



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 13 • 2024 • art. 2

Integridade membranar: a resposta da membrana plasmática ao stress térmico e aos solventes orgânicos em células de beterraba

A membrana plasmática é uma estrutura fluída, constituída por lípidos e proteínas, e delimita a célula de todos os organismos vivos. Tem uma função primordial de barreira seletiva, regulando a troca de substâncias entre a célula e o seu ambiente. A membrana é uma estrutura frágil, sendo íntegra apenas em meio aquoso e em determinada gama de temperatura. Neste artigo apresenta-se um protocolo simples que permite explorar a estrutura e a função da membrana plasmática, examinando a sua sensibilidade às variações de temperatura e o impacto dos solventes orgânicos. Utilizando células da raiz de beterraba (*Beta vulgaris*) como modelo, e focando especificamente o pigmento betalaína, foi induzido o stress térmico e químico para avaliar a rutura da membrana. O estudo procurou aprofundar a compreensão dos estudantes sobre a integridade da membrana e as suas implicações para sistemas biológicos mais alargados.

Palavras-chave

membrana plasmática

betalaína

stress térmico

solventes orgânicos

integridade da membrana

Teresa Mougat^{*}

¹ MARE — Centro de Ciências do Mar e do Ambiente / ARNET - Rede de Investigação Aquática; Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal.

^{*} mougat@ipleiria.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores

INTRODUÇÃO

A membrana plasmática, uma estrutura dinâmica crucial para a homeostase celular, desempenha um papel fundamental no controlo do transporte transmembranar, acomoda numerosas proteínas recetoras e organiza os processos metabólicos. É composta por uma bicamada lipídica formada por fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos e colesterol. As membranas também fornecem o meio ambiente no qual as proteínas integrais da membrana se localizam, estão especificamente orientadas e são montadas de forma específica. Associadas estão, ainda, proteínas periféricas integrando um mosaico fluido, conforme o modelo proposto por Nicolson e Singer em 1972 (Simon, 1974) (Figura 1).

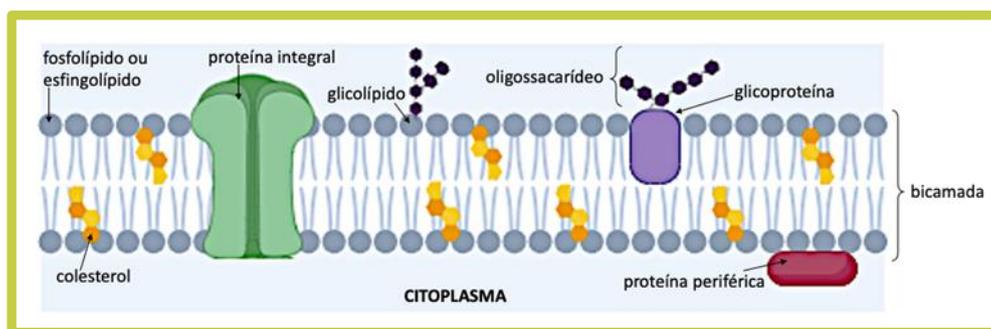


FIGURA 1: Esquema representativo da membrana plasmática da célula animal, segundo o modelo de mosaico fluido de Nicolson e Singer.

Este modelo descreve a natureza dinâmica da membrana, enfatizando o movimento das proteínas dentro da matriz lipídica. Os lípidos da membrana caracterizam-se por ser moléculas anfipáticas, isto é, exibem uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A natureza anfipática é fundamental para a estrutura das membranas biológicas. Quando uma suspensão de fosfolípidos é mecanicamente dispersa numa solução aquosa, os fosfolípidos agregam-se numa de três estruturas: micelas esféricas, lipossomas ou bicamadas. A bicamada característica da membrana plasmática das células é uma estrutura fluida, fruto das ligações intermoleculares hidrofóbicas que se formam entre as porções apolares. A bicamada é, então, estabilizada através das interações eletrostáticas e pontes de hidrogénio que se formam entre as porções polares e a água. A fluidez da membrana depende da temperatura, do comprimento das cadeias de acilo hidrofóbicas e do seu grau de saturação, isto é, do número de ligações duplas C=C (Alberts, 2014; Alberts et al., 2014; Lodish et al., 2016; Urry et al., 2021). A membrana plasmática é seletivamente permeável, permitindo a comunicação com o ambiente circundante.

Sensibilidade da membrana plasmática às condições físicas e químicas

A sensibilidade da membrana plasmática à temperatura, às variações de pH e aos solventes orgânicos é fundamental para o seu bom funcionamento. A indução de stress químico ou físico pode causar a disrupção da membrana. Por exemplo, alterações de pH causam quebra de ligações químicas das proteínas, designadamente interações eletrostáticas, existentes na estrutura terciária e quaternária, o que altera a conformação das proteínas, determinando, portanto, a sua desnaturação. A desnaturação, por seu lado, origina, sempre, um aumento de permeabilidade da membrana.

Por seu lado, temperaturas extremas, quer muito elevadas quer muito baixas, induzem stress nas membranas biológicas, podendo originar a sua disrupção. Com o aumento da temperatura, a energia cinética das moléculas aumenta, assim como as colisões entre as moléculas, determinando também uma

dilatação dos espaços livres entre elas, incrementando, portanto, a permeabilidade. Por outro lado, a quebra de ligações por pontes de hidrogénio das proteínas aumenta o tamanho dos poros proteicos, aumentando também a permeabilidade. Eventualmente, a temperatura origina a destruição da estrutura da membrana (Vodopich & Moore, 2023).

