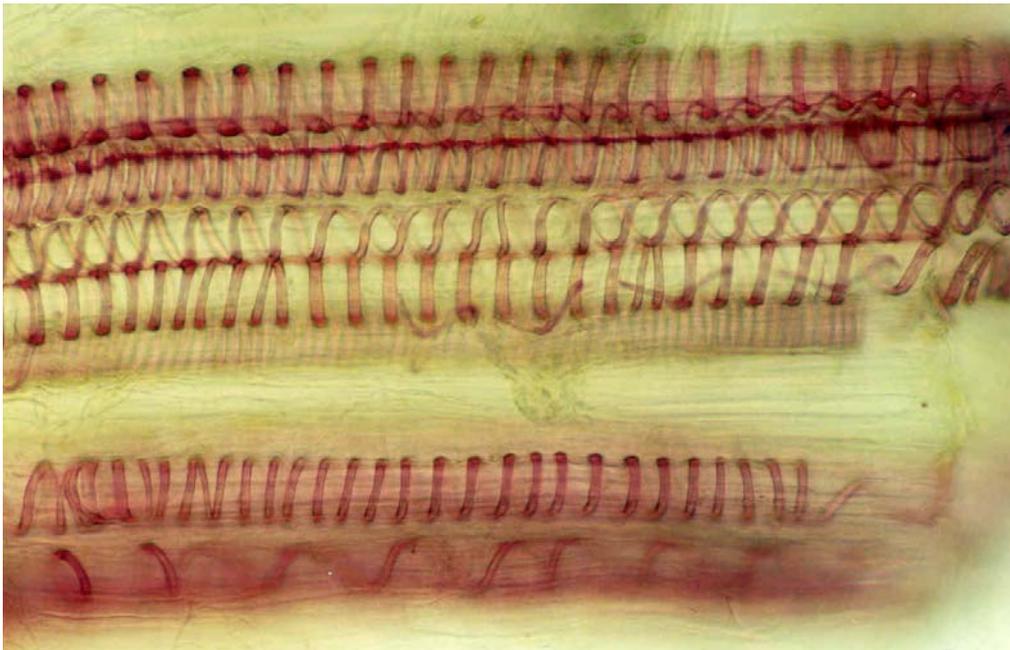




FACULDADE • DE • CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE • DE • LISBOA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

HISTOQUÍMICA E CITOQUÍMICA EM PLANTAS: PRINCÍPIOS E PROTOCOLOS



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



FACULDADE • DE • CIÊNCIAS UNIVERSIDADE • DE • LISBOA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

SECÇÃO DE BIOLOGIA CELULAR E BIOTECNOLOGIA VEGETAL

HISTOQUÍMICA E CITOQUÍMICA EM PLANTAS: PRINCÍPIOS E PROTOCOLOS

Por:

Ana Cristina da Silva Figueiredo

José Manuel Gonçalves Barroso

Luis Manuel Gaspar Pedro

Lia Ascensão

Figura da capa:

Coloração com Floroglucinol de vasos condutores xilémicos de *Crithmum maritimum*
(foto seleccionada no concurso fotográfico “Laboratório de Imagens” promovido pela
Associação Viver a Ciência em 2005)

FICHA TÉCNICA

Título: Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos

- (1993 - 1998) Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro, M. C. Pedroso. *Textos de apoio para Histoquímica e Citoquímica Vegetais*, Faculdade de Ciências de Lisboa (edição anual dos autores).
- (1993 - 1999) Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro, M. C. Pedroso. *Protocolos para Histoquímica e Citoquímica Vegetais*, Faculdade de Ciências de Lisboa (edição anual dos autores).
- (1999) Barroso J. G. *Histoquímica e Citoquímica*. Edição da Associação de Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa.
- (2007) Figueiredo A. C., J. G. Barroso, L. G. Pedro, L. Ascensão. *Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos*, Lisboa, 1ª Edição. Edição Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal.
-

Autores:

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

Edição:

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

Composição, Impressão e Acabamentos:

Repro2000

Tiragem:

