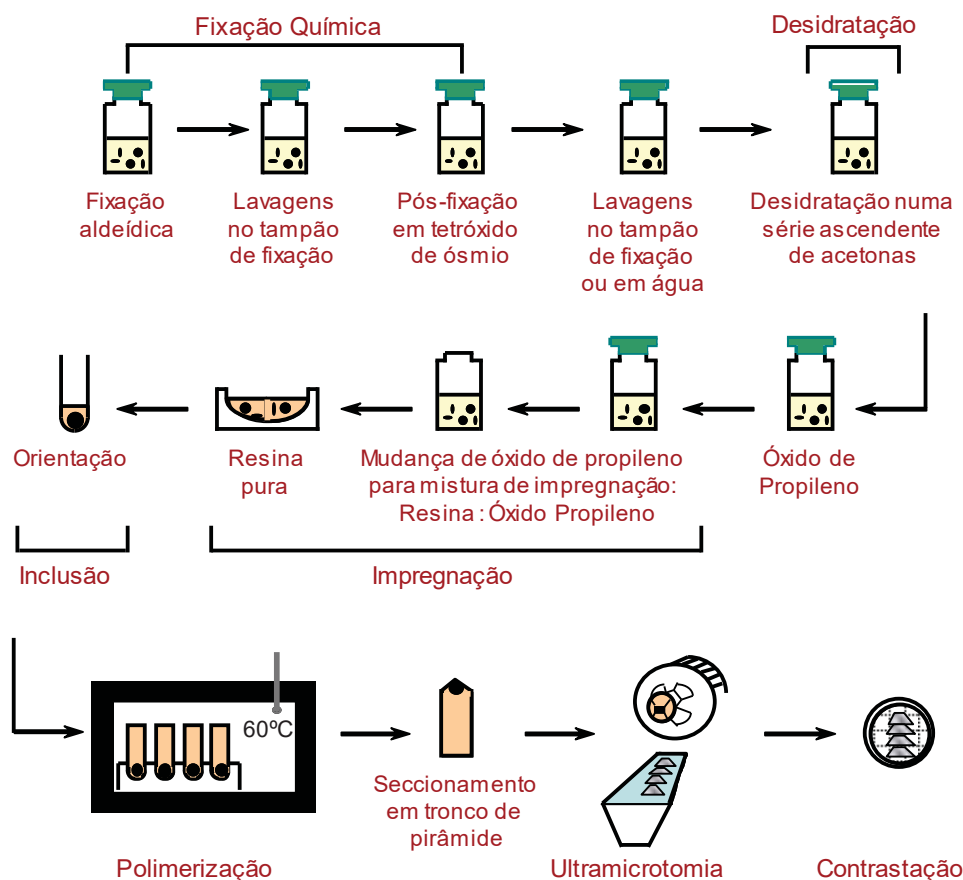


Fig. 4.3. Principais passos da preparação de material biológico para microscopia eletrônica de transmissão.

#### **4.1.2. Lavagens**

As lavagens são necessárias para remoção do fixador que não reagiu. Não devem ser prolongadas porque podem conduzir à extração e diminuição de volume, e devem decorrer no mesmo solvente dos fixadores para evitar desintegração e extração de material não fixado, por alteração drástica do ambiente celular e da seletividade membranar.

#### **4.1.3. Desidratação**

A desidratação é necessária para substituir a água do material biológico por outro líquido miscível com as resinas de impregnação. É normalmente realizada em acetona (parcialmente miscível nas resinas de impregnação).

#### **4.1.4. Impregnação e Inclusão**

A finalidade da impregnação e inclusão é poder manejar o tecido num meio sólido que tenha suficiente resistência para que dele se possam obter cortes finos. Consiste em infiltrar o tecido fixado e desidratado com uma mistura resinas que polimerizam em presença de um catalisador, em tempo apropriado.

#### **4.1.5. Seccionamento**

Do mesmo bloco, podem obter-se secções de diferente espessura, para observação quer em microscopia eletrónica (10-100nm), quer em microscopia ótica (0,5-10 $\mu$ ).

#### **4.1.6. Contrastação**

Os materiais biológicos são constituídos maioritariamente por moléculas contendo C, H, O e N e poucos elementos de elevada massa atómica, pelo que são transparentes aos eletrões. O problema é ainda maior em cortes finos porque a composição química dos componentes celulares é idêntica à da resina. O contrastante deve aumentar o poder de dispersão dos eletrões, ser seletivo e ter densidade superior à do meio de inclusão, Fig. 4.8.

### **4.2. Microscopia eletrónica de varrimento**

No microscópio eletrónico de varrimento, ao contrário do que se verifica no de transmissão, o feixe de eletrões emitido pelo filamento não atravessa o espécime. Os princípios por que se rege o funcionamento dos dois microscópios é também diferente.

O microscópio eletrónico de varrimento permite obter imagens tridimensionais de superfícies. Neste microscópio, os eletrões emitidos pelo filamento, eletrões primários, ao interagirem com o espécime promovem a emissão de eletrões, eletrões secundários, da sua superfície. Os eletrões do feixe varrem rapidamente a superfície da amostra, obtendo-se assim grande número de eletrões secundários. O maior número destes eletrões é emitido pelas zonas mais proeminentes. Deste modo, o número de eletrões secundários produzidos por cada ponto da superfície da amostra, bem como a direção em que são emitidos, estão intimamente relacionados com a sua topografia.

Os eletrões ejetados são acelerados em direção a um cintilador localizado lateralmente em relação ao espécime. As cintilações luminosas, produzidas pelo impacto dos eletrões secundários

no cintilador, são conduzidos a um fotomultiplicador. Os impulsos elétricos, gerados a este nível, são em seguida conduzidos a um tubo de raios catódicos. Obtém-se assim uma imagem de televisão a branco e preto. O varrimento da superfície da amostra, pelo feixe de eletrões primários, está sincronizado com a projeção do feixe no monitor da televisão, de tal modo que a cada ponto do espécime corresponde uma região da imagem no monitor, Fig. 4.4.

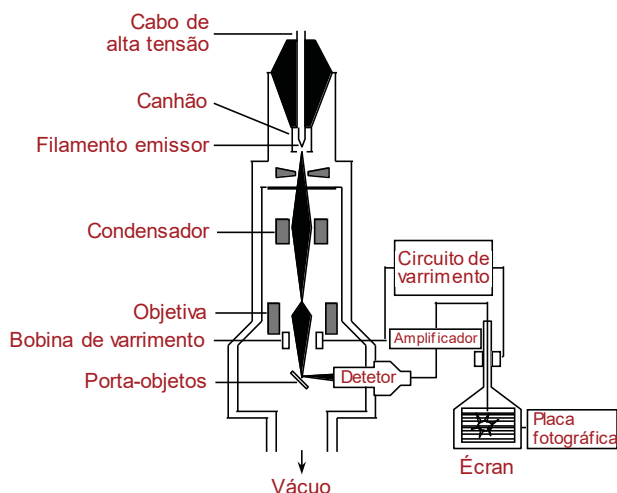


Fig. 4.4. Foto e representação esquemática do microscópio eletrónico de varrimento.

Tal como no caso da microscopia eletrónica de transmissão, o material biológico deve ser, neste caso, previamente tratado de forma a preservar-se a sua estrutura e eliminar a água tecidual. Com este objetivo, o material deve ser sujeito a um dos tratamentos a seguir esquematizados, Fig. 4.5.

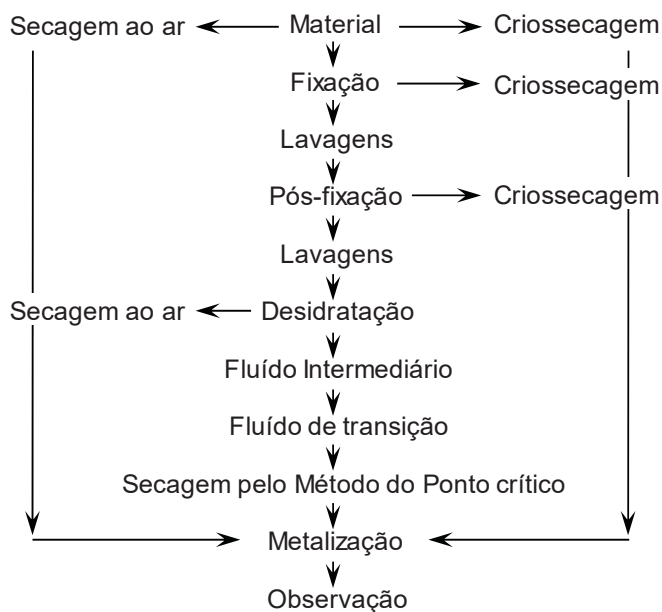


Fig. 4.5. Esquema do procedimento geral a que deve ser submetido o material biológico para observação em microscopia eletrónica de varrimento.

A escolha do processo de secagem depende, normalmente, das condições materiais do laboratório. Pese embora este facto, é importante ter-se uma ideia precisa sobre as diferenças qualitativas entre os dois métodos.

#### **4.2.1. Secagem ao ar**

À exceção de alguns tipos de material (diatomáceas, esporos, entre outros) é um processo que conduz a grandes alterações morfológicas do material (as forças a que o material é sujeito podem atingir  $46.000 \text{ Kg/cm}^2$ ).

#### **4.2.2. Criossecagem**

A criossecagem requer uma congelação prévia do material. Esta congelação deve processar-se rapidamente de molde a evitar a formação de cristais de gelo de grandes dimensões no interior das células. A temperatura extremamente baixa do azoto líquido ( $-150^\circ\text{C}$ ) é adequada a este fim. No entanto, a imersão do tecido neste líquido criogénico leva à libertação violenta de azoto gasoso, devida à grande diferença de temperatura, o que danifica o material. O propano líquido, com ponto de ebulição de  $-42^\circ\text{C}$  e de fusão de  $-187^\circ\text{C}$ , substitui com vantagem o azoto líquido porquanto impede a formação de cristais de gelo de grandes dimensões e não liberta bolhas de gás.

A secagem do material processa-se lentamente, a pressão e temperatura muito baixas ( $10^{-1} \text{ Pa}$  a  $-65^\circ\text{C}$ ). A sublimação lenta do gelo evita que o tecido seja danificado.

Os tecidos sujeitos à criossecagem sofrem, regra geral, uma redução de volume de cerca de 15%.

#### **4.2.3. Secagem pelo método do ponto crítico**

A secagem pelo método do ponto crítico é mais rápida do que a criossecagem. No entanto, como esta última não requer desidratação do material com solventes orgânicos, torna-se menos agressiva. Embora se verifique contração do material em qualquer dos processos, ela é mais acentuada na secagem pelo método do ponto crítico.

Depois de desidratado numa série ascendente de acetonas, o material é transferido para o interior de uma câmara, onde a acetona é substituída por  $\text{CO}_2$  líquido, sob pressão. A câmara é em seguida aquecida, o que leva a que o fluido ( $\text{CO}_2$  líquido) se expanda e evapore, Fig. 4.6. Desta forma, a densidade da fase líquida diminui enquanto a da fase gasosa aumenta, mas sem que a densidade total do fluido, em ambas as fases, se altere.

Quando, pelo aumento de temperatura, a densidade de fase líquida é idêntica à da fase gasosa, a tensão superficial é zero e desaparece o menisco de separação das fases, é a temperatura crítica e o ponto crítico.

O material seco por este processo pode apresentar uma redução de volume de aproximadamente 40%. Para esta redução, contribui significativamente o emprego de solventes orgânicos durante a desidratação.

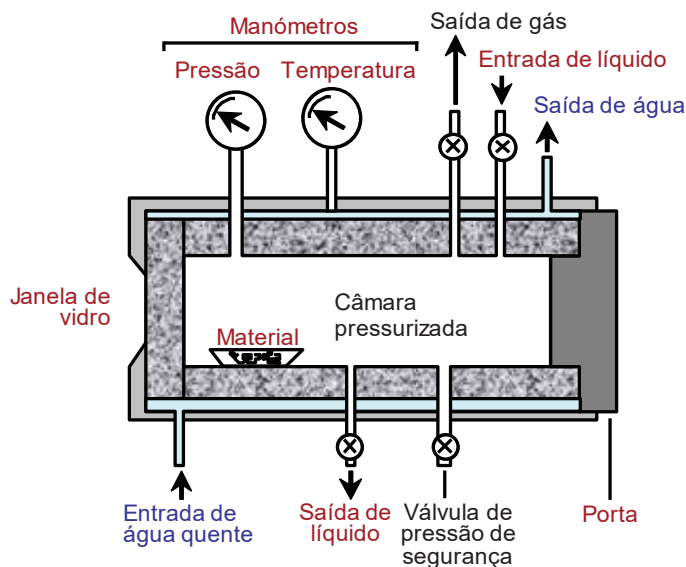


Fig. 4.6. Representação esquemática do aparelho de secagem pelo método do ponto crítico.

#### 4.2.4. Metalização

A composição elementar do material biológico (C, O, H, N, P, S) não favorece a emissão eletrões secundários. De igual modo, a sua condutividade não é também a melhor pelo que, para ser possível fazer-se uma observação de qualidade, se torna necessário revestir o espécime com material condutor e denso como, por exemplo, ouro ou ouro/paládio, Figs 4.7 e 4.8.