Quando a temperatura desce abaixo dos 37 °C, os lípidos podem sofrer uma transição de fase de um estado líquido (fluido) para um estado gelatinoso (semi-sólido), análogo à transição líquido-sólido quando a água líquida congela. A estas temperaturas a taxa de difusão dos lípidos diminui drasticamente (Lodish et al., 2016). As membranas são, de facto, sensíveis também ao arrefecimento, tornando-se permeáveis quando expostos a temperaturas entre 0 e 10°C, aumentando a saída de solutos do interior para o exterior da célula. Esta fuga, induzida pelo frio, é atribuída à mudança de fase em todos os fosfolípidos da membrana (Simon, 1974). Se a temperatura continuar a baixar, o congelamento causa a cristalização das moléculas de água em gelo cristalino, o que origina a expansão das moléculas na estrutura cristalina, devido ao alinhamento das pontes de hidrogénio. Esta expansão origina a quebra das pontes de hidrogénio entre os lípidos e as moléculas de água circundantes, o que contribui para a rutura da membrana (Vodopich & Moore, 2023). Mesmo quando a variação da temperatura não causa a perda de integridade física da membrana, a sua modificação causa alterações na capacidade de efetuar a difusão simples, uma vez que a temperatura influencia a proximidade entre os fosfolípidos e, portanto, a fluidez da membrana.

As bicamadas formam-se em meio aquoso e a estabilidade destas bicamadas depende da presença da água para a formação das interações hidrofóbicas. Os lípidos membranares são, como vimos, anfipáticos. Esta característica determina a sua solubilidade em solventes orgânicos. Os solventes orgânicos polares (metanol, etanol, acetona) e apolares (hexano, clorofórmio) podem dissolver os lípidos e, portanto, causam a disrupção da membrana plasmática e a lise celular. Os solventes polares interagem com a porção polar dos fosfolípidos, substituindo as pontes de hidrogénio que estes formavam com a água. A porção apolar dos solventes orgânicos (cadeias de acilo) tem afinidade pela porção apolar dos fosfolípidos. A interação dos solventes orgânicos com as membranas induz efeitos vários, tais como alterações nas propriedades mecânicas de permeabilidade e difusão (Patra et al., 2006).

Os álcoois de cadeia curta, como o etanol, têm um forte efeito nas propriedades das membranas e o efeito depende tanto do comprimento da parte hidrofóbica do álcool como da concentração. As moléculas de etanol, sendo anfipáticas têm afinidade pela porção polar dos lípidos membranares, mas também pela porção apolar, conseguindo penetrar a bicamada. Assim, o etanol tem tendência para se localizar no interior da bicamada, e não diretamente na interface água-membrana. O etanol estabelece pontes de hidrogénio com a porção polar dos lípidos membranares; a porção apolar do etanol liga-se à porção apolar dos lípidos, determinando um aumento da desordem das cadeias acilo (Patra et al., 2006). O etanol também pode levar à formação de fases interdigitadas, quando as cadeias de acilo de um folheto da bicamada interpenetram o outro folheto, diminuindo a espessura da bicamada e resultando no desaparecimento do plano médio da bicamada (Vierl et al., 1994).

A acetona é também um solvente orgânico polar, mas exhibe muito menor polaridade do que o etanol pelo facto de compreender um grupo carbonilo no centro da molécula, enquanto o etanol exhibe um grupo hidroxilo na extremidade da molécula. Os fosfolípidos da membrana toleram a presença de acetona em baixas concentrações. O aumento da concentração resulta, no entanto, na desordem do empacotamento dos fosfolípidos e no aumento da fluidez da membrana. A porção polar das moléculas de acetona interage

com a porção polar das cabeças dos lípidos, afastando-as. Além disso, a região da cauda acilo dos lípidos da membrana também se torna menos densa. O mecanismo molecular da ação da acetona na bicamada fosfolipídica tem muitas características comuns com os efeitos do etanol (e de outros álcoois de cadeia curta) (Posokhov & Kyrychenko, 2013), sendo, porém, menos pronunciado.

Finalmente, a dissolução dos solventes orgânicos na bicamada lipídica irá interagir com as proteínas transmembranares e fazer com que estas alterem a sua conformação. A alteração da forma de uma proteína transmembranar irá alterar o seu funcionamento. Assim, não só ocorre o aumento da fluidez membranar como se altera a forma como a membrana interage com as proteínas, perturbando o seu funcionamento.

As células de beterraba (*Beta vulgaris*) como modelo experimental

O tecido da raiz da beterraba (*Beta vulgaris*) pode ser usado como modelo para investigar a integridade da membrana plasmática. Contém grandes quantidades de um pigmento designado betalaína, de cor rosa-forte, também designada por vermelho de beterraba. Este pigmento é um glucósido solúvel e hidrolisa-se em glucose e betanidina. As betalaínas são pigmentos alcalóides que se encontram em algumas famílias de plantas pertencentes à ordem Caryophyllales, mas em nenhuma outra planta. Do ponto de vista alimentar, são interessantes uma vez que são fortes antioxidantes (Singh et al., 2017) .