1ª Edição, Lisboa, Janeiro de 2007 - 30 exemplares

ISBN: 978-972-9348-17-4

Depósito Legal nº: 256896/07

ÍNDICE

I. HISTOQUÍMICA: PRINCÍPIOS	1
Basofilia e Acidofilia.....	3
Metacromasia.....	3
Alocromasia.....	4
Fluorescência.....	5
1. Detecção de Proteínas	6
1.1. Em luz visível.....	7
1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos.....	7
Reacção de Sakaguchi para a arginina.....	7
1.1.2. Coloração de proteínas por ligação do corante a grupos de aminoácidos.....	7
a) Corantes que formam ligações covalentes.....	8
Reacção Ninidrina-Schiff.....	8
Azul Mercúrico de Bromofenol.....	8
b) Corantes que formam ligações electrostáticas.....	9
Reacção do Biureto.....	9
Azul Brilhante de Comassie.....	10
1.1.3. Coloração selectiva de determinadas proteínas.....	10
1.2. Em UV.....	10
a) Determinação da viabilidade celular.....	10
Diacetato de Fluoresceína.....	10
2. Detecção de Hidratos de Carbono	10
2.1. Em luz visível.....	11
2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo <i>vic</i> -glicol ou grupos aparentados.....	11
Reacção Ácido Periódico-Reagente de Schiff.....	11
2.1.2. Caracterização diferencial dos hidratos de carbono.....	15
a) Polissacáridos ácidos.....	15
Azul de Alciano.....	15
b) Amido.....	16
Lugol.....	16
c) Pectinas.....	16
Vermelho de Ruténio.....	16
2.2. Em UV.....	16
a) Polissacáridos ácidos.....	16
Laranja de Acridina.....	16
b) β -Glucanos.....	17
Calcoflúor.....	17
c) Calose.....	17
Azul de Anilina.....	17
3. Detecção de Mucilagens e Mucopolissacáridos Ácidos	17
3.1. Em luz visível.....	17
a) Mucilagens.....	17
Ácido Tânico/Cloreto Férrico.....	17
Vermelho de Ruténio.....	18
b) Mucopolissacáridos ácidos.....	18
Azul de Alciano.....	18
4. Detecção de Lípidos	18
4.1. Em luz visível.....	19
4.1.1. Birrefringência dos lípidos.....	19
4.1.2. Detecção geral de lípidos.....	19
Sudões.....	20

4.1.3. Detecção diferencial de lípidos	20
a) Lípidos ácidos e neutros	20
Sulfato Azul do Nilo	20
b) Lípidos insaturados	21
Tetróxido de Ósmio	21
c) Ácidos gordos	21
Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico	21
4.2. Em UV	21
Vermelho Neutro	21
5. Detecção de Terpenóides.....	22
5.1. Em luz visível	22
5.1.1. Detecção diferencial de terpenóides.....	22
a) Essências e ácidos resínicos	22
Reagente de Nadi.....	22
b) Esteróides	22
Tricloreto de Antimónio.....	22
c) Terpenóides com grupo carbonilo.....	23
2,4-Dinitrofenilhidrazina	23
d) Lactonas sesquiterpénicas.....	23
Ácidos fortes.....	23
Reacção modificada de Abraham.....	23
5.2. Em luz visível e em UV	24
a) Detecção de partículas de borracha	24
Oil Red O ou Oil Blue N.....	24
5.3. Em UV	24
a) Detecção de partículas de borracha	24
Cloro de Dansil	24
6. Detecção de Fenóis	24
6.1. Em luz visível	25
6.1.1. Caracterização geral de fenóis	25
Cloro de Ferro III	25
Dicromato de Potássio	25
Diazoreacção	25
6.1.2. Caracterização diferencial de fenóis	26
a) Detecção de lenhinas	26
Floroglucinol	26
b) Detecção de taninos	26
Vanilina Clorídrica	26
6.2. Em UV	26
a) Detecção de flavonóides.....	26
Fluorocromos	26
7. Detecção de Alcalóides	27
7.1. Em luz visível	27
7.1.1. Caracterização geral de alcalóides.....	27
Dragendorff	27
7.2. Em UV.....	28
8. Métodos de coloração dupla	28
Verde Iodo-Carmim Aluminado e Azul de Astra-Safranina.....	28
Azul de Metileno-Azur A-Safranina	28
Azul de Toluidina.....	29
PAS-Azul de Toluidina.....	29
9. Histoquímica em secções semifinas de resinas Epóxi	29
9.1.1. Detecção de hidratos de carbono	29

