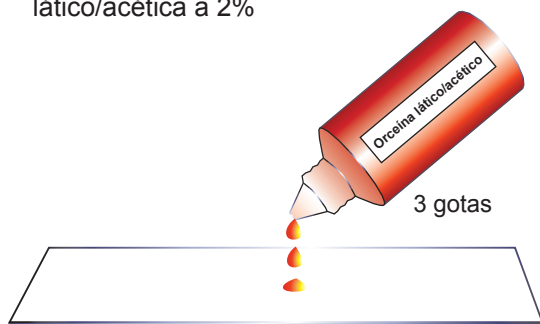
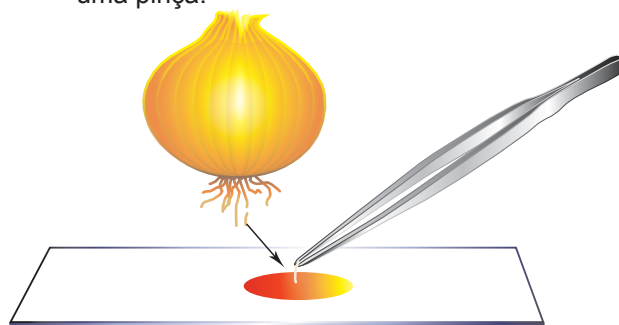


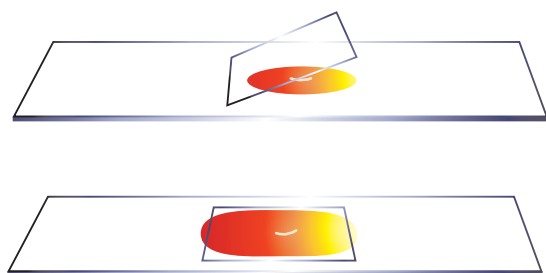
- 1** Colocar uma lâmina limpa sobre a bancada e pingar, sobre ela, 3 gotas de orceína lático/acética a 2%



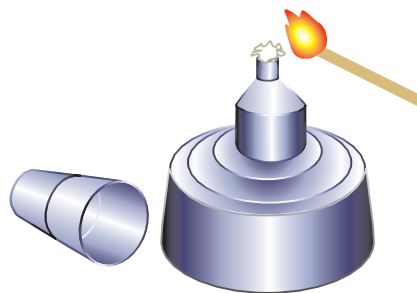
- 2** Colocar uma ponta de raiz de cebola na orceína lático/acética, com o auxílio de uma pinça.



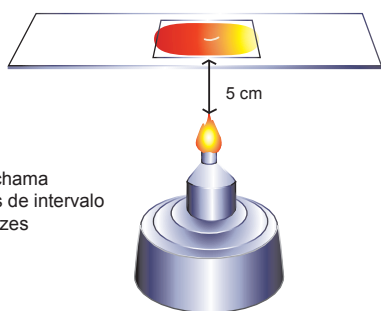
- 3** Cobrir com a lamínula



- 4** Retirar a tampa da lamparina de álcool e acender o pavio com um fósforo.

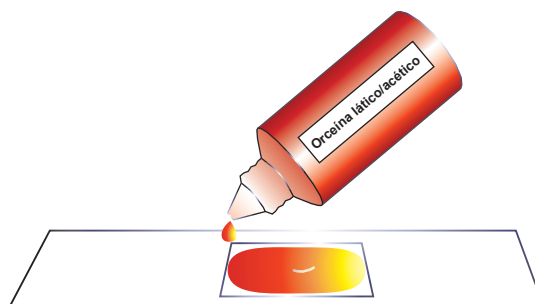


- 5** Segurar a lâmina sobre a chama, a cerca de 5 cm de distância, por cerca de 3 segundos. Repetir esse procedimento por 3 vezes com intervalos de 3 segundos.