Nas células saudáveis, o pigmento encontra-se dissolvido no interior do vacúolo da célula, que é grande e está rodeado pelo tonoplasto, uma membrana de natureza lipídica e proteica, enquanto toda a célula está rodeada pela membrana plasmática. A indução de stress nas duas membranas determina o derrame de pigmento para fora das células, observando-se a presença de cor no líquido circundante. Assim, é possível monitorizar o stress físico e/ou químico através da alteração de cor induzida neste líquido.

Este trabalho visou criar um protocolo experimental simples para o estudo da integridade da membrana plasmática para estudantes do ensino secundário ou ensino superior. O protocolo centra-se na avaliação do stress térmico, explorando os efeitos de temperaturas extremas na integridade da membrana, utilizando células de beterraba como bioindicador. Além disso, investiga-se o impacto de diferentes solventes em diversas concentrações sobre a membrana, procurando compreender a sua influência na solubilidade dos lípidos e na desnaturação das proteínas. O impacto das condições físicas e químicas é monitorizado pela libertação de betalaína, utilizada como indicador de rutura da membrana. Assim é possível correlacionar os efeitos observados com a temperatura e os solventes.

METODOLOGIA

O trabalho prático foi desenvolvido no âmbito das aulas práticas da Unidade Curricular de Biologia Celular, do curso de licenciatura em Biologia Marinha (Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Politécnico de Leiria). Cada uma das três turmas práticas, de cerca de 12 estudantes, foi dividida em 3 grupos, permitindo fazer um triplicado (n=3).

Os dois protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com o trabalho de Vodopich & Moore (2023), com as necessárias adaptações.

Efeito de stress térmico sobre a membrana plasmática

Materiais

3 Placas de aquecimento com agitação (ARE, Velp, Itália)

Frigorífico combinado (RB34C672DWW, Samsung, Portugal)

Vórtex (ZX3, Velp, Itália)

Gobelé de 100 mL com água destilada

Gobelé de plástico de 500 mL

6 Tubos de ensaio

Suporte de tubos de ensaio

3 Termómetros

Tábua e faca

Régua

Pinça

Pipeta de 10 mL e pera (ou pipeta de Pasteur)

Raiz de beterraba (*Beta vulgaris*)

Métodos

Com uma faca cortaram-se 6 paralelepípedos de raiz de beterraba, com cerca de 0,5 cm de lado x 3 cm de comprimento, todos do mesmo tamanho, usando porções de raiz de cor intensa e uniforme (Figura 2).

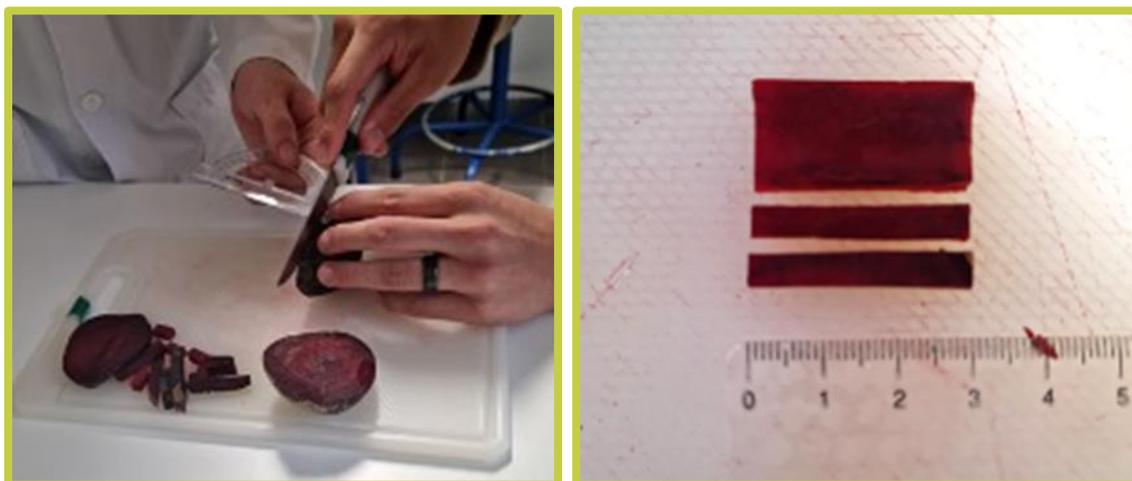


FIGURA 2: À esquerda, corte da beterraba; à direita, detalhe dos paralelepípedos.

Colocaram-se os paralelepípedos num gobelé de plástico de 500 mL com cerca de 200 mL de água destilada, e agitou-se manual e vigorosamente, durante cerca de 15 segundos, para remover o pigmento libertado pelas células danificadas pelo corte. Repetiu-se esta operação até os paralelepípedos não libertarem mais pigmento.

Numeraram-se 6 tubos de ensaio de 1 a 6 e escreveu-se a temperatura, conforme indicado¹: Tubo 1: 80°C; Tubo 2: 60°C; Tubo 3: 40°C; Tubo 4: 20°C; Tubo 5: 5°C; Tubo 6: -20°C. Em cada tubo de ensaio colocou-se, com uma pinça, um paralelepípedo de beterraba.

Nos tubos de ensaio 1, 2, 3 e 4 os paralelepípedos foram submetidos ao tratamento quente, tendo sido adicionados 10 mL de água destilada. O tubo de ensaio n.º 1 foi colocado no gobelé com água previamente aquecida a $80\pm 2^\circ\text{C}$, numa placa de aquecimento com agitação (Figura 3). O tubo de ensaio n.º 2 foi colocado no gobelé com água previamente aquecida a $60\pm 2^\circ\text{C}$, numa outra placa de aquecimento. O tubo de ensaio n.º 3 foi colocado no gobelé com água previamente aquecida a $40\pm 2^\circ\text{C}$, numa terceira placa de aquecimento. Em cada um dos gobelets foi colocado um termómetro para controlo da temperatura.

