

PRÁTICA Nº. 4.5

ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DE BIOMEMBRANAS
PELA AÇÃO DE SOLVENTES ORGÂNICOS

INTRODUÇÃO

Aumentos intensos na permeabilidade das biomembranas, causados pela sua desorganização parcial ou completa, podem ajudar a demonstrar a importância da integridade estrutural para a manutenção da permeabilidade seletiva. Solventes orgânicos, como o éter e o clorofórmio, capazes de penetrar rapidamente na fase lipídica (apolar) das biomembranas, podem ser utilizados para provocar a desorganização estrutural. Com a ação desses solventes, que atuam dissolvendo e retirando os lipídios das membranas, os pigmentos hidrossolúveis contidos no vacúolo (betacianinas ou antocianinas) se dispersam no meio, deixando a célula vegetal com tonalidade pálida e a solução que a envolve ligeiramente colorida. Com a perda da integridade das membranas, os pigmentos hidrossolúveis que se encontravam contidos no interior dos vacúolos se dispersam livremente no meio.

OBJETIVOS

Observar a resposta das biomembranas à ação de solventes orgânicos. Relacionar os resultados da aula à perda da permeabilidade seletiva das biomembranas.

MATERIAIS

- Plantas de abacaxi-roxo (*Tradescantia spathacea* Sw., Commelinaceae), Zebrina (*Tradescantia zebrina* Heynh., Commelinaceae) ou outra espécie disponível



- Vidro de relógio



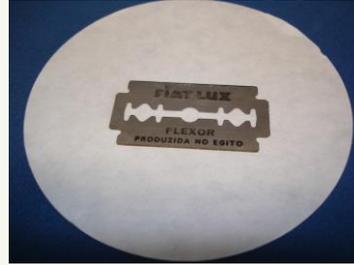
- Lâminas, lamínulas, pipetas de Pasteur



- Microscópio óptico



- Lâmina de barbear, papel-filtro



- Banho-maria



- Pincel



- Éter etílico ($C_2H_5-O-C_2H_5$) e clorofórmio ($CHCl_3$)



- Raízes de beterraba



- Pinça



- Tubos de ensaio (12,5 x 1,5 cm)



- Filme de PVC



PROCEDIMENTOS

a) Observação microscópica do aumento da permeabilidade das membranas:

Com uma lâmina de barbear, retire alguns segmentos da epiderme abaxial (inferior) de folhas de abacaxi-roxo ou de zebrina. Como, ao fazer os cortes paradérmicos, algumas células se rompem e perdem os pigmentos, deixe-os em um recipiente com água, por aproximadamente cinco minutos. Por apresentarem células muito longas, os cortes não devem ser realizados sobre a nervura central da folha.

Para obter cortes finos e de fácil visualização sob microscopia óptica, posicione a lâmina paralelamente à epiderme inferior da folha. Obtenha pelo menos quatro cortes bem visíveis para cada tratamento (com éter ou clorofórmio) e deixe mais dois cortes em água como controle. Retire dois a três segmentos das epidermes mantidos em água e monte-os em lâmina e lamínula com água destilada. Observe ao microscópio óptico as células da epiderme, que se apresentam com coloração rósea forte.

Ainda observando o material ao microscópio, encoste uma tira de papel-filtro próximo à lamínula para que a água contida na montagem da lâmina seja absorvida pelo papel. Simultaneamente, no lado oposto em que a água está sendo retirada, adicione gotas de éter, utilizando uma pipeta. Repita esse processo até que toda a água contida seja substituída pelo éter. Deixe o corte sob essa condição por, pelo menos, 20 minutos. Como o éter é muito volátil e ficará sob o calor intenso da fonte de luz do microscópio, reponha-o constantemente entre a lâmina e a lamínula. Em outro corte, substitua a água por clorofórmio. Também, devido à rápida evaporação do clorofórmio, tome o cuidado de repor frequentemente esse solvente entre a lâmina e a lamínula.

Observe que as células tornam-se cada vez mais pálidas e com coloração mais fraca. O tempo para o início da saída do pigmento das células depende da espessura do corte da epiderme da folha. Quanto mais fino for o corte, mais rapidamente o resultado será observado.

Compare a coloração das epidermes que sofreram a ação do éter e do clorofórmio com a coloração das epidermes que permaneceram em água.

b) Observação do aumento da permeabilidade das membranas pela liberação de betacianina em raízes de beterraba:

Obtenha um tubérculo de beterraba de tamanho grande. A três tubos de ensaio adicione, respectivamente, 8 a 10 gotas de água, 8 a 10 gotas de clorofórmio e 8 a 10 gotas de éter, rotulando-os com os solventes utilizados. Corte três tiras da raiz da beterraba com aproximadamente 2,0 mm de espessura, 1,0 cm de largura e 3,0 cm de comprimento. A largura das tiras deverá ser ligeiramente maior do que o diâmetro do tubo de ensaio a ser usado. Lave cada uma das tiras em água corrente e enxugue cuidadosamente com papel higiênico.

Introduza as fatias de beterraba na parte superior de cada tubo imediatamente após adicionar as gotas dos solventes. Evite que as fatias toquem o fundo dos tubos e entrem em contato com os solventes, pois apenas os vapores dos solventes deverão atuar nas superfícies dos cortes do material vegetal. Feche imediatamente a boca dos tubos de ensaio com filme plástico de PVC para que não ocorra perda por evaporação do éter e do clorofórmio. Mantenha os cortes de beterraba nos tubos de ensaio sob essa condição por dez minutos.

Com o auxílio de uma pinça, transfira as fatias de beterraba que estavam sob o efeito dos vapores de éter, clorofórmio e água para outros três tubos de ensaio previamente identificados com os respectivos solventes. Pipete água destilada em volume idêntico e suficiente para que cada fatia de beterraba fique totalmente submersa. Deixe sob essa condição durante dez minutos. Após esse período, retire as fatias de beterraba e homogenize os líquidos no interior dos tubos. Mantenha os tubos próximos e observe a intensidade da cor da água em cada tubo de ensaio contra um fundo branco. Alternativamente, a absorvância das amostras pode ser lida com o auxílio de um espectrofotômetro a 425 nm, na faixa correspondente à cor verde.