Ácido Periódico - Reagente de Schiff (PAS)	29
9.1.2. Detecção de lípidos.....	29
Negro Sudão B	29
9.1.3. Detecção de proteínas.....	29
Azul Brillhante de Comassie.....	29
II. CITOQUÍMICA: PRINCÍPIOS	30
1. Detecção Citoquímica de Proteínas	32
1.1. Métodos de caracterização geral.....	32
1.2. Métodos de caracterização de grupo.....	33
Visualização de Ribo- e Desoxirribonucleoproteínas pelo método da Contrastação Regressiva	33
Detecção da actividade das fosfatases.....	33
Detecção da actividade de oxidases.....	33
Detecção da actividade da celulase.....	33
2. Detecção Citoquímica de Hidratos de Carbono	34
2.1. Métodos de caracterização geral.....	34
Detecção de Polissacáridos (PATAg).....	34
2.2. Métodos de caracterização diferencial.....	35
3. Detecção Citoquímica de Lípidos	35
III. HISTOQUÍMICA: PROTOCOLOS	37
1. Detecção de Proteínas	37
1.1. Em luz visível.....	37
1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos	37
Reacção de Sakaguchi para a arginina	37
1.1.2. Coloração de proteínas por ligação do corante a grupos de aminoácidos.....	37
a) Corantes que formam ligações covalentes.....	37
Reacção Ninidrina-Schiff	37
Azul Mercúrico de Bromofenol.....	38
Azul Brillhante de Comassie.....	38
1.2. Em UV	38
a) Determinação da viabilidade celular.....	38
Diacetato de Fluoresceína	38
2. Detecção de Hidratos de carbono	39
2.1. Em luz visível.....	39
2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo <i>vic</i> -glicol ou grupos aparentados.....	39
Ácido periódico - Reagente de Schiff [PAS].....	39
2.1.2. Caracterização diferencial dos hidratos de carbono.....	39
a) Polissacáridos ácidos.....	39
Azul de Alciano	39
b) Amido.....	39
Lugol.....	39
c) Pectinas.....	40
Vermelho de Ruténio	40
2.2. Em UV	40
a) Polissacáridos ácidos.....	40
Laranja de Acridina	40
Ácido Periódico /Acriflavina-Pseudo Schiff [F-PAS].....	40
b) β -Glucanos.....	41
Calcoflúor.....	41
c) Calose	41
Azul de Anilina	41

3. Detecção de Mucilagens e Mucopolissacáridos Ácidos	41
3.1. Em luz visível	41
a) Mucilagens.....	41
Ácido Tânico / Cloreto de Ferro	41
Vermelho de Ruténio.....	42
b) Mucopolissacáridos Ácidos.....	42
Azul de Alciano.....	42
4. Detecção de Lípidos	42
4.1. Em luz visível	42
4.1.2. Detecção geral de lípidos	42
Negro Sudão B ou Vermelho Sudão IV.....	42
Vermelho Sudão 7B	43
4.1.3. Detecção diferencial de lípidos.....	43
a) Lípidos ácidos e neutros	43
Sulfato Azul do Nilo	43
b) Lípidos insaturados.....	43
Tetróxido de Ósmio	43
c) Ácidos gordos	43
Acetato de Cobre / Ácido Rubeânico	43
4.2. Em UV.....	44
Vermelho Neutro	44
5. Detecção de Terpenóides.....	44
5.1. Em luz visível	44
5.1.1. Detecção diferencial de terpenóides.....	44
a) Essências e ácidos resínicos	44
Reagente de Nadi.....	44
b) Esteróides.....	44
Tricloreto de Antimónio.....	44
c) Terpenóides com grupo carbonilo.....	45
2,4-Dinitrofenilhidrazina	45
d) Lactonas sesquiterpénicas.....	45
Ácido Sulfúrico	45
Reacção Modificada de Abraham.....	45
5.2. Em luz visível e em UV	45
a) Detecção de partículas de borracha	45
Oil Red O ou Oil Blue N	45
5.3. Em UV.....	46
a) Detecção de partículas de borracha	46
Cloreto de Dansil.....	46
Oil Red O/Cloreto de Dansil	46
6. Detecção de Fenóis	47
6.1. Em luz visível	47
6.1.1. Caracterização geral de fenóis	47
Cloreto de Ferro III	47
Dicromato de Potássio	47
Diazo reacção	47
6.1.2. Caracterização diferencial de fenóis	47
a) Detecção de lenhinas	47
Fluoroglucinol	47
b) Detecção de taninos	48
Vanilina Clorídrica	48
6.2. Em UV.....	48
a) Detecção de flavonóides.....	48
Acção de Fluorocromos.....	48