O tubo de ensaio n.º 4 foi deixado à temperatura ambiente (cerca de 20°C). Os 4 tubos foram deixados em repouso durante 20 minutos. Ao fim deste tempo foram colocados num suporte de tubos de ensaio.

Nos tubos de ensaio 5 e 6, os paralelepípedos foram submetidos ao tratamento a frio. O tubo n.º $5\pm 1^\circ\text{C}$ foi colocado no frigorífico (a cerca de 5°C). O tubo n.º 6 foi colocado no congelador (a cerca de $-20\pm 1^\circ\text{C}$). Os dois tubos foram deixados em repouso durante 30 minutos. Ao fim deste tempo, foram adicionados 10 mL de água destilada a cada tubo de ensaio, à temperatura ambiente e aguardaram-se 20 minutos.

No final os tubos de ensaio foram agitados no vórtex, até atingirem uma cor uniforme. A intensidade de cor pode ser avaliada por espectrofotometria (a 460 nm). Uma vez que o laboratório utilizado não dispõe de espectrofotómetro, a intensidade de cor relativa foi quantificada numa escala entre o zero (ausência de cor) e o 10 (vermelho), conforme a Figura 4, e registada em tabela.

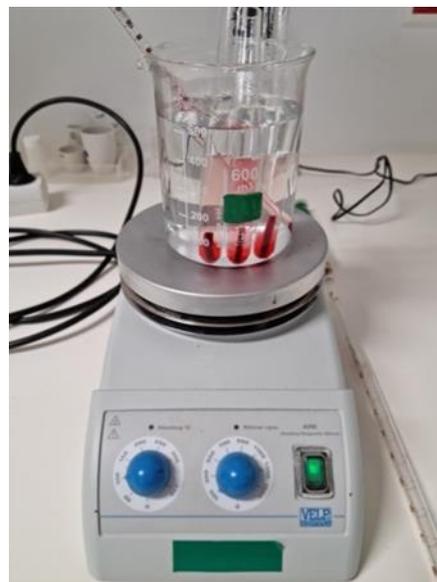


FIGURA 3: Placas de aquecimento com gobelés com água a 80°C. No interior do gobelés foram colocados os tubos de ensaio contendo o paralelepípedo de raiz de beterraba, durante 20 minutos.

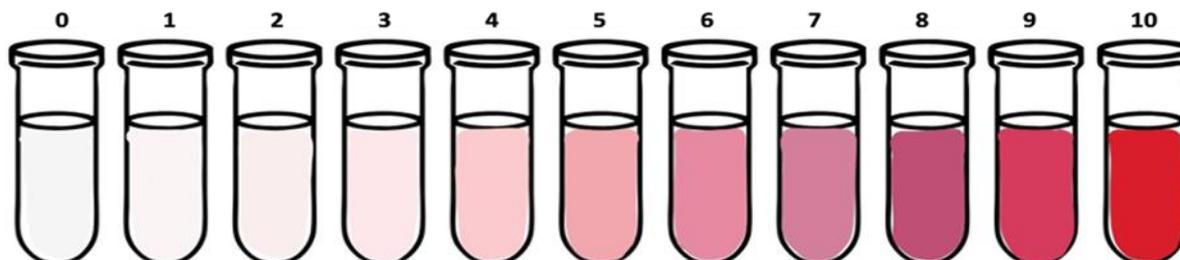


FIGURA 4: Escala de intensidade de cor relativa da betalaína.

¹ As temperaturas (máxima e mínima) foram ajustadas em relação ao protocolo original, para permitir a rutura completa da membrana plasmática e o derrame de grande quantidade de pigmento.

Efeito dos solventes orgânicos sobre a membrana plasmática

Materiais

Soluções de acetona 1%, 25% e 50%

Soluções de etanol 1%, 25% e 50%²

Vórtex (ZX3, Velp, Itália)

7 Tubos de ensaio

Suporte de tubos de ensaio

6 Pipetas de 10 mL e peras ou pipetas de Pasteur

Gobelé 500mL com água destilada

Tábua e faca

Régua

Pinça

Raiz de beterraba (*Beta vulgaris*)

Métodos

Com uma faca cortaram-se, de novo, 7 paralelepípedos de raiz de beterraba, com cerca de 0,5 cm de lado x 3 cm de comprimento, todos do mesmo tamanho, usando porções de raiz de cor intensa e uniforme (figura 2). Colocaram-se os paralelepípedos num gobelé de plástico de 500 mL com cerca de 200 mL de água destilada, e agitou-se manual e vigorosamente, durante cerca de 15 segundos, para remover o pigmento libertado pelas células danificadas pelo corte. Repetiu-se esta operação até os paralelepípedos não libertarem mais pigmento. Numeraram-se 7 tubos de ensaio de 1 a 7 e escreveu-se o solvente e a concentração, conforme indicado: Tubo 1: 1% acetona; Tubo 2: 25% acetona; Tubo 3: 50% acetona; Tubo 4: 1% etanol; Tubo 5: 25% etanol; Tubo 6: 50% etanol; Tubo 7: água destilada.