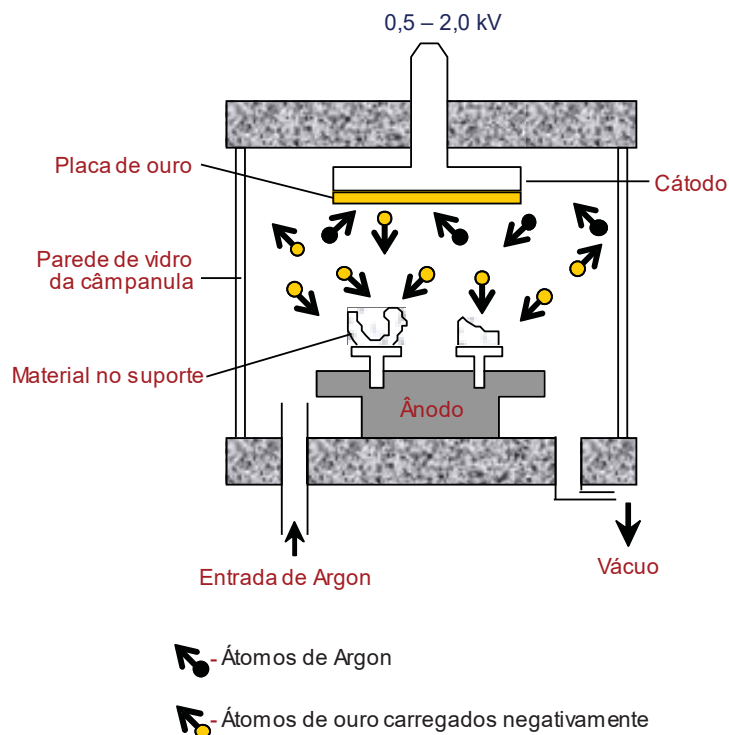


Fig. 4.7. Representação esquemática do aparelho de metalização.



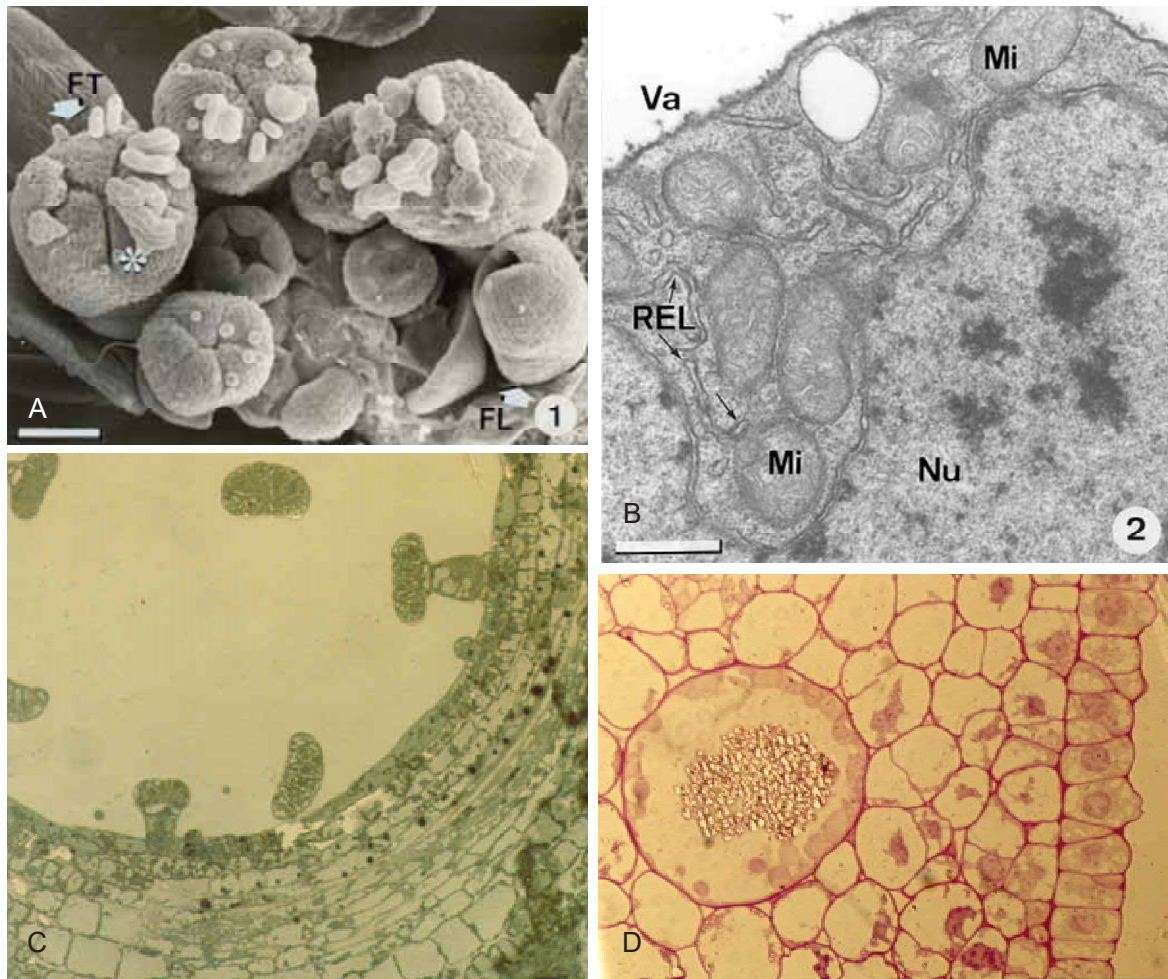


Fig. 4.8. Observação de material em microscopia eletrônica de varrimento (A) e de transmissão (B) e cortes semi-finos de material preparado para microscopia eletrônica de transmissão (C, D).



## 5. PROTOCOLOS

Nota prévia: O modo de preparação de alguns dos reagentes necessários à realização dos protocolos encontra-se disponível no capítulo 6. Apêndice.

### **1º Protocolo - Microscopia Ótica**

1. Introdução à utilização do Microscópio Ótico (focagem e alinhamento do microscópio, preparação do material biológico). Iluminação de Köhler.

- a) Destacar a epiderme da página abaxial da folha de *Kalanchoe blossfeldiana* (calancói).
- b) Montar em água, cobrir com lamela, e observar.

2. Diferentes tipos de Microscopia ótica.

3. Medições em Microscopia ótica. Utilização de ocular e objetiva micrométrica.

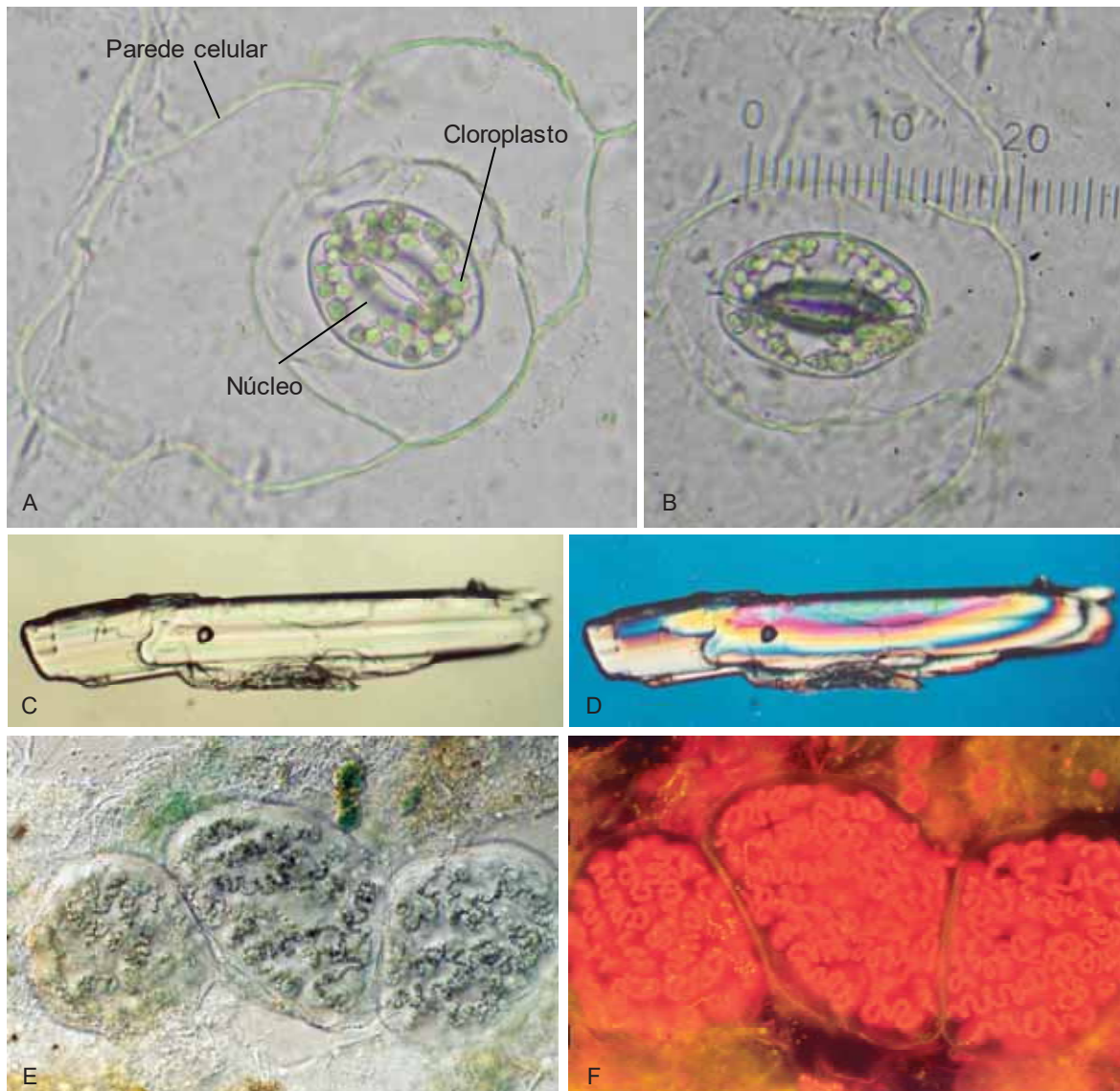


Fig. P.1. Observação, ao microscópio ótico, de estomas da epiderme abaxial da folha de *Kalanchoe blossfeldiana* (A). Utilização de ocular micrométrica para medição de estruturas em microscopia ótica (B). Observação de um cristal de timol, no microscópio de contraste interferencial (C) e no microscópio com luz polarizada (D). Observação de colônias de *Nostoc* no microscópio de contraste interferencial (E) e no microscópio de fluorescência (F).

## **2º Protocolo - Microscopia Ótica (Continuação), Observação de Procariontes**

### **1. Observação de bactérias da saliva (*Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus*) ou do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgarus*).**

- a) Colocar, numa lâmina de vidro, uma gota de material a observar e espalhá-la na superfície de 1cm<sup>2</sup>.
- b) Secar lentamente à chama (cerca de 5 min). Não proceder a secagem rápida para evitar fissuras no esfregaço.
- c) Colocar uma gota de solução de Löffler\* e deixar corar durante 10 min.
- d) Escorrer o corante.
- e) Lavar suavemente com água.
- f) Secar a lâmina de vidro apenas na face sem esfregaço.
- g) Observar.

\* Alternativamente pode ser utilizada a solução de Newman-Lampert, sendo, nesse caso, necessário secar lentamente à chama

### **2. Observação de preparações definitivas de cocos, bacilos e espirilos coradas com safranina ou com a coloração de Gram.**