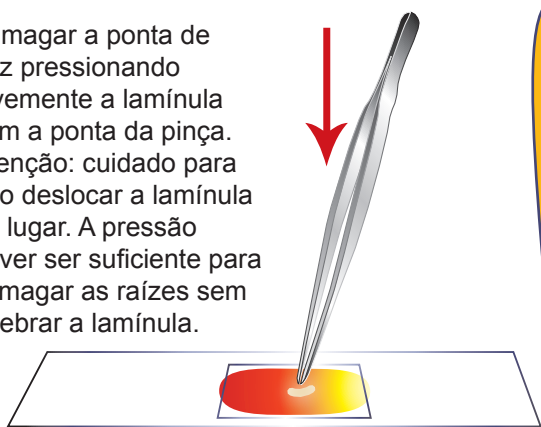


3 segs na chama
3 segundos de intervalo
repetir 3 vezes

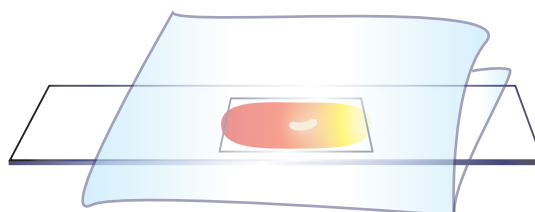
- 6** Se houver necessidade acrescentar mais uma gota de orceína na borda da lamínula.



- 7** Esmagar a ponta de raiz pressionando levemente a lamínula com a ponta da pinça. Atenção: cuidado para não deslocar a lamínula do lugar. A pressão deve ser suficiente para esmagar as raízes sem quebrar a lamínula.



- 8** Retirar o excesso de orceína lático/acética colocando a lâmina entre um pedaço de papel filtro dobrado e passando o dedo sobre ele.



Se você é professor e deseja aplicar esse protocolo em sala de aula siga as seguintes etapas preparatórias:

1. Obtenção das raízes de cebola:

Antes da aula: (mínimo de três dias)

1. Retirar as raízes velhas da parte inferior do bulbo de uma cebola com uma lâmina de barbear.
2. Colocar a cebola sobre um recipiente com água, de maneira que apenas a parte inferior do bulbo toque a água (Fig. 1).
3. Após cerca de 24 horas as raízes iniciam o seu desenvolvimento. Quando as raízes tiverem entre 0,5 cm e 1 cm, secionar a extremidade (cerca de 2 mm) com o auxílio de uma lâmina de barbear ou de pinça de ponta fina (Fig 2).