Em cada tubo de ensaio colocou-se, com uma pinça, um paralelepípedo de beterraba. Ao tubo n.º 1 foram adicionados 6 mL de uma solução de 1% de acetona. Ao tubo n.º 2 foram adicionados 6 mL de uma solução de 25% de acetona. Ao tubo n.º 3 foram adicionados 6 mL de uma solução de 50% de acetona. Ao tubo n.º 4 foram adicionados 6 mL de uma solução de 1% de etanol. Ao tubo n.º 5 foram adicionados 6 mL de uma solução de 25% de etanol. Ao tubo n.º 6 foram adicionados 6 mL de uma solução de 50% de etanol. Ao tubo n.º 7 foram adicionados 6 mL de água destilada. Aguardaram-se 10 minutos, à temperatura ambiente, agitando os tubos de ensaio, periodicamente, no vórtex até atingir uma cor uniforme.

A intensidade de cor relativa foi quantificada numa escala entre o zero (ausência de cor) e o 10 (vermelho), conforme a Figura 4, e registada em tabela.

² Apesar do protocolo original sugerir o uso de metanol optou-se pelo etanol, dada a menor toxicidade e a maior solubilidade dos lípidos neste solvente.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para o ensaio de temperatura podem ser observados na Figura 5, na qual se observa facilmente a variação de cor relativa. A raiz de beterraba derrama maior quantidade de pigmento a 80°C, tubo onde se regista a cor mais intensa, seguida dos 60°C e dos -20°C.

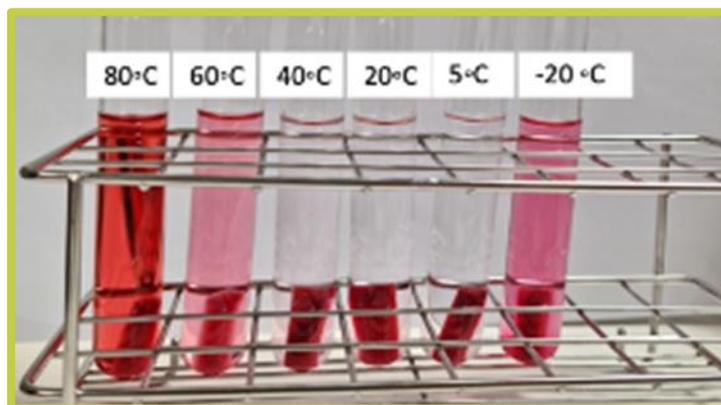


FIGURA 5: Ensaio do stress térmico - cor obtida pelo derrame de betalaína nas células da raiz de beterraba.

Os resultados obtidos nos diferentes grupos de estudantes foram bastante consistentes (Tabela I), registrando-se uma intensidade de cor relativa acima dos 9 para a temperatura de 80°C, entre os 7,33 e os 8,67 para os 60°C, e entre os 6,67 e os 8,00 para os -20°C. De registrar, também, a quase total ausência de pigmentos entre os 20 e os 5°C, observando-se uma cor muito suave (até uma intensidade relativa de 3) a 40°C.

TABELA I: Intensidade de cor relativa, numa escala de zero a dez, obtida pelo derrame de betalaína de células danificadas submetidas a stress térmico. Valores médios e desvio padrão (n=3).

| | Temperatura (°C) | Intensidade de cor | | |
|---------------|------------------|--------------------|-------------|--------------|
| | | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
| Tubo 1 | 80 | 9,33 ± 1,15 | 9,67 ± 0,58 | 10,00 ± 0,00 |
| Tubo 2 | 60 | 8,33 ± 1,15 | 8,67 ± 0,58 | 7,33 ± 0,58 |
| Tubo 3 | 40 | 1,67 ± 0,58 | 3,00 ± 2,00 | 1,33 ± 0,58 |
| Tubo 4 | 20 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,33 ± 0,58 |
| Tubo 5 | 5 | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 0,58 | 0,00 ± 0,00 |
| Tubo 6 | -20 | 6,67 ± 0,58 | 7,00 ± 1,00 | 8,00 ± 1,00 |

Aplicada uma ANOVA unidirecional aos dados, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas à medida que a temperatura baixa, até se atingir os 20°C (temperatura ambiente). Não se registam diferenças entre os 20 e os 5°C, voltando a existir uma diferença estatística entre os 5 e os -20°C (Figura 6).