### **3. Utilização de ocular e objetiva micrométrica.**



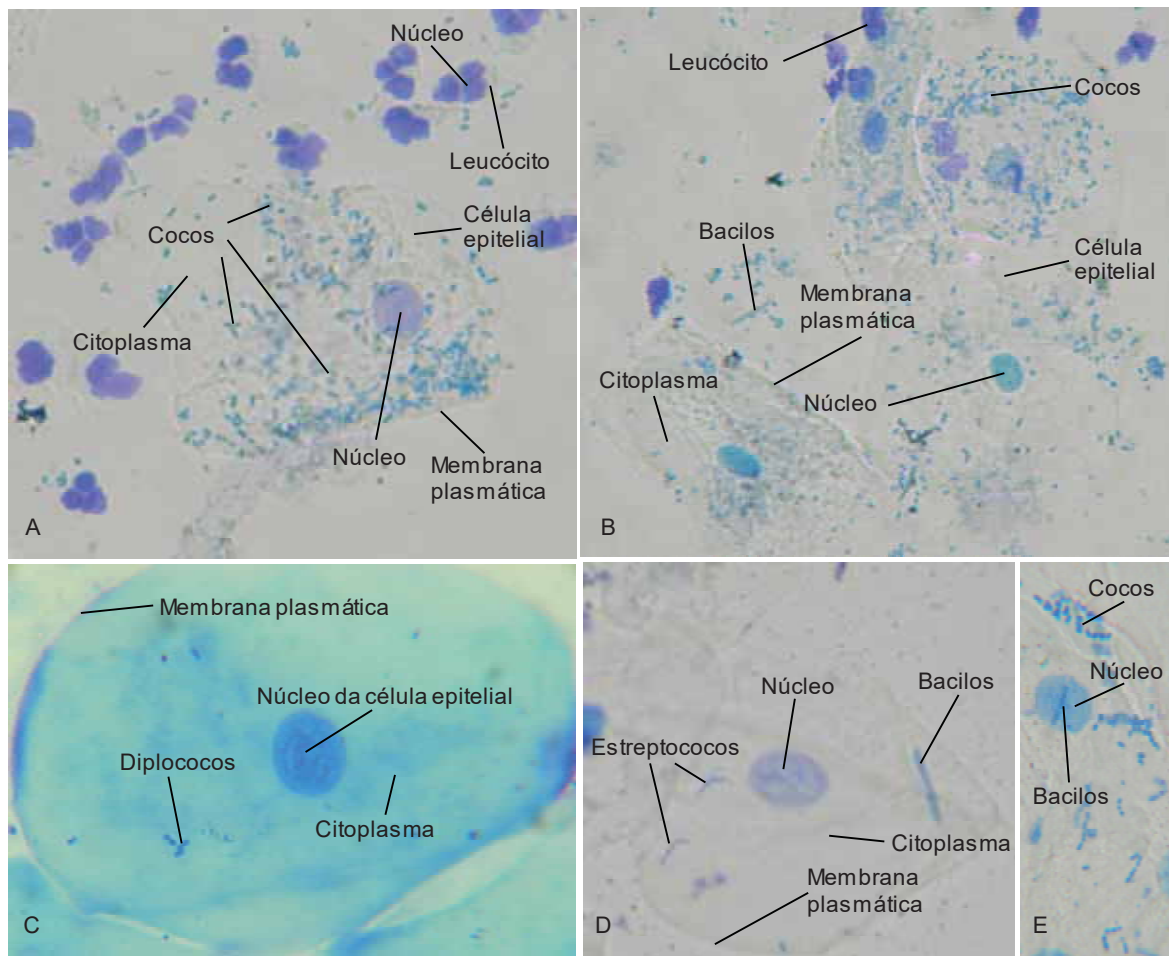


Fig. P.2. Observação, ao microscópio óptico, de um esfregaço de saliva após coloração com a solução de Löffler. Aspectos gerais onde se observam células eucariotas (células epiteliais, leucócitos) e inúmeras células procariotas sobrepostas às células epiteliais (A, B). Detalhes de células epiteliais com núcleo bem visível e algumas células procariotas (cocos, bacilos) sobrepostos (C, D, E).

### 3º Protocolo - Observação de Procariotas (Continuação), Observação de Algas Unicelulares, Solitárias, Coloniais e Filamentosas e de Protozoários de Água-Doce

1. Observação de cianobactérias: colónias de *Nostoc* ou *Anabaena* sp. em associação com o feto aquático, *Azolla filiculoides*.

a) No caso da *Anabaena* destaque uma pequena porção da folha de *Azolla filiculoides*, seccione finamente e monte entre lâmina e lamela. Observe, esquematize e legende, as colónias da cianobactéria.

2. Com uma pipeta retire uma gota da amostra de lodo e coloque-a numa lâmina de vidro. Coloque igualmente alguns filamentos das algas que lhe serão fornecidas. Monte entre lâmina e lamela e observe ao microscópio.

3. Utilização de ocular e objetiva micrométrica.

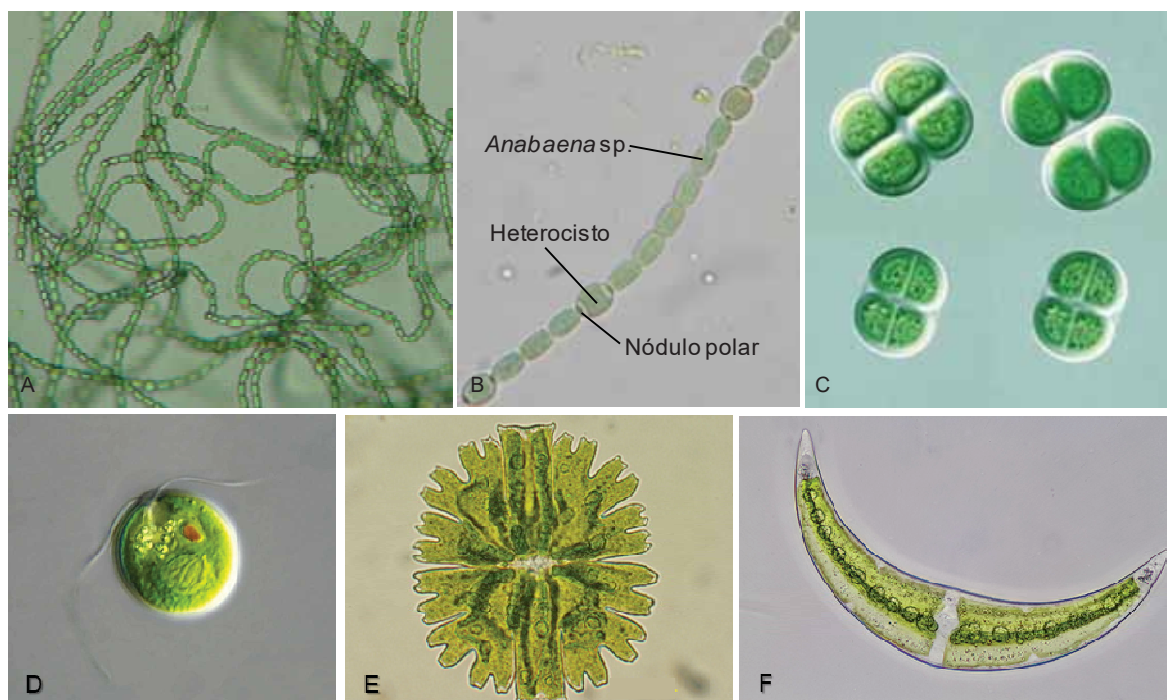


Fig. P.3. Observação, ao microscópio ótico, de colónias de cianobactérias (A-C). Aspeto geral de colónias de *Anabaena* sp. (A). Detalhe de uma colónia de *Anabaena* sp onde é bem visível a presença de heterocistos com nódulos polares (B). Colónias de *Gloeocapsa* sp (C).

Observação, ao microscópio ótico, de organismos eucariotas unicelulares (D-Z). De notar a presença de organitos no interior das suas células, que permitem identificar estes organismos como sendo eucariotas. Algas solitárias: *Chlamydomonas* (D), *Micrasterias* (E), *Closterium* (F).



Fig. P.3 (cont.). Observação, ao microscópio ótico, de organismos eucariotas unicelulares (D-Z). De notar a presença de organitos no interior das suas células, que permitem identificar estes organismos como sendo eucariotas. Algas solitárias: Diatomáceas (G-J), *Euglena* (L). Algas coloniais: Diatomáceas (M), *Chlorella* (N), *Scenedesmus* (O), *Coelastrum* (P), *Pediastrum* (Q). Algas filamentosas: *Spirogyra* (R), *Cladophora* (S). Protozoários ciliados: *Vorticella* (T), *Stentor* (U), *Paramecia* (V). Protozoários rizópodes: *Amoeba* (X), *Pompholyxophrys* (Z).

#### **4º Protocolo - Observação da Matriz extracelular (matriz extracelular vegetal ou parede celular)**

##### **1. Caracterização histoquímica dos constituintes de parede celular.**

- a) Efetue cortes transversais em caules jovens de *Ruscus* sp. (gilbardeira)
- b) Efetue a coloração com azul de toluidina\*.

I. Imersão em hipoclorito de sódio	30 min
II. Lavagem em água acética 1%	2 min
III. Lavagem em H <sub>2</sub> O	1 min
IV. Imersão em azul de toluidina 0.05%	5 min
V. Lavagem em H <sub>2</sub> O, montagem e observação	

Resultado da coloração:

Paredes celulares celulósicas – rosa; paredes celulares lenhificadas - azul.

\* Alternativamente pode ser utilizada a dupla coloração verde iodo/carmim aluminado

I. Imersão em hipoclorito de sódio	30 min
II. Lavagem em água acética 1%	2 min
III. Imersão em verde iodo	10 s
IV. Lavagem em H <sub>2</sub> O	1 min
V. Imersão em carmim aluminado	10 min
VI. Lavagem em H <sub>2</sub> O, montagem e observação	

Resultado da coloração:

Paredes celulares celulósicas – rosa; paredes celulares lenhificadas - verde.

##### **2. Identificação de paredes celulósicas, paredes lenhificadas e paredes suberificadas.**

- a) Observe a preparação definitiva que lhe foi distribuída.
- b) Faça o esquema de uma secção do corte e legende-o atendendo à constituição das paredes celulares.



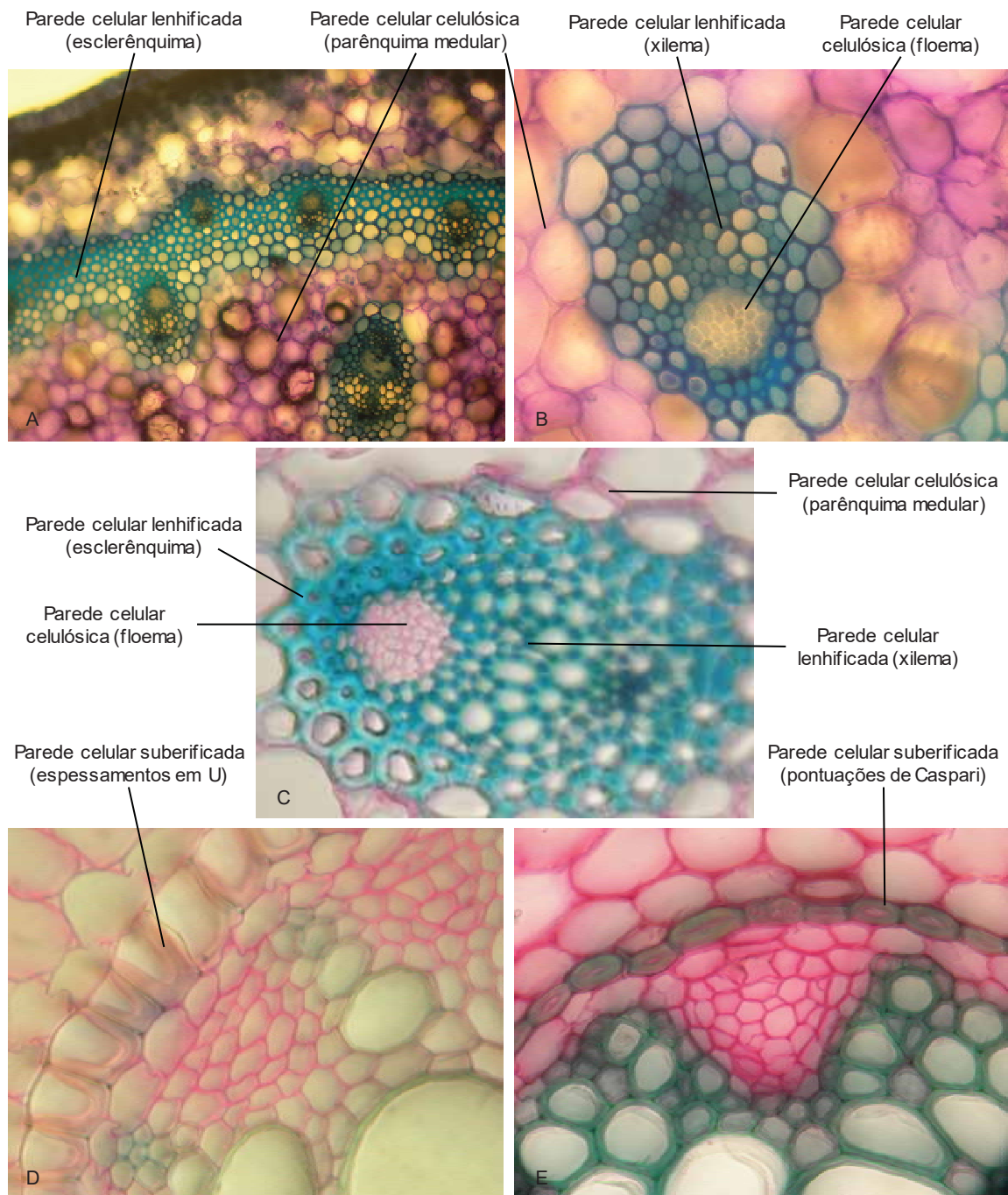


Fig. P.4. Observação, ao microscópio ótico, de secções transversais de caule de *Ruscus* sp. após coloração com azul de toluidina (A-C). As paredes celulares celulósicas surgem coradas de rosa violáceo, as paredes celulares lenhificadas surgem coradas de azul.

Observação, ao microscópio ótico, de secções transversais de raiz de uma monocotiledónea (C) e de uma dicotiledónea (D) após coloração dupla com verde iodo/carmim aluminado. As paredes celulares suberificadas (células da endoderme) surgem coradas de castanho, as paredes celulares celulósicas coram de vermelho e as paredes celulares lenhificadas coram de verde.



### 5º Protocolo - Observação da Parede Celular (Continuação)

1. Caracterização histoquímica da cutícula da folha de *Ficus* sp. (árvore-da-borracha) e observação de cristólitos.

- a) Efetue cortes transversais na folha.
- b) Coloque os cortes em vermelho sudão III, durante 5 min.
- c) Lavagem rápida em etanol a 50 % (desdiferenciação).
- d) Lavagem rápida em água e montagem.