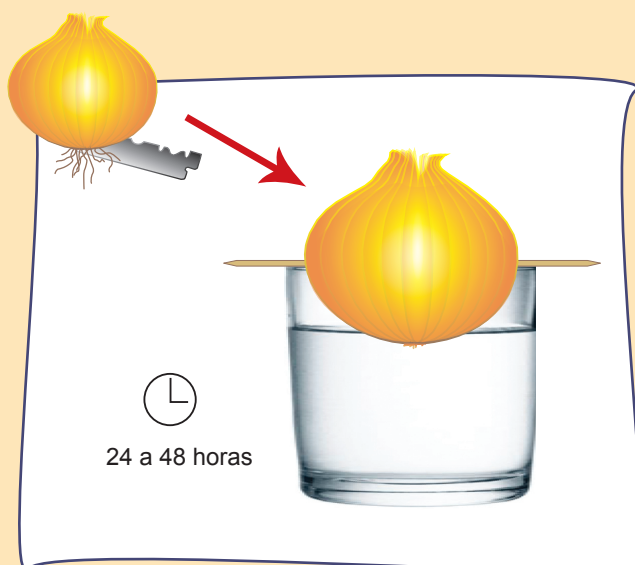


Fig 1. Bulbo cortado imerso na água

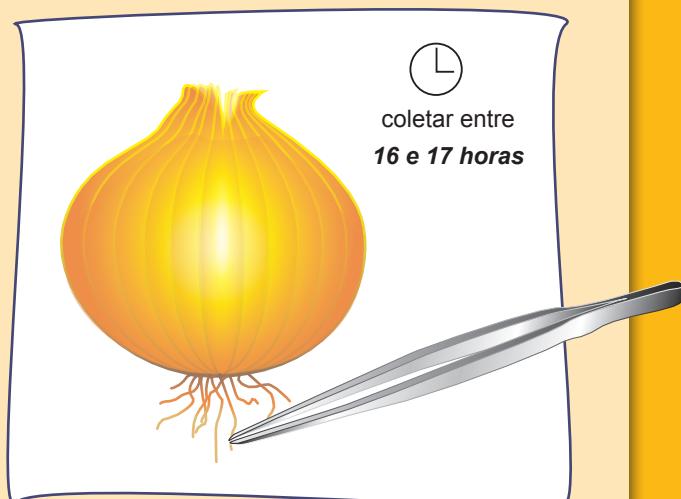


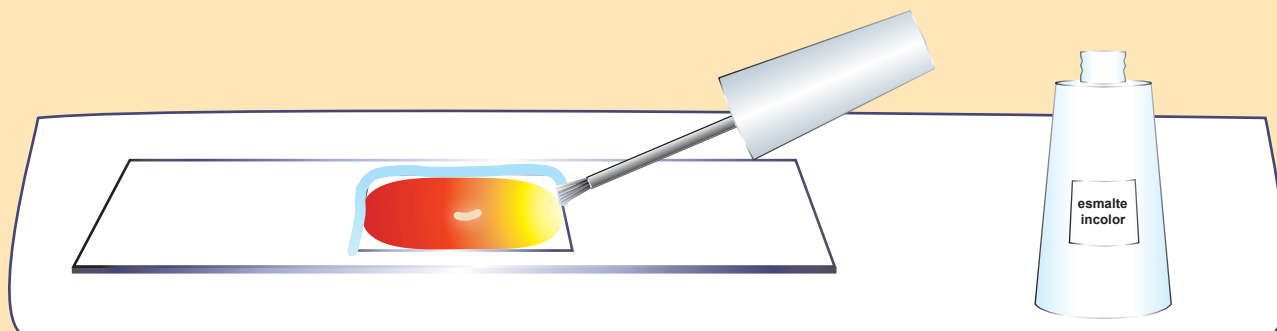
Fig 2. Raiz sendo seccionada com uma pinça.

ATENÇÃO!

Existe uma **onda sincronizada de divisão** ao redor das **16-17 horas**. Raízes coletadas fora desse horário mostram um número extremamente reduzido de células em divisão. Assim sendo, é altamente recomendável que a coleta das extremidades das raízes seja feita nesse horário.

Para não confundir as raízes que tiveram sua coifa (extremidade) retirada, recomenda-se a remoção completa da raiz cuja extremidade já foi utilizada.

É aconselhável ter algumas **lâminas prontas com todas as fases do ciclo da mitose** para observação durante a aula. A preparação citológica pode ser mantida por vários dias selando-se com esmalte de unha a junção da lâmina com a lamínula, como indicado abaixo.



2. Fixação das raízes para armazenamento e observação posterior

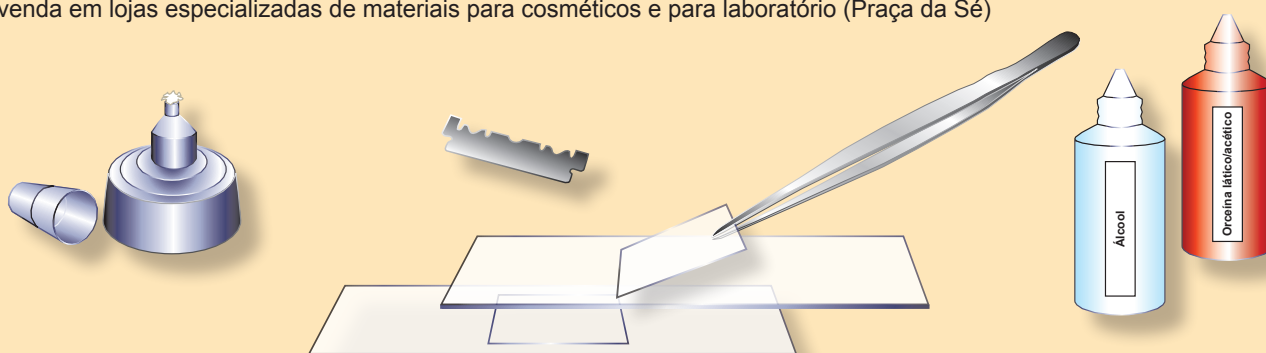
- Imediatamente após a retirada das extremidades das raízes mergulhá-las no fixador Carnoy*. O material deve permanecer no fixador por um período de 12 a 24 horas. (*Carnoy: Misturar em **um bequer** três partes de etanol 95% e uma parte de ácido acético glacial).
- A seguir, as pontas de raiz são transferidas para uma solução de álcool 70% e conservadas em geladeira.
- **Preparar Orceína lático/acética a 2% (corante/fixador)**
 - Misturar em um erlenmeyer de 250ml, 45 ml de ácido lático e 55 ml de ácido acético glacial. Aquecer a 50°C em placa ou em banho-maria.
 - Adicionar 2g de orceína em 100 ml da mistura acima sob agitação (Becker com peixinho sobre um agitador magnético a 50°C).
 - Deixar sob agitação contínua durante aproximadamente 12 horas. Manter a solução tampada com papel alumínio para evitar evaporação.
 - Filtrar a solução em filtro de papel
 - Armazenar em frasco de vidro escuro ou embrulhado em papel alumínio para evitar o contato com a luz.