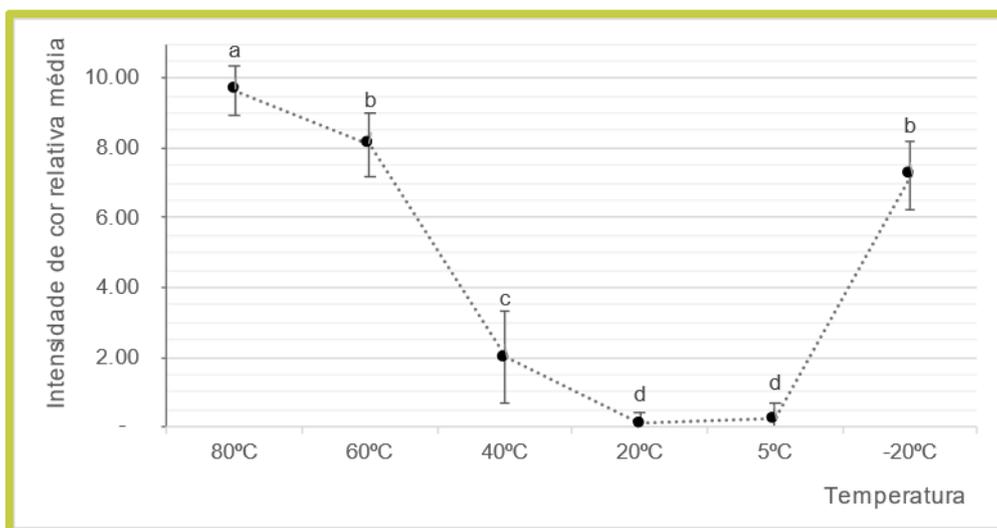


FIGURA 6: Intensidade de cor relativa média, para as diferentes temperaturas testadas (80°C, 60°C, 40°C, 20°C, 5°C e -20°C). Valores relativos à média e desvio padrão de três testes independentes efetuados em triplicado. Letras diferentes representam diferenças significativas entre amostras (ANOVA, $p < 0,05$).

Quanto aos solventes orgânicos, os resultados evidenciam um maior derrame de pigmento nas raízes de beterraba submetidas a etanol do que as que foram submetidas a acetona, sendo os resultados dependentes da concentração de pigmento (Figura 7).

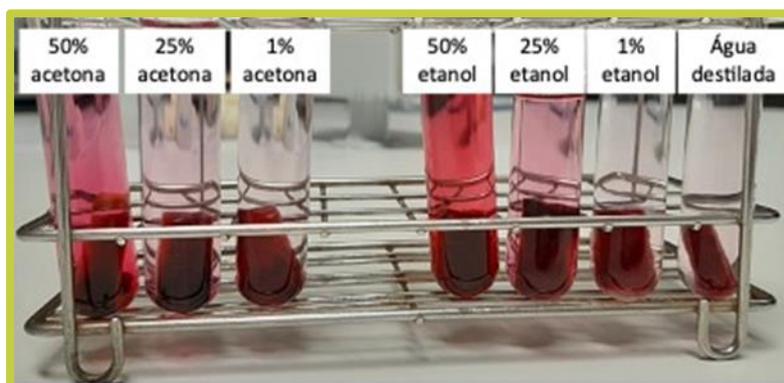


FIGURA 7: Ensaio dos solventes orgânicos - cor obtida pelo derrame de betalaína nas células da raiz de beterraba.

Os resultados dos três grupos encontram-se registados na Tabela II. Os resultados dos três grupos foram, de novo, bastante uniformes. Para as soluções de 1% de solvente não se obteve, praticamente, registo de cor, notando-se, portanto, a presença residual de pigmento na solução. Para a solução de 25% de acetona a intensidade relativa de cor variou entre os 2,33 e os 3 e para a solução de 25% de etanol variou entre os 4 e os 4,67. Já para a solução de 50% de acetona a intensidade de cor foi muito mais intensa, tendo variado entre os 8,33 e os 9,67, enquanto para a solução de 50% de etanol se verificou intensidade máxima de cor, variando entre os 9,67 e os 10.

TABELA II: Intensidade de cor relativa, numa escala de zero a dez, obtida pelo derrame de betalaína de células danificadas submetidas a stress térmico. Valores médios e desvio padrão (n=3).

| | Solvente orgânicos | Intensidade de cor | | |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------|
| | | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
| Tubo 1 | 1% acetona | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 0,58 |
| Tubo 2 | 25% acetona | 3,00 ± 0,00 | 2,33 ± 0,58 | 2,67 ± 0,58 |
| Tubo 3 | 50% acetona | 8,67 ± 0,58 | 8,33 ± 0,58 | 9,67 ± 0,58 |
| Tubo 4 | 1% etanol | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,67 ± 1,15 |
| Tubo 5 | 25% etanol | 4,00 ± 1,00 | 4,67 ± 0,58 | 4,67 ± 2,52 |
| Tubo 6 | 50% etanol | 9,67 ± 0,58 | 10,00 ± 0,00 | 9,67 ± 0,58 |
| Tubo 7 | Água destilada | 0,00 ± 0,00 | 0,33 ± 0,58 | 0,67 ± 0,58 |

Aplicada uma ANOVA unidirecional aos dados, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o controlo negativo (água destilada) e 1% de solvente, tanto a acetona como o etanol, verificando-se, portanto que esta concentração de solvente não interfere com a integridade da membrana. Existem diferenças significativas entre o controlo e a solução de 25% de acetona e entre esta e a solução de 25% de etanol, observando-se a presença de pigmento, em maior concentração na solução de etanol. Existem também diferenças significativas para a solução de 50% de acetona e a solução de 50% de etanol, registando-se, de novo, valores mais elevados para o etanol (Figura 8).