2. Observação de pontuações da parede celular.

- a) Destaque uma porção de epiderme da página da folha ou do caule de *Dianthus* sp. (craveiro) e monte entre lâmina e lamela.
- b) Observe atentamente ao nível da parede celular e desenhe as pontuações aí existentes.

3. Observação de paredes celulares mineralizadas.

- a) Destaque uma pequena porção da epiderme do caule de *Urtica dioica* (urtiga). Monte entre lâmina e lamela numa gota de água.
- c) Faça um esquema legendado.

4. Observação de paredes celulares de reserva

- a) Faça cortes transversais do fruto de *Phoenix dactylifera* (palmeira)
- b) Efetue a dupla coloração com ácido periódico / reagente de Schiff (P.A.S.)
  - I. Imersão em tetraidreto boreto de sódio 1 % (preparar na altura) 30 min
  - II. Ácido periódico 1% 10 min
  - III. Lavagem rápida em H<sub>2</sub>O
  - IV. Imersão em reagente de Schiff 30 min
- c) Lavagem em metabissulfito de sódio 0.5 % 5 min
- d) Lavagem em H<sub>2</sub>O
- d) Monte entre lâmina e lamela numa gota de água. Observe e faça um esquema legendado.

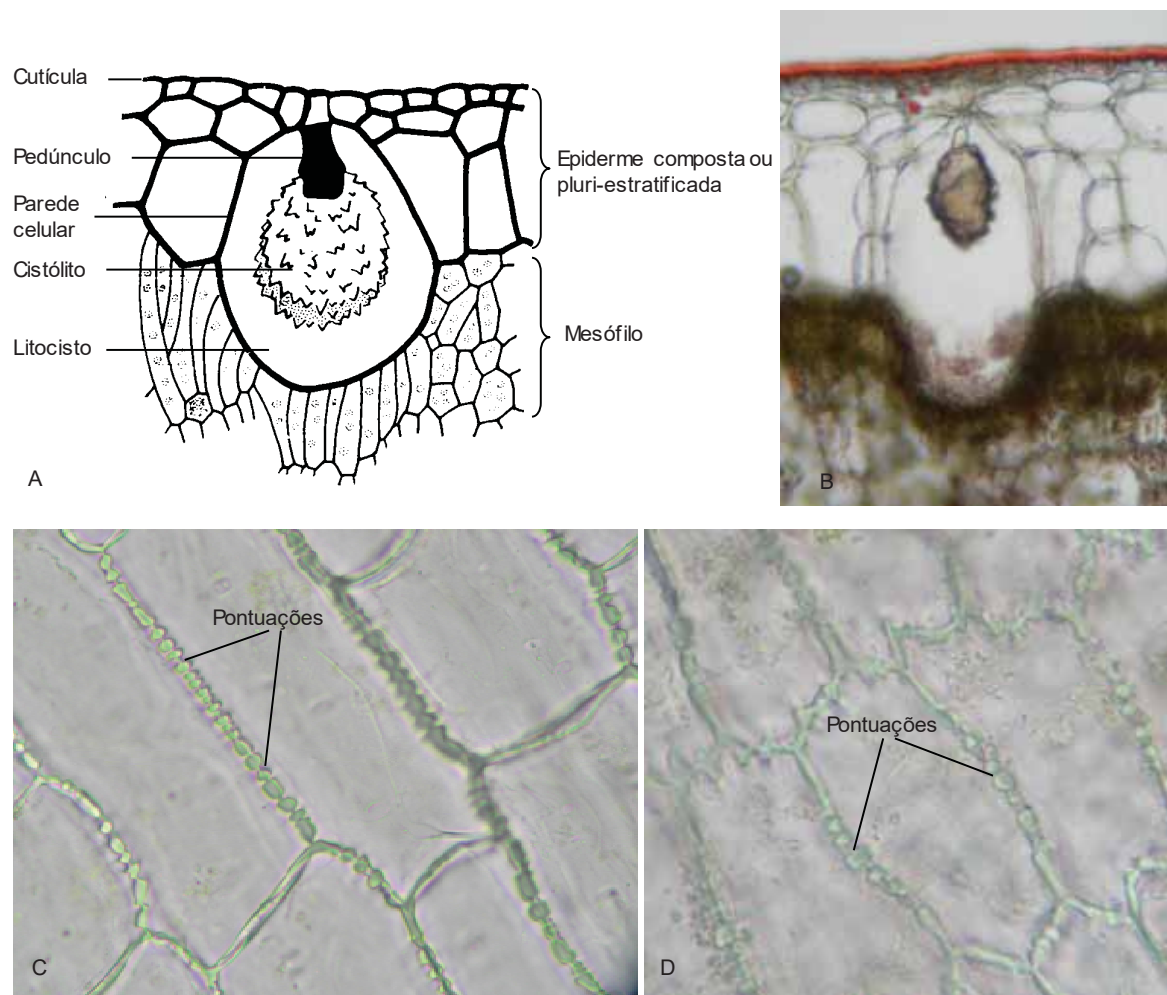


Fig. P.5. Presença de cistólitos em *Ficus elastica* (A, B). Representação esquemática do cistólito, no interior do litocisto, ao nível da epiderme composta da página superior da folha de *Ficus elastica* (A). Observação, ao microscópio ótico, de um cistólito num corte transversal da folha de *Ficus sp.*, surgindo a cutícula corada de vermelho devido à coloração com vermelho sudão III (B). Observação, ao microscópio ótico, de pontuações da parede celular em células da epiderme abaxial da folha de *Dianthus sp.* (C, D).

### **6º Protocolo - Observação da Matriz extracelular (Matriz extracelular animal)**

1. Observação de matriz extracelular em preparações definitivas de diversos tipos de tecidos animais.
  2. Observação de matriz extracelular em tecido cartilagíneo.
    - a) Efetue cortes numa porção de tecido cartilagíneo e coloque-os em água.
    - b) Coloque os cortes em azul de toluidina 0.05%, durante 15 min.
    - c) Lavagem rápida em água e montagem.
- 

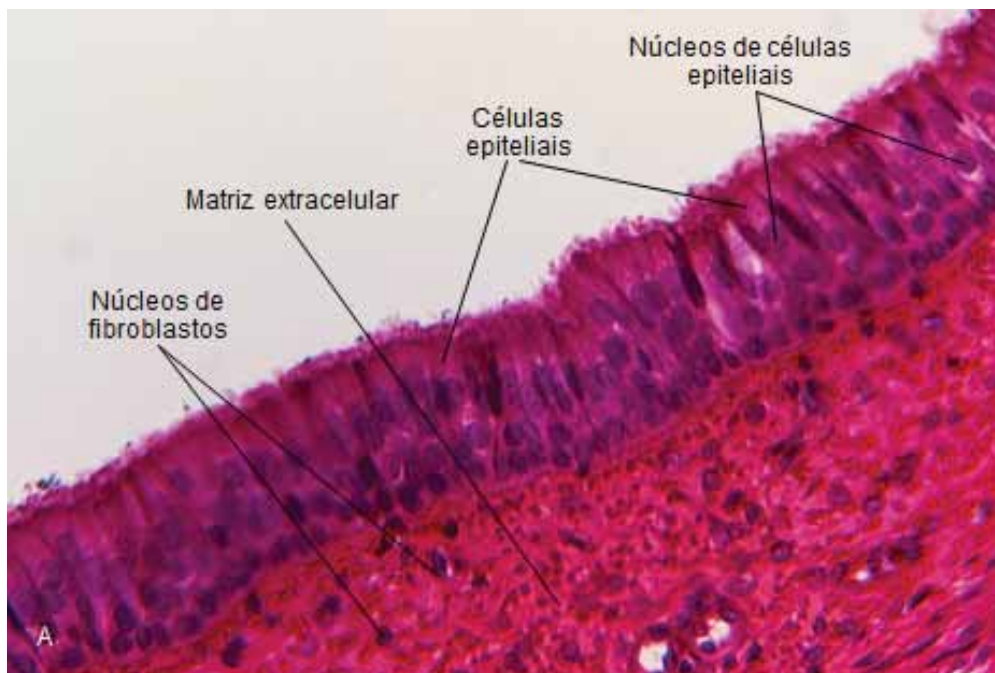


Fig. P.6. Observação, ao microscópio ótico, de secções de diversos tecidos animais, após coloração com hematoxilina e eosina. Secções de traqueia de mamífero (A, B) com epitélio colunar pseudoestratificado ciliado e tecido conjuntivo difuso (A).

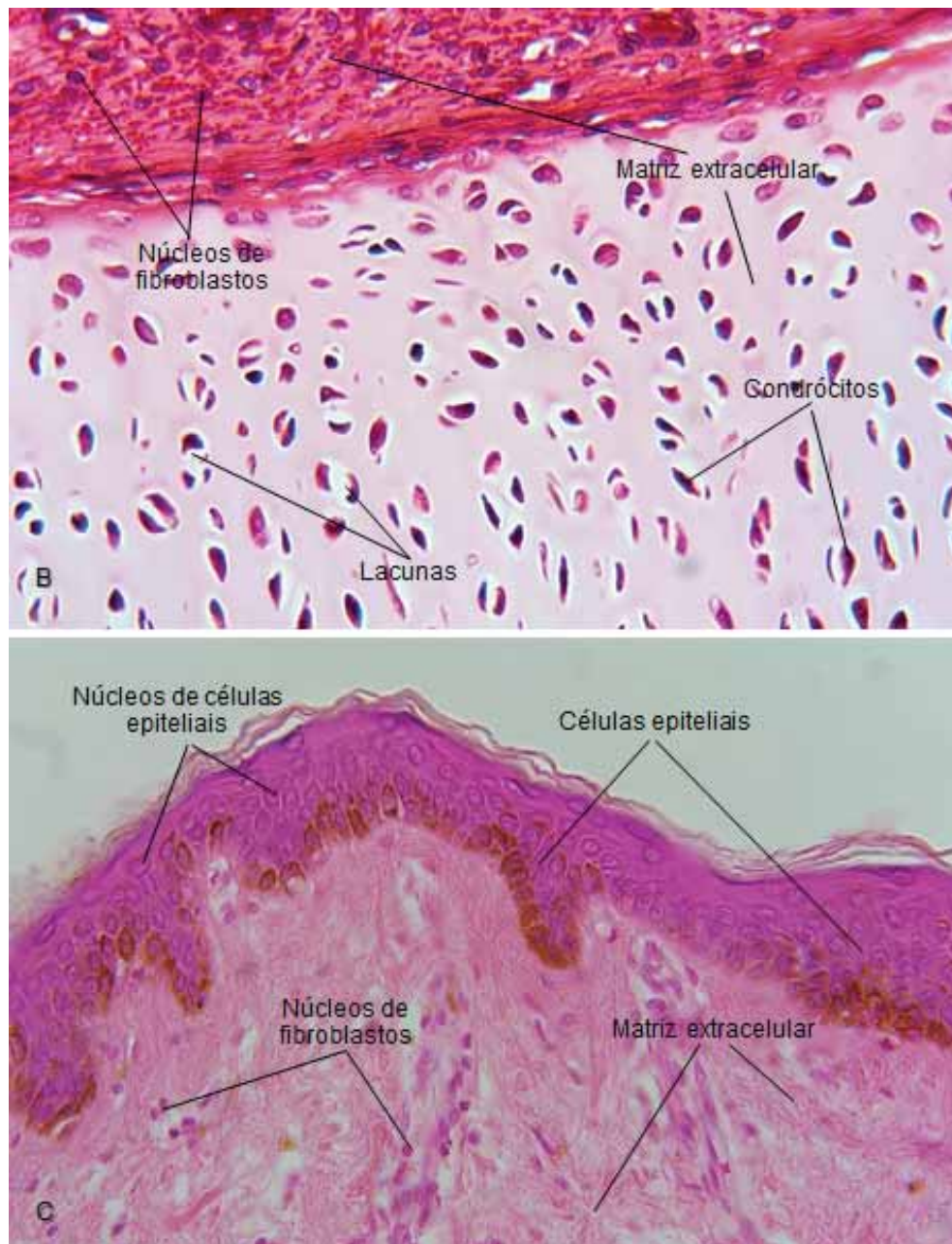


Fig. P.6 (cont.). Observação, ao microscópio ótico, de secções de diversos tecidos animais, após coloração com hematoxilina e eosina. Secções de traqueia de mamífero (A, B) com tecido conjuntivo difuso e tecido cartilágneo (B). Secções de pele humana (C) com epitélio pavimentoso estratificado, sendo visível a zona de escamação, e tecido conjuntivo difuso. De notar a ausência de matriz extracelular nos epitélios e a presença de uma matriz muito desenvolvida nos tecidos conjuntivos, difuso e cartilágneo.

## 7º Protocolo - Estudo da Plasmólise e Deplasmólise e Determinação da Permeabilidade Membranar

### 1. Observação da membrana plasmática (plasmalema ou membrana celular) por indução de plasmólise

- Destaque uma pequena porção da epiderme interna de uma escama do bolbo de *Allium cepa* (cebola) e monte-a, entre lâmina e lamela, em vermelho neutro. Observe e faça um esquema legendado.
- Substitua o meio de montagem por uma solução saturada de sacarose, utilizando o método de irrigação. Observe e faça um esquema legendado.
- Substitua a solução saturada de sacarose do meio de montagem por H<sub>2</sub>O. Observe e faça um esquema legendado.