3. Material suficiente para uma classe com 8 grupos de 5 estudantes.

- 8 frascos com lâminas de vidro para microscopia
- 8 frascos para o descarte das lâminas de vidro usadas
- 8 placas de Petri com lamínulas
- 8 lamparinas a álcool
- 8 pinças de ponta fina
- 8 rolos de papel higiênico fino e macio
- 8 frascos conta-gotas contendo orceína-lático-acética 2%
- 8 frascos conta-gotas contendo álcool 70%
- 8 pacotes de papel de filtro cortado em tiras de aproximadamente 7 x 25 cm.
- 1 vasilha plástica com tampa
- 1 vidro de esmalte incolor para unha
- 8 metades de lâmina de barbear
- 8 pedaços de papel ($\pm 60 \times 40$ cm) para cobrir a bancada
- 8 microscópios
- 1 frasco de vidro (20ml) com tampa de plástico contendo 10 ml do fixador Carnoy
- 8 conjuntos de protocolos para os grupos de alunos.

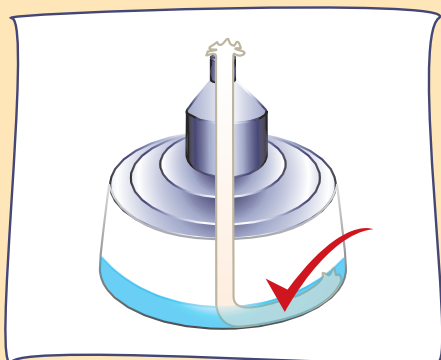


Observação: Qualquer tipo de frasco pode ser utilizado para conter as lâminas e lamínulas, como copinhos de iogurte, vidros de geléia, etc. Existem frasco apropriados, padronizados e baratos a venda em lojas especializadas de materiais para cosméticos e para laboratório (Praça da Sé)

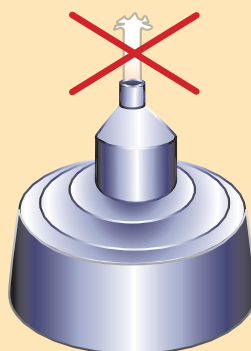
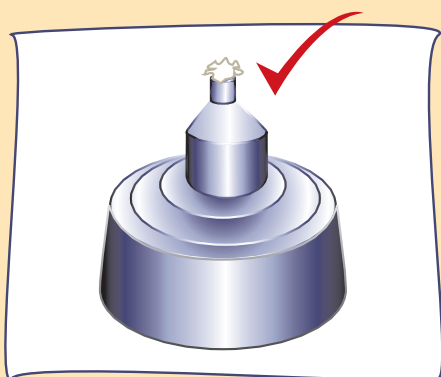


4. Uso das lamparinas em sala de aula

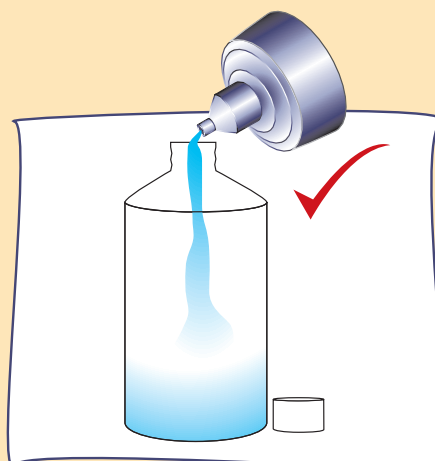
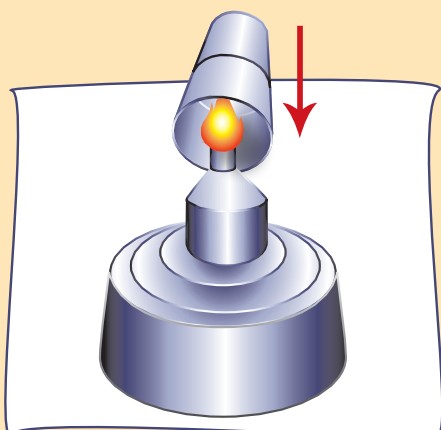
- As lamparinas têm uma base bem estável, portanto dificilmente tombarão sobre a bancada.
- As lamparinas devem ser transportadas secas. Assim sendo, o professor deverá colocar álcool em seu interior, apenas o suficiente para que a extremidade inferior do pavio toque o líquido. Não encha completamente a lamparina com álcool!