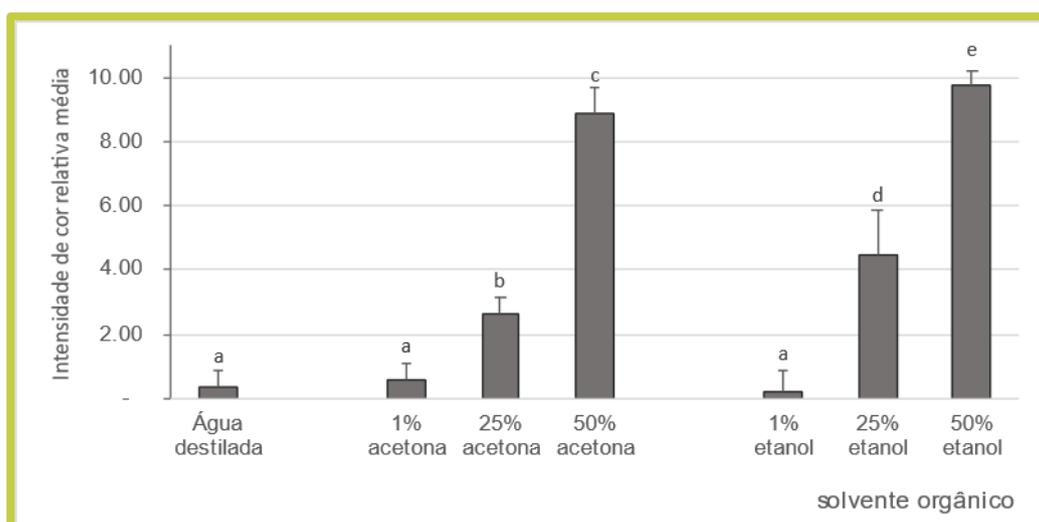


FIGURA 8: Intensidade de cor relativa média, para diferentes solventes (acetona e etanol) em concentrações diversas (1%, 25% e 50%). Valores relativos à média e desvio padrão de três testes independentes efetuados em triplicado. Letras diferentes representam diferenças significativas entre amostras (ANOVA, $p < 0,05$).

DISCUSSÃO



Os resultados obtidos permitem-nos perceber a sensibilidade das membranas biológicas a fatores químicos e físicos, utilizando a raiz de beterraba uma vez que o derrame do pigmento betalaína do interior do vacúolo das células da raiz de beterraba é proporcional aos danos causados na membrana plasmática.

As variações observadas na intensidade da cor, em resposta a diferentes temperaturas, podem ser explicadas pelo impacto da temperatura nos aspetos estruturais e funcionais da membrana plasmática. A temperaturas elevadas (80°C), o movimento molecular e as colisões aumentam, levando potencialmente a uma maior rutura da bicamada lipídica e das estruturas associadas. Por outro lado, a temperaturas extremamente baixas (-20°C), a diminuição do movimento molecular e a potencial formação de cristais de gelo também podem levar à rutura da membrana, induzida pela quebra das pontes de hidrogénio lípido-água. A intensidade de cor observada a 80°C, 60°C e a -20°C sugere que o stress induzido pela temperatura influencia a integridade da membrana, provocando a libertação de pigmento.

A quase ausência de pigmentos entre 20 e 5°C indica uma faixa de temperatura em que a membrana permanece estável. No entanto, a ligeira presença de cor a 40°C sugere um efeito de stress ligeiro na integridade da membrana a partir desta temperatura. Assim, a beterraba, sendo uma espécie de climas temperados, tem uma temperatura ótima abaixo dos 40°C até aos 5°C.

A composição da componente lipídica da membrana de muitas espécies, designadamente de plantas, algas, bactérias e animais ectotérmicos, entre outros organismos, pode mudar em resposta a condições ambientais como a temperatura, o stress hídrico, etc. Estas alterações são necessárias para ajustar as características físicas das estruturas membranares, de modo que possam desempenhar as suas funções fisiológicas necessárias quando os fatores ambientais se alteram (Quinn, 1988). Para permitir adaptar-se às variações de temperatura, a membrana plasmática sofre alterações na composição química dos fosfolípidos, no grau de saturação, no comprimento das cadeias de ácidos gordos, na ramificação e na concentração de colesterol, entre outras modificações (Šajbidor, 1997; Subczynski et al., 2017). Por exemplo, os níveis de insaturação de ácidos gordos aumentam a temperaturas mais baixas (Hirobumi et al., 1976). O aumento do grau de insaturação leva a uma maior fluidez da membrana, uma vez que as cadeias de carbono fletem devido às ligações duplas cis C=C, reduzindo o grau de empacotamento e ordenação das moléculas. Da mesma forma, cadeias de carbono mais curtas determinam a formação de menor número de interações hidrofóbicas, aumentando a fluidez da membrana (Alberts et al., 2014). O menor grau de empacotamento e ordenação da membrana permite que a transição de fase ocorra a temperaturas inferiores, pelo que aumenta a resistência dos organismos a temperaturas baixas. O inverso ocorre quando os organismos estão expostos a temperaturas elevadas, aumentando o grau de saturação e comprimento das cadeias de carbono.

Relativamente aos solventes orgânicos, a resposta diferencial à acetona e ao etanol pode ser atribuída à natureza destes solventes e às suas interações com a membrana plasmática. A quase ausência de pigmento a 1% de concentração de solvente confirma o impacto mínimo na integridade da membrana a concentrações mais baixas.

As diferenças estatísticas observadas sublinham os efeitos dependentes da concentração de acetona e etanol na libertação do pigmento betaleína. O etanol, sendo um solvente mais polar, pode interagir tanto

com as regiões hidrofílicas como com as regiões hidrofóbicas dos lípidos anfipáticos da membrana. Além disso, o etanol pode afetar as proteínas, levando à sua desnaturação e à subsequente libertação de pigmentos. A acetona, apesar de também ser um solvente polar, apresenta menor polaridade. Esta polaridade reduzida resulta numa interação menos eficaz com a porção polar da membrana, levando a um impacto mais suave na integridade da membrana em comparação com o etanol.