### 2. Determinação da permeabilidade membranar

- Faça 5 preparações diferentes, cada uma contendo cortes transversais finos de raiz de *Beta* sp. (beterraba) montados entre lâmina e lamela numa gota de água e observe no menor poder de ampliação (4x). Faça um esquema legendado.
- Controlando através da ocular de 4x, substitua cada um dos meios de montagem por um dos álcoois abaixo mencionados, de modo que todo o corte fique submerso, mas sem causar derrame da solução para fora da lamela.  
22.0 M Metanol  
8.5 M Etanol  
3.0 M *n*-Propanol  
1.1 M *n*-Butanol
- Conte o tempo que decorre entre a substituição do meio de montagem pelo álcool e a libertação do pigmento para o meio de montagem.
- O processo pode ser repetido, com outros cortes, com os mesmos álcoois diluídos para metade e para um quarto.
- Para cada álcool, calcule o coeficiente de penetração dividindo o tempo de aparecimento do pigmento pela concentração molar do álcool. Faça um gráfico em que relaciona o coeficiente de penetração com a miscibilidade relativa do álcool (coeficiente de partição).

Álcool	Fórmula	Peso Molecular	Coeficiente Partição	Coeficiente de penetração
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32.04	0.01	
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46.07	0.03	
<i>n</i> -Propanol	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	60.09	0.13	
<i>n</i> -Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	74.12	0.58	



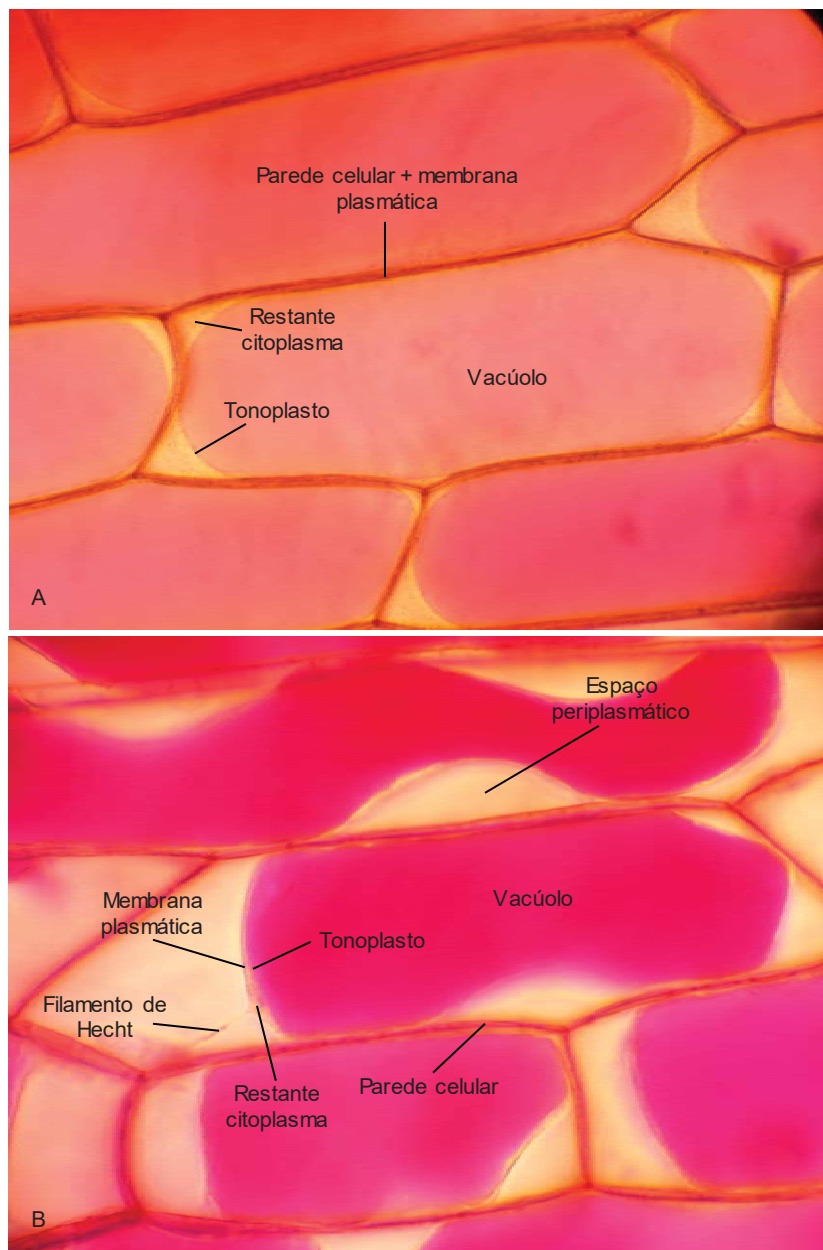


Fig. P.7. Observação, ao microscópio ótico, de células da epiderme interna da escama do bolbo de *Allium cepa*, coradas com vermelho neutro, antes (A) e após (B) a indução de plasmólise pela utilização de uma solução hipertônica. Nas células plasmolisadas é possível visualizar a membrana plasmática afastada da parede celular e o espaço periplasmático.

## 8º Protocolo - Estudo do Vacúolo

### 1. Observação de cristais de oxalato de cálcio.

- a) Observação de ráfides: Faça um corte longitudinal na folha de *Aloe* sp. (aloé) ou, em alternativa, na espata de *Zantedeschia* sp. (jarro). Monte, entre lâmina e lamela numa gota de água, e observe.
- b) Observação de drusas: Destaque a epiderme da sépala de *Pelargonium* sp. (sardineira). Monte, entre lâmina e lamela numa gota de água, e observe.
- c) Observação de cristais prismáticos: Destaque uma pequena porção de epiderme da escama externa do bolbo de *Allium cepa*. Monte, entre lâmina e lamela numa gota de água (ou glicerina), e observe.

### 2. Observação de cristais de inulina.

- a) Material: Fragmento de tubérculo de *Dahlia* sp. (dália) conservado em álcool a 70%.
- b) Faça secções finas do fragmento de tubérculo de *Dahlia* sp.
- c) Monte entre lâmina e lamela numa solução de glicerina e observe.

### 3. Observação de grãos de aleurona.

- a) Seccione uma semente de *Ricinus communis* (rícinio). Faça cortes muito finos e proceda à sua coloração com azul de bromofenol.
  - I. Imersão em azul de bromofenol durante 10 min
  - II. Lavagem rápida em ácido acético 0,5 %
  - III. Lavagem rápida em H<sub>2</sub>O
  - IV. Montagem e observação.

### 4. Observação de vacúolos corados (antocianinas).

- a) Destaque uma porção da epiderme adaxial de base da pétala de *Hibiscus* sp. (hibisco).
- b) Monte numa gota de água, entre lâmina e lamela, e observe os vacúolos corados.
- c) Depois de efetuado o esquema, substitua o meio de montagem, pelo método de irrigação, por uma solução de nitrato de amónio ou hidróxido de sódio (solução alcalina) e observe as alterações que ocorrem ao nível do vacúolo.

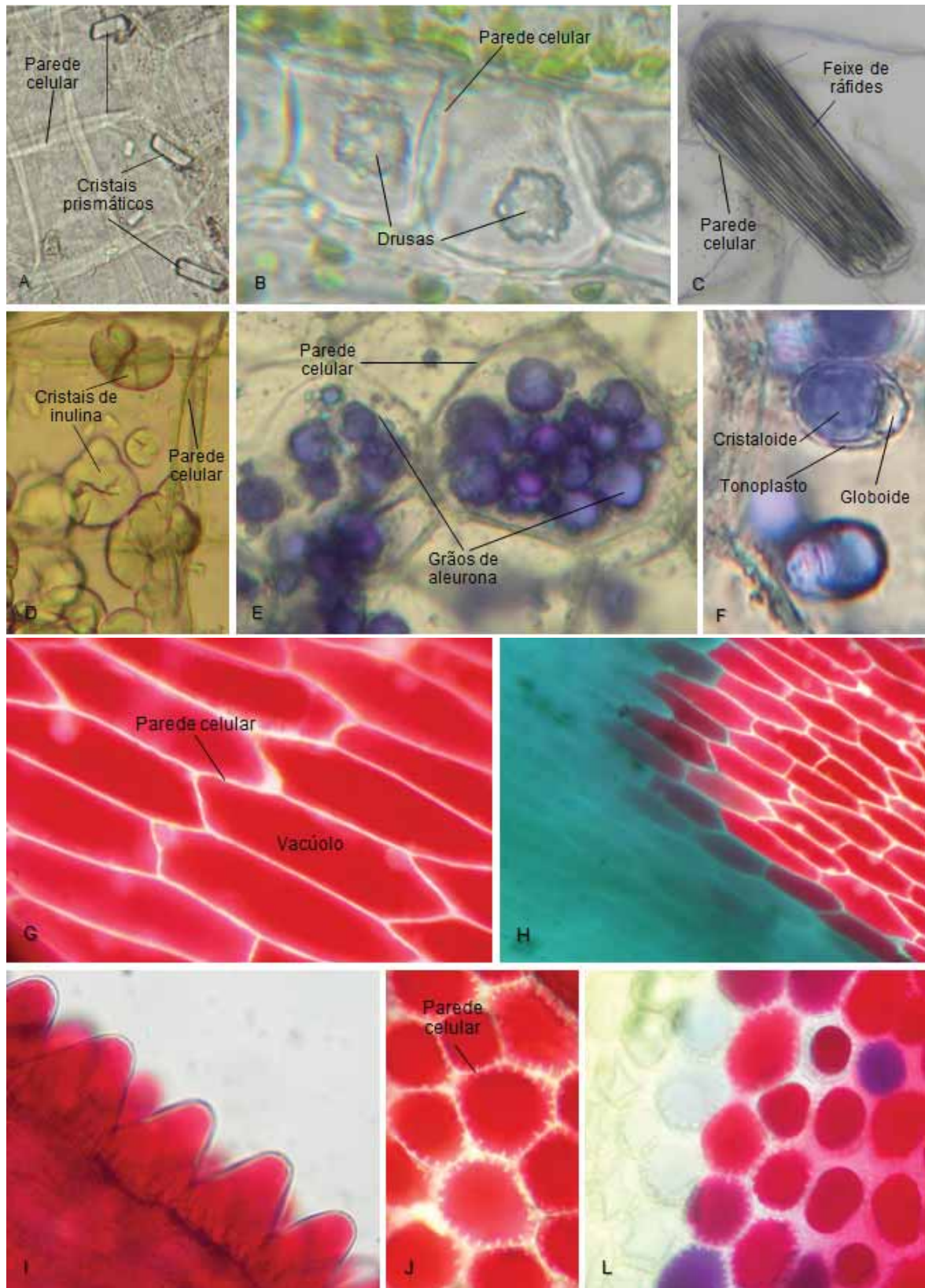


Fig. P.8. Observação, ao microscópio ótico, de inclusões vacuolares diversas: cristais de oxalato de cálcio [cristais prismáticos (A), drusas (B), ráfides (C)], cristais de inulina (D), grãos de aleurona corados com azul de bromofenol (E, F) e antocianinas (G-L). No caso das antocianinas a alteração do pH do meio promove alterações na cor manifestada pelas antocianinas (H, L).

### 9º Protocolo - Observação de Movimentos de Ciclose, Observação de Cloroplastos

#### 1. Observação de movimentos de ciclose

- a) Monte, entre lâmina e lamela, uma folha de *Elodea*<sup>3</sup> sp. (elodea) e observe os movimentos de ciclose.

#### 2. Observação de cloroplastos em algas

- a) Monte, entre lâmina e lamela, um filamento de *Spirogyra* sp. (espirogira) e observe os cloroplastos com pirenoides. Substitua, por irrigação, o meio de montagem por uma solução de Lugol e observe.

#### 3. Observação de cloroplastos em plantas superiores

- a) Faça cortes transversais da folha *Nerium* sp. (loendro), monte entre lâmina e lamela e observe. Seguidamente, pelo método de irrigação, substitua a solução de montagem por uma solução de Lugol e observe.

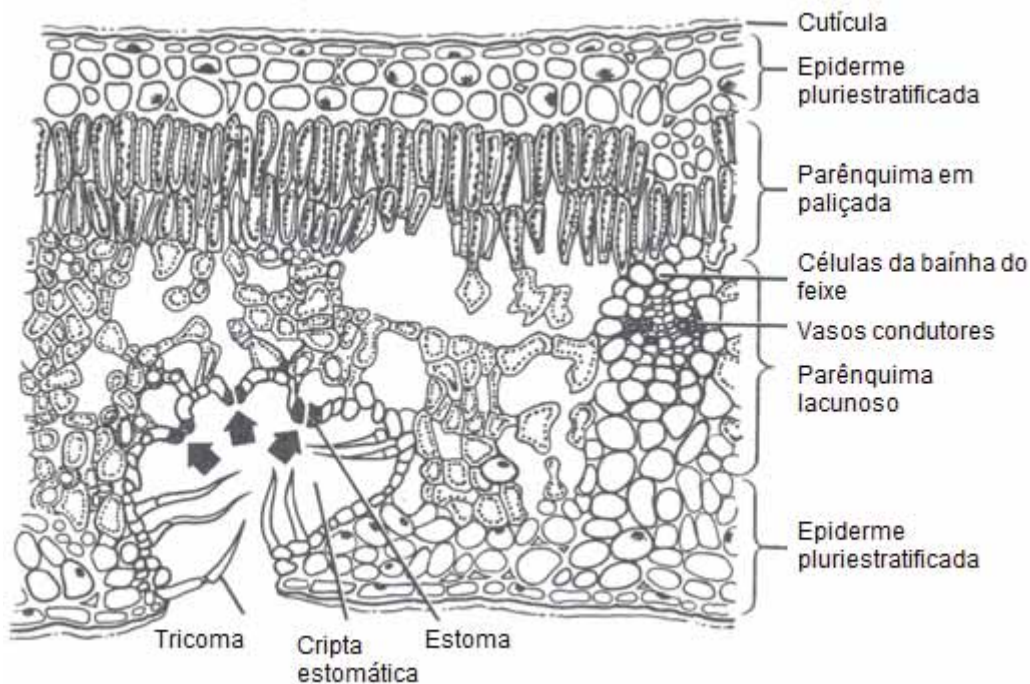


Fig. P.9a. Representação esquemática da secção transversal da folha de *Nerium oleander*.