- O álcool pode permanecer dentro da lamparina de um dia para outro, até o final do uso.
- O pavio deve estar curto para que a chama formada não seja grande.



- Imediatamente após o aquecimento das lâminas, a chama da lamparinas deve ser apagada colocando, por cima dela a tampa. Desse modo, o risco de acidentes é minimizado. Terminadas todas as aulas, as lamparinas devem ser esvaziadas, ou seja, o álcool remanescente deve ser coletado em recipiente apropriado.



Sugestão de questões para serem respondidas por grupos de estudantes após a realização da preparação citológica e da observação das células em divisão mitótica.

1. Qual a função daorceína láctico/acética?
2. Qual o papel do aquecimento da preparação (lâmina +orceína láctico-acética + ponta de raiz)?
3. Descrever as características morfológicas que identificam cada uma das fases da mitose.
4. Na preparação, quais as fases do ciclo celular observadas com maior frequência? Apresentar uma hipótese que explique a sua observação.
5. É possível contar o número de cromossomos da cebola? Se sim, quantos são?

Respostas para as questões:

1. Aorceína láctico/acética funciona como fixador (ácido acético + ácido láctico) e como corante (orceína).
2. O aquecimento apressa a coloração e, principalmente, distende os cromossomos facilitando sua visualização.
3. A mitose tem quatro fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Lembre-se que os cromossomos se duplicam na interfase, assim sendo, na primeira fase da divisão os cromossomos já estão duplicados.
 - Prófase: os cromossomos se condensam passando da forma difusa observada na interfase para estruturas altamente empacotadas características da célula em divisão. Em microscopia óptica não é possível definir com precisão a transição de interfase para prófase. Considera-se que a célula está em prófase quando os cromossomos se condensaram a ponto de se tornarem visíveis em microscopia óptica. As cromátides irmãs estão unidas pelo centrômero (que também estão duplicados).
 - Metáfase: os cromossomos apresentam condensação máxima e estão alinhados na parte central da célula formando a placa metafásica.
 - Anáfase: é a fase mais curta da mitose, durante apenas alguns minutos. Ela se caracteriza pelo movimento das duas cromátides irmãs para pólos opostos da célula. Todas as cromátides começam a se separar ao mesmo tempo numa velocidade de 1 $\mu\text{m}/\text{mim}$. Uma vez separadas, as cromátides irmãs passam a ser referidas como cromossomos filhos. Nessa fase é possível verificar a posição do centrômero em cada cromossomo (acrocêntrico, metacêntrico ou sub-metacêntrico).
 - Telófase: cromossomos filhos chegaram aos pólos e começam a se descondensar.
4. A interfase é a fase do ciclo celular mais freqüente, pois nem todas as células estão em divisão ao mesmo tempo. A fase mais rara é a anáfase, por ser muito rápida.
5. $2n=16$, mas a contagem não é simples.

I. Sugestões de atividades complementares

1. Representação das fases da divisão celular com massa de modelar.
2. Montagem de um cariótipo (a atividade de montagem de cariótipo humano pode ser encontrada em – Temas de Biologia. Ed. Moderna).
<http://www.moderna.com.br/moderna/didaticos/em/biologia/temasbio/atividades/TB04.pdf>
3. Rever a definição de cromátide e cromossomo. Rever a organização de um cromossomo. Chamar a atenção para o fato dos centrômeros estarem também duplicados durante a divisão (a representação de um único centrômero na prófase e metáfase é um erro muito freqüente em livros de ensino médio).
4. Chamar a atenção para o fato da divisão ser um processo contínuo e como tal deve ser entendido (não como fases estanques e sem conexão). Ênfase no processo, mais do que nos nomes.
5. Boa oportunidade para comparar esquemas de livros com as imagens observadas em microscopia óptica e, assim sendo, comentar técnicas de coloração e análise de células.