Os álcoois alifáticos, de cadeia curta, são particularmente nocivos para as membranas biológicas. Os danos causados nas membranas biológicas devem-se às pontes de hidrogénio que estes álcoois estabelecem com a porção polar dos lípidos e, uma vez no interior da membrana, às interações apolares que estabelecem com a porção hidrofóbica dos lípidos, provocando a desagregação da membrana e a libertação dos lípidos. Esta desagregação e libertação é tanto maior quanto maior a cadeia de carbono do álcool e quanto maior a concentração do solvente. Assim, o metanol é menos eficaz do que o etanol e este menos do que o propanol (Gustafson & Tagesson, 1985; Patra et al., 2006).

No que se refere à acetona, esta favorece a partição da membrana na região hidrofóbica da bicamada, na proximidade das ligações éster dos fosfolípidos e no início das cadeias de hidrocarbonetos. De novo, este efeito é tanto mais pronunciado quanto mais concentrado for o solvente. Um aumento de concentração de acetona, como observado, conduz a uma desordenação drástica do empacotamento dos fosfolípidos. As moléculas de acetona afastam a porção polar dos lípidos o que origina, também, um aumento da área média por molécula. Além disso, a região da cadeia de carbono da membrana também se torna menos densa. Todos estes efeitos determinam o aumento da fluidez da membrana e, eventualmente, a sua rutura (Posokhov & Kyrychenko, 2013).

Alguns organismos vivos demonstraram a capacidade de se adaptarem a solventes orgânicos tóxicos, designadamente algumas estirpes bacterianas. Diversos mecanismos contribuem para a tolerância dessas estirpes aos solventes, como sejam modificações na composição da membrana citoplasmática e da membrana externa, que ajudam a neutralizar os efeitos dos solventes na estabilidade e na taxa de difusão das membranas. Um outro mecanismo diz respeito ao ajuste na taxa de produção de fosfolípidos para acelerar os processos de reparação membranar (Isken & de Bont, 1998).



APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho prático proporciona aos estudantes uma oportunidade para aplicar e consolidar os conceitos teóricos relacionados com a integridade da membrana plasmática e com as respostas celulares a diferentes fatores de stress, como as variações térmicas e a exposição a solventes orgânicos. A libertação diferencial de pigmentos de betalaína em resposta a temperaturas extremas oferece uma compreensão prática de como os fatores ambientais influenciam a saúde celular.

No estudo sobre os efeitos dos solventes orgânicos, os alunos podem relacionar a teoria com a prática, observando como a concentração e o tipo de solvente influenciam a permeabilidade das membranas. A interpretação dos resultados, destacando as diferenças entre a acetona e o etanol, permite, ainda, a compreensão dos mecanismos de interação entre os solventes e as membranas celulares. Uma ampla discussão dos resultados incentiva os estudantes a pensar criticamente, considerando as implicações biológicas e as aplicações práticas dos conceitos aprendidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell* (sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Alberts, B. (2014). *Essential Cell Biology* (fourth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Gustafson, C., & Tagesson, C. (1985). Influence of organic solvent mixtures on biological membranes. *Occupational and Environmental Medicine*, 42(9), 591–595. <https://doi.org/10.1136/oem.42.9.591>
- Hirobumi, F., Martin, C. E., Hisaya, I., Yasuo, K., Thompson, G. A., & Yoshinori, N. (1976). Changes in membrane lipid composition during temperature adaptation by a thermotolerant strain of tetrahymena pyriformis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 431(1), 165–179. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(76\)90271-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(76)90271-X)
- Isken, S., & de Bont, J. A. M. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 2(3), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s007920050065>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martino, K. C. (2016). *Molecular Cell Biology* (fifth edition). W. H. Freeman and Company.
- Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J., & Karttunen, M. (2006). Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 90(4), 1121–1135. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364>
- Posokhov, Y. O., & Kyrychenko, A. (2013). Effect of acetone accumulation on structure and dynamics of lipid membranes studied by molecular dynamics simulations. *Computational Biology and Chemistry*, 46, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2013.04.005>
- Quinn, P. J. (1988). Effects of temperature on cell membranes. *Symp Soc Exp Biol*, 42, 237–258. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1216835>
- Šajbidor, J. (1997). Effect of Some Environmental Factors on the Content and Composition of Microbial Membrane Lipids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(2), 87–103. <https://doi.org/10.3109/07388559709146608>
- Simon, E. W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, 73, 377–420.
- Singh, A., Ganesapillai, M., & Gnanasundaram, N. (2017). Optimizaton of extraction of betalain pigments from beta vulgaris peels by microwave pretreatment. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032004. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032004>
- Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 75(3–4), 369–385. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0792-7>
- Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Orr, R. B., & Campbell, N. A. (2021). *Campbell Biology* (twelfth edition). Benjamin Cummings, Pearson.
- Vierl, U., Löbbecke, L., Nagel, N., & Cevc, G. (1994). Solute effects on the colloidal and phase behavior of lipid bilayer membranes: ethanol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures. *Biophysical Journal*, 67(3), 1067–1079. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80572-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80572-7)
- Vodopich, D. S., & Moore, R. (2023). Cellular Membranes - Effects of Physical and Chemical Stress, exercise 10, 109-116, in *Laboratory Manual Biology* (thirteen edition). McGraw-Hill.