<sup>3</sup> *Elodea canadensis* é uma espécie exótica e invasora em Portugal pelo que não é permitida a sua plantação e propagação.



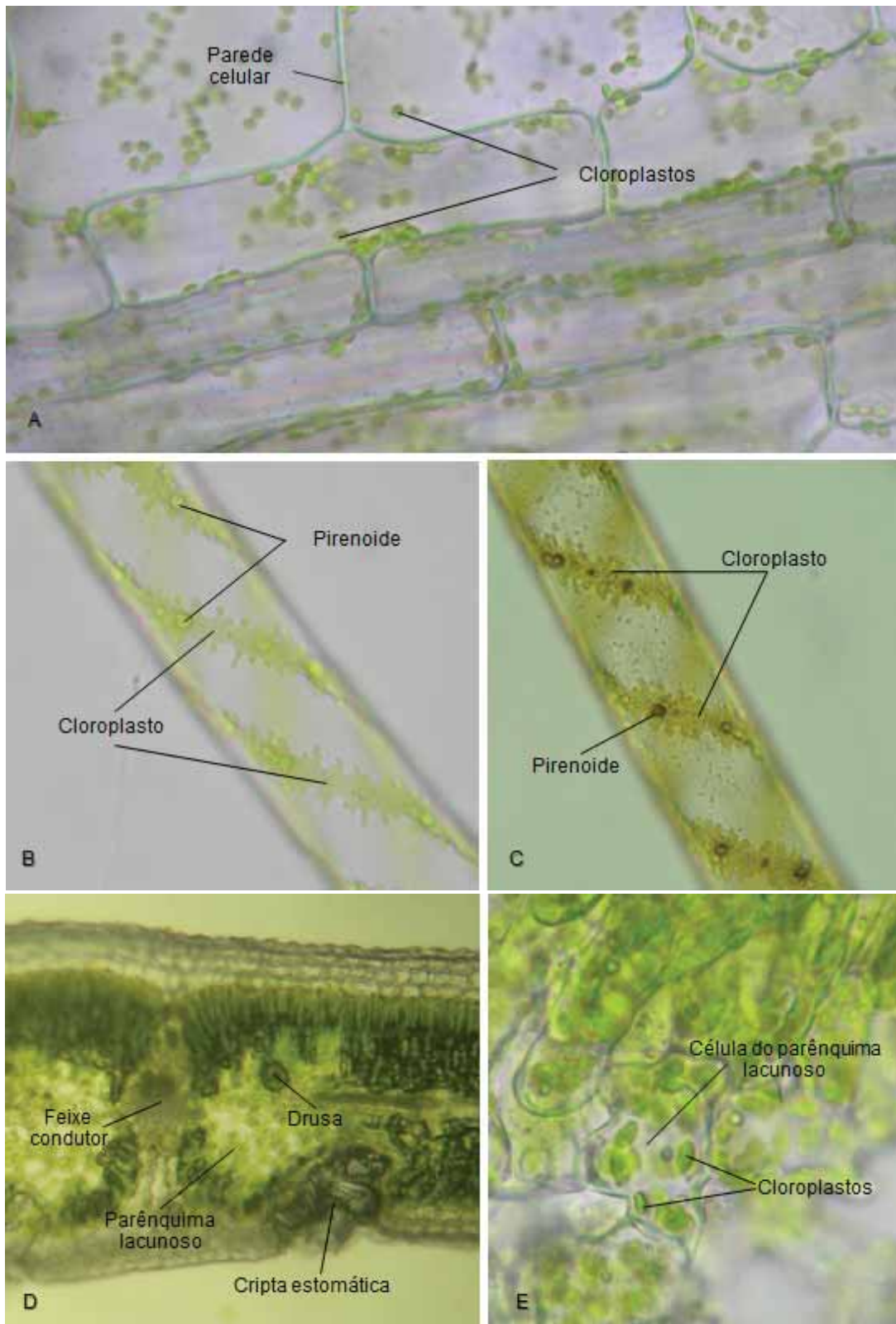


Fig. P.9b. Observação, ao microscópio ótico, de cloroplastos em *Elodea* sp. (A), em *Spyrogira* sp. (B) e em *Nerium oleander* (E). Após irrigação com soluto de Lugol, o amido acumulado em redor dos pirenoides aparece realçado (C). A representação esquemática (página anterior) e a observação, ao microscópio ótico (D), da secção transversal da folha de *Nerium oleander* permitem obter uma visão geral da estrutura da folha.



## 10º Protocolo - Observação de Plastos

### 1. Observação de leucoplastos e cloroplastos

- a) Destaque uma porção de epiderme de um caule jovem ou de epiderme adaxial da folha de *Tradescantia zebrina*<sup>4</sup>. (erva-da-fortuna), monte entre lâmina e lamela e observe. Seguidamente, substitua, pelo método de irrigação, a solução de montagem por uma solução de Lugol e observe.

### 2. Observação de amiloplastos

- a) Faça cortes finos do tubérculo de *Solanum tuberosum* (batateira), monte entre lâmina e lamela e observe. Substitua, pelo método de irrigação, o meio de montagem por uma solução de Lugol e observe.
- b) Faça cortes finos da polpa do fruto de *Musa* sp (bananeira). Proceda como em a).

### 3. Observação de cromoplastos

- a) Destaque uma porção da epiderme do fruto de *Pyracantha* sp. (piracanto), ou, em alternativa, da epiderme adaxial da pétala de *Aloe*, *Tropaeolum* (capuchinha) ou de *Gerbera* (gerbéra), monte entre lâmina e lamela e observe. Seguidamente, substitua, pelo método de irrigação, a solução de montagem por uma solução de Lugol e observe. Faça uma nova preparação e substitua, pelo método de irrigação, a solução de montagem por uma solução de NaOH e observe.
- b) Faça cortes transversais na raiz de *Daucus carota* (cenoura), monte entre lâmina e lamela e observe. Seguidamente, substitua, pelo método de irrigação, a solução de montagem por uma solução de Lugol e observe.

---

<sup>4</sup> *Tradescantia zebrina* é uma espécie exótica e invasora na Região Autónoma da Madeira, e outras espécies de *Tradescantia*, como é o caso de *T. fluminensi*, são consideradas espécies exóticas e invasoras em Portugal pelo que não é permitida a sua plantação e propagação.

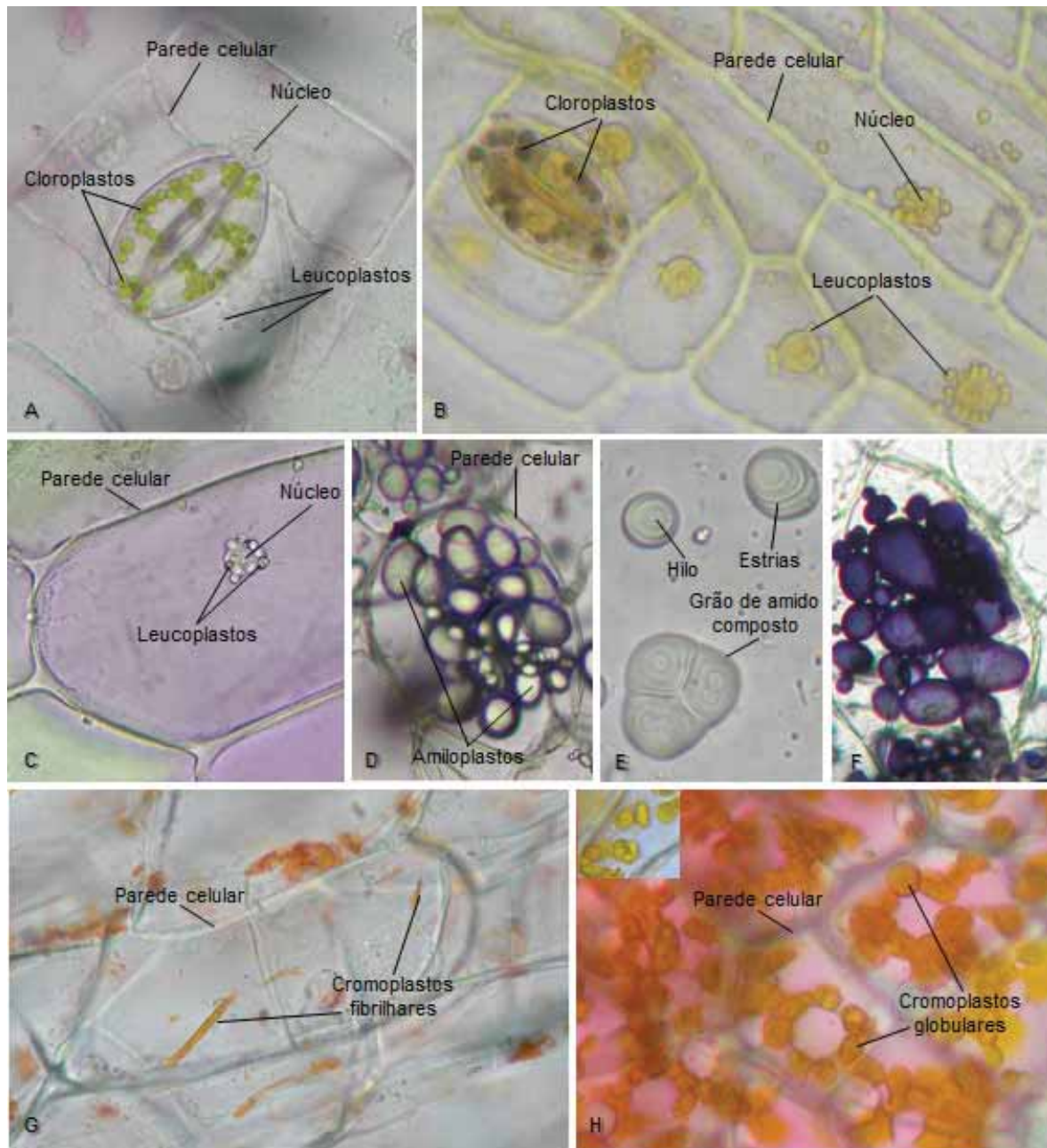


Fig. P.10. Observação, ao microscópio ótico, de diversos tipos de plastos: cloroplastos e leucoplastos em *Tradescantia zebrina*. (A-C), amiloplastos em *Solanum tuberosum* (D-F) e cromoplastos em *Daucus carota* (G) e em *Pyracantha* sp. (H). A irrigação com soluto de Lugol revela a presença de amido no interior dos cloroplastos presentes nas células estomáticas (B) e uma reação intensa nos amiloplastos (F). Os cromoplastos fibrilares de *Daucus carota* acumulam carotenos (G) enquanto os cromoplastos globulares de *Pyracantha* sp. acumulam xantofilas (H), cuja cor amarela é revelada após descoloração das antocianinas acumuladas no vacúolo (inserção na esquerda superior da foto).

### **11º Protocolo - Observação de Figuras de Mitose e Meiose e Determinação da Duração das Diferentes Fases**

#### **1. Observação de figuras de mitose em ápices radiculares de *Allium cepa***

- a) Coloque um ápice radicular de *Allium cepa* num microtubo (Eppendorf) contendo uma gota de HCl 1N, e 2 gotas de orceína acética. Agite moderadamente e deixe em repouso durante 1 h.
- b) Transfira o material para uma lâmina limpa, faça um esfregaço e observe.

\* Alternativamente:

- a) Coloque um ápice radicular de *Allium cepa* numa lâmina de vidro e, sobre ele, uma gota de HCl 1N, e 3 gotas de orceína acética. Deixe em repouso durante 5 min.
- b) Aqueça suavemente até concentrar o corante em torno do ápice, sem deixar secar.
- c) Repita a operação, mais duas vezes, após adicionar uma gota de orceína acética.
- d) Transfira o material para uma lâmina limpa, faça um esfregaço e observe.

#### **2. Observação de figuras de mitose em preparações definitivas.**

#### **3. Determinação da duração das diferentes fases de mitose.**

- a) O ciclo celular de uma célula de cebola é aproximadamente de 20h. É possível estimar a duração de cada uma das fases mitóticas, contando o número de células em cada um dos estádios em vários campos de observação e utilizando a fórmula seguinte:

Duração da fase = (nº de células em cada fase / nº total de células contadas) x 20h

Fase	Nº de Células	Duração da Fase
Interfase		
Prófase		
Metáfase		
Anáfase		
Telófase		
Nº total de células		

#### **4. Observação de figuras de meiose em preparações definitivas.**

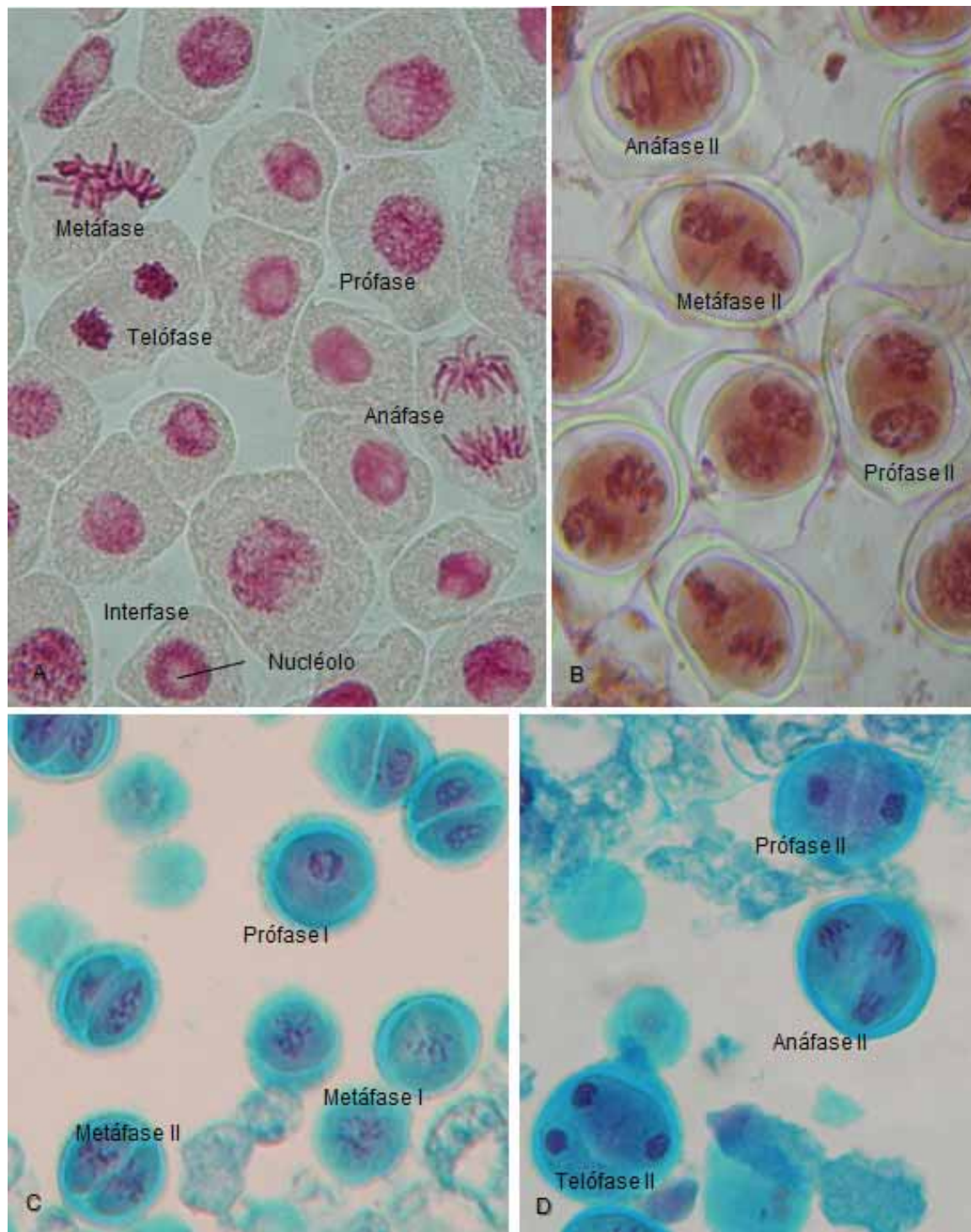


Fig. P.11. Observação, ao microscópio ótico, de diversas fases de mitose em ápice radicular de *Allium cepa*, após coloração com orceína acética (A), de meiose em anteras de *Aloe* sp. após coloração com orceína acética (B) e de meiose em anteras de *Lillium* sp. após coloração com hematoxilina (C, D).



## 12º Protocolo - Microscopia Eletrônica

1. Princípios de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Transmissão.
2. Princípios de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varrimento.

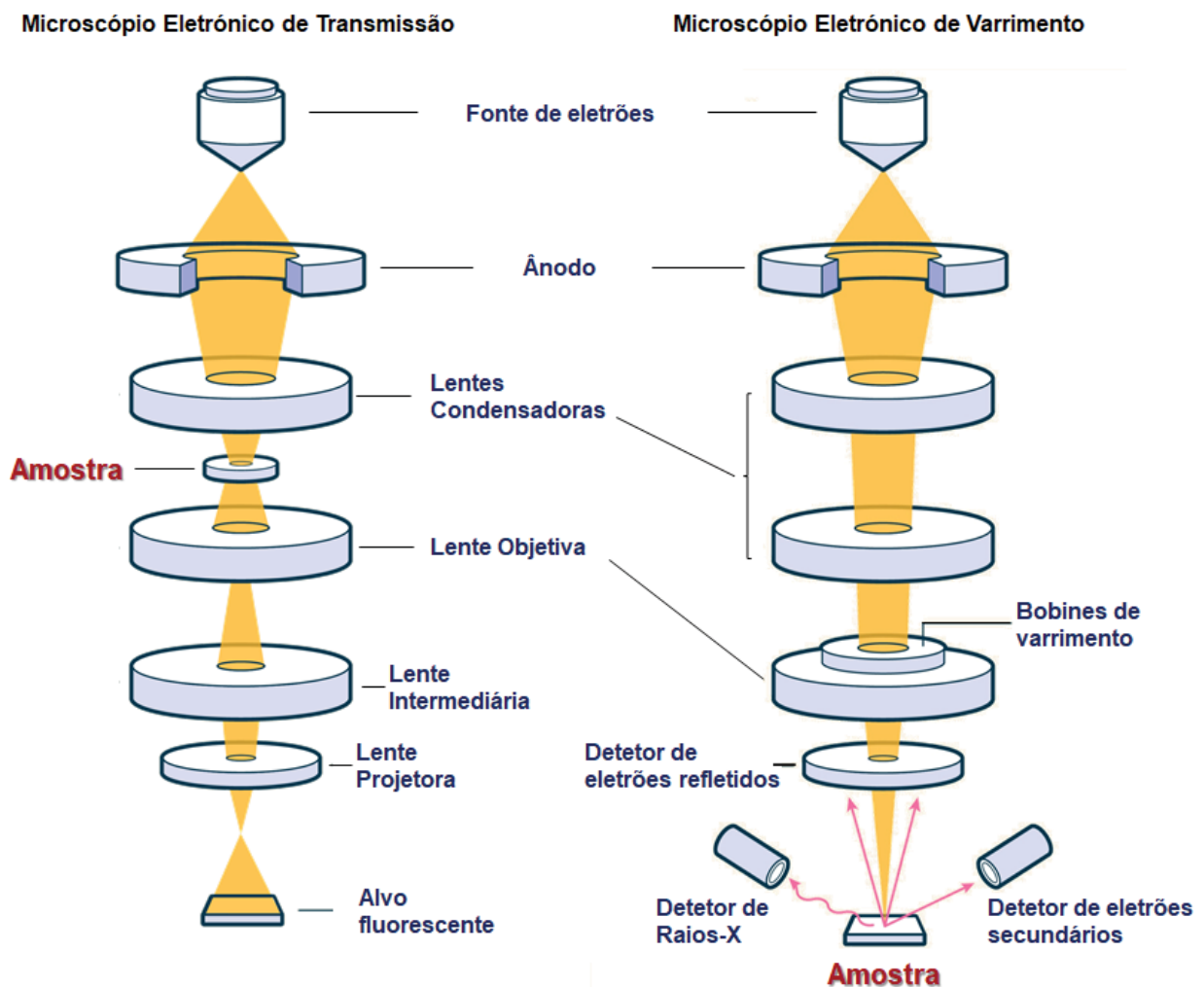


Fig. P.12. Representação esquemática, para comparação, dos mecanismos de funcionamento do microscópio eletrônico de transmissão e do microscópio eletrônico de varrimento.



### 13º Protocolo - Observação de imagens de Microscopia Ótica e Eletrônica

1. Discussão de imagens de Microscopia Ótica e Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varrimento.

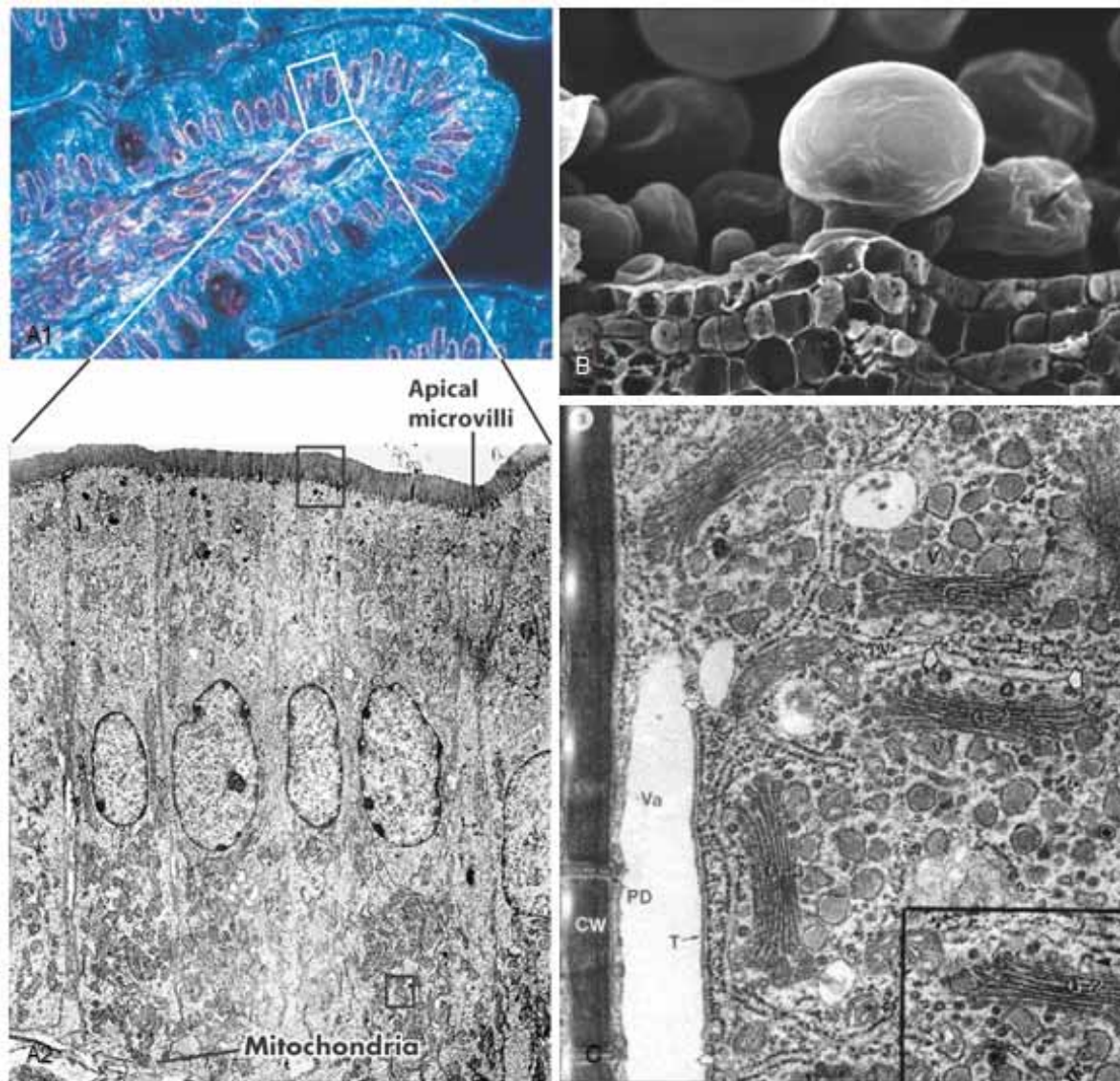


Fig. P.13. Microfotografias obtidas em: microscópio ótico de fluorescência (A1) com detalhe em microscópio eletrônico de varrimento (B), microscópio eletrônico de transmissão (A2), e microscópio eletrônico de transmissão (C).

## 6. APÊNDICE

### **Reagente de Löfler**

Azul de metileno	4,2 g/l
Álcool 96%	190,0 g/l
pH 8.4	

Juntar o azul de metileno e o álcool e agitar até à sua completa dissolução. Acertar o pH

Resultado da coloração: Coloração geral azul, não específica.

### **Corante de Newman-Lampert**

Azul de metileno	1,0 g
Álcool 96%	54,0 ml
Clorofórmio	40,0 ml
Ácido acético glacial	6,0 ml

Adicionar o álcool ao clorofórmio e aquecer a mistura a uma temperatura não superior a 70°C. Para o efeito, mergulhar o balão num recipiente com água aquecida. Sendo a mistura inflamável, evitar a proximidade de chama.

Juntar o azul de metileno e agitar até à sua completa dissolução.

Depois de arrefecida a mistura, à temperatura ambiente, adicionar, lentamente, o ácido acético glacial. Filtrar.

Resultado da coloração: Coloração geral azul, não específica.

### **Vermelho Sudão III**

Solução saturada (0.3%) de Vermelho Sudão III em Etanol 70%.

Resultado da coloração: Os lípidos coram de vermelho.

### **Reagente de Schiff (P.A.S.)**

Dissolver 2,0 g de Pararosanilina (Fucsina diamante) em 60 ml de HCl 1N. Juntar 300 ml de água destilada à qual se adicionaram 2,0 g de metabissulfito de sódio. Misturar bem e deixar repousar 24 h, em frasco rolhado. Adicionar 1,2 g de carvão ativado e agitar durante 2 min. Filtrar a solução e manter o filtrado incolor, no escuro, a 4°C (por um período máximo de dois meses).

Resultado da coloração: Os polissacáridos coram de rosa vivo.

### **Metabissulfito de Sódio 0.5%**

Metabissulfito de Na ou K	
ou Bissulfito de Na	1,0 g
HCl 1N	10,0 ml
H <sub>2</sub> O	190,0 ml

### **Azul de Toluidina**

Azul de Toluidina	0,05 g
Tampão Acetato 0,1M ph 4.4	100,0 ml
<u>Filtrar antes de usar</u>	

Resultado da coloração: As paredes celulares celulósicas coram de rosa; as paredes celulares lenhificadas coram de azul.

### **Vermelho Neutro**

Vermelho Neutro	5,0 g
H <sub>2</sub> O	500,0 ml
Adicionar	
Tampão Acetato ph 4.8	20,0 ml
Filtrar antes de usar	

Resultado da coloração: Os vacúolos coram de vermelho claro.

### **Tampão Acetato 37mM ph 4.8**

Acetato de Sódio anidro	1,53 g
Ácido Acético glacial	0,6 ml
H <sub>2</sub> O	500,0 ml
Verificar o ph	

***Soluto de Lugol***

Iodo	1,0 g
Iodeto de Potássio	2,0 g
H <sub>2</sub> O	100,0 ml

Resultado da coloração: Amido cora de castanho, roxo ou azul violáceo de acordo com a proporção relativa de amilose e amilopectina.

**Azul de Bromofenol**

Solução de Azul de Bromofenol 0,1 % em etanol 95%

Resultado da coloração: As proteínas coram de azul claro.

***Solução de Ringer***

Cloreto de Sódio	6,0 g
Cloreto de Potássio	0,075 g
Cloreto de Cálcio	0,1 g
Bicarbonato de Cálcio	0,1 g
H <sub>2</sub> O	1000,0 ml

***Orceína Acética***

Orceína	1,0 g
Ácido Acético glacial	45,0 ml
H <sub>2</sub> O	55,0 ml

Aquecer a mistura a uma temperatura não superior a 70°C. Para o efeito, mergulhar o balão num recipiente com água aquecida. Sendo a mistura inflamável, evitar a proximidade de chama. Filtrar depois de arrefecida a mistura

Resultado da coloração: Cromossomas coram de vermelho.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2014) *Molecular Biology of the Cell*. 6<sup>th</sup> Ed. Garland Science, Inc. New York London.
- Azevedo C., C. E. Sunkel (2012) *Biologia Celular e Molecular*. 5<sup>a</sup> Edição. Lidel, Edições Técnicas, Lisboa.
- Camefort H. (1977) *Morphologie des Végétaux Supérieurs*, Doin Editeurs, Paris.
- Clark, M. A., J. Choi, M. Douglas (2018) OpenStax Biology 2nd Edition, Biology 2e. OpenStax CNX. Sep 26, 2018 <http://cnx.org/contents/8d50a0af-948b-4204-a71d-4826cba765b8@14.24>.
- Cooper, G.M. (2019) *The Cell: A Molecular Approach*. 8th Ed. Oxford University Press, New York. [https://learninglink.oup.com/access/cooper8xe-student-resources#tag\\_all-chapters](https://learninglink.oup.com/access/cooper8xe-student-resources#tag_all-chapters).
- Cross P. C., K. L. Mercer (1993) *Cell and Tissue Ultrastructure*. W. F. Freeman, New York.
- Davis P. W., E. P. Solomon, L. R. Berg (1995) *The World of Biology*. Saunders College Publishing, London.
- Deysson G. (1978) *Organisation et Classification des Plantes Vasculaires*, Société D'Édition D'Enseignement Supérieur, Paris.
- Fernandes, F.M., L.M. Carvalho (2003) Portugal Botânico de A a Z – Plantas Portuguesas e Exóticas. Lidel, Edições Técnicas, Lisboa (ISBN: 972-757-265-0).
- Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro, L. Ascensão (2007) *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos*, Lisboa, 1<sup>a</sup> Edição. Edição Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal (ISBN: 978-972-9348-17-4).
- Foster B. (1997) *Optimizing Light Microscopy for Biological and Clinical Laboratories*, American Society for Clinical Laboratory Science, Kendall/Hunt Publishing Company, USA.
- Fuller G. M., D. Shields (1998) *Molecular Basis of Medical Cell Biology*. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.
- Gabriel B. L. (1972) *Biological Electron Microscopy*, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Gabriel B. L. (1982) *Biological Scanning Electron Microscopy*, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Gunning B. E. S., M. W. Steer (1996) *Plant Cell Biology*. Jones and Bartlett Publishers, USA.
- Karp G (2010) *Cell and Molecular Biology*. 6<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amond, Kelsey C. Martin (2016) *Molecular Cell Biology*, 8th Ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- Maillet M. (1995) *Biologie Cellulaire*. 7e Edition. Masson, Paris.
- Morgan J.G., M.E.B. Carter (1993) *Investigating Biology: A Laboratory Manual for Biology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City.
- Norman R. I., D. Lodwick (1999) *Medical Cell Biology*. Churchill Livingstone, London.
- Nultsch W. (1969) *Botanique Générale*, Masson et Cie Editeurs, Paris.
- Rawlins D. J. (1993) *Light Microscopy*, Bios Scientific Publishers.
- Robert D., A. M. Catesson (1990) *Biologie Végétale*. Tome II. *Organisation Végétative*. Doin Éditeurs, Paris.
- Robert D., J.-C. Roland (1989) *Biologie Végétale*. Tome I. *Organisation Cellulaire*. Doin Éditeurs, Paris.
- Robertis E. de, E. M. de Robertis (1996) *Biologia Celular e Molecular*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Sadava D., D.M. Hillis, H. Craig Heller, M.R. Berenbaum (2012) *Life, the science of biology*. 10th ed. Sinauer Associates, Inc.
- Sheeler P., D. E. Bianchi (1987) *Cell and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Stern K. R. (1994) *Introductory Plant Biology*, W. C. Brown Publishers, USA.
- Wolfe S. L. (1993) *Molecular and Cellular Biology*. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California.

<http://biodidac.bio.uottawa.ca/Thumbnails/histocatquery.htm>  
<http://www.histology-world.com/factsheets/epithelium.htm>

Muitos dos esquemas apresentados são adaptações dos encontrados na Bibliografia utilizada



## 8. INDICE REMISSIVO

- aberração cromática, 1, 4
- aberração esférica, 1, 4
- abertura numérica da objetiva, 3
- alcaloides, 47
- algas, 25
- Algas castanhas, 26
- Algas verdes, 25
- Algas vermelhas, 25
- Alinhamento do Microscópio, 10
- aloficocianina, 53
- amilopectina, 55
- Amiloplastos, 55
- amilose, 55
- aminoácidos, 47
- ampliação, 2
- anáfase, 58
- Anáfase, 60
- Anáfase I, 63
- Anáfase II, 63
- Animais, 27
- antocianinas, 49
- Archaea, 18
- autofluorescência, 8
- Bacillus*, 14
- Bactéria, 16
- bacterioclorofila, 53
- Calibração da ocular, 10
- carmim aluminado, 32
- carotenos, 55
- Cerificação, 33
- Cianobactérias, 16
- cianoficina, 17
- Ciliados, 21
- Cloroplastos, 52
- Coccus*, 14
- colagénio, 38
- Contrastação, 68
- contraste, 2, 4
- corantes vitais, 4
- Criossecagem, 70
- cristais prismáticos, 49
- cristaloide, 49
- cromatina, 57
- Cromoplastos, 55
- crossing-over, 63
- cumarinas, 47
- Cutinização, 33
- Desidratação, 68
- Diatomáceas, 24
- difusão, 43
- difusão facilitada, 44
- Dinoflagelados, 23
- Diplococcus*, 14
- Diplóteno, 63
- distância de trabalho, 3
- Diversidade Celular, 12
- drusas, 49
- elastina, 38
- eletrões primários, 68
- eletrões secundários, 68
- endósporos, 14
- espaço perinuclear, 57
- espaço periplasmático, 16
- Espirilos*, 14
- Esporoderme, 36
- Esporozoários, 22
- estrias, 55
- Eucariotas, 13, 18
- Euglenóides, 22
- exina, 37
- ficobilinas, 17, 52
- ficobilissomas, 53
- ficocianina, 17, 52
- ficoeritrina, 17, 52
- Fixação, 67
- Flagelados, 22
- flagelina, 14
- flagelos, 14
- fluorocromos, 8
- Focagem, 10
- fórmula de Abbe, 3
- fucoxantina, 52
- Fungos, 27
- Fungos Mucilaginosos e Aquáticos, 27
- fuso acromático, 59
- glicosaminoglicanos, 37
- globoides, 49
- glóbulos osmiófilos, 53
- Gram-negativas, 15
- Gram-positivas, 15
- grãos de aleurona, 49
- heterocistos, 17
- hilo, 55
- histonas, 58
- histoquímica, 4
- hormogónios, 18
- Impregnação e Inclusão, 68
- índice de refração do meio, 3
- Intercinese, 63
- interfase, 58
- intina, 37
- inulina, 47
- invólucro cloroplastidial, 53
- invólucro nuclear, 57
- lamela média, 28
- Lavagens, 68
- Lenhificação, 32
- Leptóteno, 61
- Leucoplastos, 54
- licopenos, 55

- Matriz extracelular, 37  
 medição, 2  
 meio hipertônico, 45  
 Meiose, 61  
 Meiose I, 61  
 Meiose II, 63  
 Membrana celular, 43  
 membrana celular externa, 16  
 Membrana plasmática, 43  
 metabolismo primário, 51  
 metabolismo secundário, 51  
 metáfase, 58  
 Metáfase, 60  
 Metáfase I, 63  
 Metáfase II, 63  
 Metalização, 71  
 micelas, 28  
 Microscopia confocal, 8  
 microscopia eletrônica, 65  
 Microscopia eletrônica de transmissão, 65  
 Microscopia eletrônica de varrimento, 68  
 Microscópio de contraste de fase, 6  
 Microscópio de fluorescência, 7  
 Microscópio de fundo escuro, 5  
 Microscópio de interferência ou de Nomarski, 6  
 Microscópio Ótico, 1  
 Mineralização, 35  
 Mitose, 58  
 moléculas de adesão celular, 37  
 Movimentos de ciclose, 45  
 Negro Sudão, 35  
 Núcleo, 56  
 núcleo interfásico, 58  
 nucléolos, 57  
 Oleoplastos, 56  
 Oxalato de cálcio, 49  
 Paquíteno, 63  
 parede celular primária, 28  
 parede celular secundária, 28  
 Parede celular vegetal, 28  
 Paredes de Reserva, 33  
 peptidoglicanos, 16  
 Pirenoides, 25  
 Plantas, 27  
 plasmalema, 43  
 plasmódios, 57  
 plasmólise, 45  
 plastoglóbulos, 53  
 Plastos, 51  
 poder de resolução, 2, 3  
 pontuações, 31  
 poros nucleares, 57  
 pré-fixação, 67  
 Procariotas, 13  
 prófase, 58  
 Prófase, 59  
 Prófase I, 61  
 Prófase II, 63  
 proteínas adesivas, 37  
 proteínas extrínsecas, 43  
 proteínas intrínsecas, 43  
 proteoglicanos, 37  
 Proteoplastos, 56  
 Protistas, 21  
 Protozoários, 21  
 ráfides, 49  
 resolução, 2  
 retículo periférico, 53  
 Rizópodes, 21  
 Sais Minerais, 47  
 Secagem ao ar, 70  
 Secagem pelo método do ponto crítico, 70  
 Seccionamento, 68  
 sincícios, 42, 57  
*Staphylococcus*, 14  
*Streptococcus*, 14  
 Suberificação, 36  
 Substâncias orgânicas, 47  
 taninos, 47  
 Tecido conjuntivo, 40  
 Tecido epitelial, 40  
 Tecido muscular, 42  
 Tecido nervoso, 42  
 tecidos animais, 39  
 telófase, 58  
 Telófase, 60  
 Telófase I, 63  
 Telófase II, 64  
 tétrada cromatídica, 63  
 tilacoides, 53  
 tilacoides do estroma, 53  
 tilacoides dos grana, 53  
 tonoplasto, 46  
 transporte ativo, 44  
 transporte passivo, 43  
 Vacúolos, 46  
 vacuoma, 46  
 verde iodo, 32  
 vermelho neutro, 45  
 Vermelho Sudão III, 35  
 xantofilas, 55  
 Zigóteno, 61