7. Detecção de Alcalóides	48
7.1. Em luz visível.....	48
7.1.1. Caracterização geral de alcalóides	48
Reagente de Dragendorff	48
Reagente de Dittmar.....	49
Reagente de Wagner.....	49
Reagente de Ellram	49
7.2. Em UV	49
8. Métodos de coloração dupla.....	50
Verde Iodo-Carmim Aluminado.....	50
Azul de Astra-Safranina	50
Azul de Metileno-Azure A-Safranina	50
Azul de Toluidina	51
9. Histoquímica em secções semifinas de resinas Epóxi.....	51
9.1.2. Detecção de hidratos de carbono	51
Ácido periódico-Reagente de Schiff (PAS)	51
9.1.3. Detecção de lípidos.....	51
Negro Sudão B	51
9.1.4. Detecção de proteínas.....	52
Azul Brillhante de Comassie R250	52
IV. CITOQUÍMICA: PROTOCOLOS	53
1. Detecção citoquímica de proteínas	53
Visualização de Ribo- e Desoxirribonucleoproteínas pelo método da Contrastação Regressiva	53
Detecção da actividade fosfatásica ácida	53
Detecção da actividade adenosina trifosfatase.....	54
Detecção da actividade inosina difosfatase	54
Detecção da actividade tiamina pirofosfatase.....	55
Detecção da actividade peroxidásica da catalase	55
Detecção da actividade das peroxidases.....	56
Detecção da actividade da celulase.....	56
Digestão enzimática por acção de uma pronase	56
2. Detecção citoquímica de hidratos de carbono	57
Detecção de Polissacáridos (PATAg).....	57
3. Detecção citoquímica de lípidos.....	57
Digestão enzimática por acção de uma lipase.....	57
APÊNDICE	58
Solução de α -Naftol-Hipoclorito	58
Solução de Piridina-Clorofórmio	58
Reagente de Schiff	58
Pseudo Schiff.....	58
Azul de Bromofenol.....	58
Azul de Comassie.....	58
Metabissulfito de Sódio 0.5%.....	58
Vermelho de Ruténio	58
Sulfato de Azul do Nilo.....	58
Reagente de Nadi.....	59
Solução Metanólica de Tiocianato Ferroso.....	59
Fluorocromos para detecção de flavonóides	59
Reagente de Wagner.....	59
Reagente de Dittmar.....	59
Reagente de Dragendorff	59
Diacetato de Fluoresceína	59
Laranja de Acridina em PBS.....	59
Safranina	60

Solução saturada de Dimedona	60
Azul de Metileno-Azur A	60
PBS (Phosphate Buffer Saline) – Tampão Fosfato Salino (sem cálcio nem magnésio)	60
Tampão Fosfato (0.1M)	60
Tampão Veronal (0.1M) pH 7.4-8	61
Tampão Tris (0.1M)	61
Tampão Tris- Maleato (0.1M)	61
Tampão Glicina	62
Solução de HCl 1N	62
Detecção da actividade fosfatásica ácida	62
Detecção da actividade adenosina trifosfatase	62
Detecção da actividade inosina difosfatase	62
Detecção da actividade tiamina pirofosfatase	63
Detecção da actividade peroxidásica da catalase	63
Detecção da actividade das peroxidases	63
Detecção da actividade da celulase	63
BIBLIOGRAFIA.....	64
ÍNDICE REMISSIVO.....	66

I. HISTOQUÍMICA: PRINCÍPIOS

A Histoquímica tem como objectivo localizar *in situ*, os principais grupos químicos que ocorrem nos tecidos. Como tal, a histoquímica associa à histologia, um aspecto químico, o da determinação da natureza das substâncias presentes nos tecidos e da sua localização. Em todos os métodos histoquímicos é necessário evitar o deslocamento artificial da substância a caracterizar durante os tratamentos que precedem a reacção histoquímica, que é detectada ao microscópio por coloração específica ou por emissão de radiação. Para além disso, os métodos histoquímicos não permitem, na sua maioria, determinações quantitativas.

Durante a execução de uma reacção histoquímica podem distinguir-se duas etapas: pré-tratamentos (a) e visualização da(s) substância(s) que se pretende(m) detectar (b).

a) Pré-tratamentos – Raros são os tipos de materiais que apresentam espessura adequada para poderem ser observados directamente ao microscópio óptico (células em cultura, células sanguíneas). Na maioria dos casos, o material tem de ser fixado, isto é, submetido a todo um conjunto de tratamentos para estabilizar as moléculas de modo a impedir deslocamentos ou perdas, preservando assim a estrutura celular num estado tão próximo, quanto possível, ao de *in vivo*. Contudo, é de realçar que todos os tipos de fixação alteram mais ou menos significativamente as moléculas que estabilizam. Por exemplo, os dois únicos reagentes usados para fixar lípidos, ou seja de os tornar insolúveis em solventes orgânicos, o OsO₄ e o ácido crómico, alteram substancialmente a reactividade química dos lípidos que fixam. A utilização de material criofixado em histoquímica vem obviar alguns destes problemas.

b) Visualização da(s) substância(s) que se pretende(m) detectar. Em alguns casos, raros, a substância em estudo é directamente visualizada sem necessidade de manipulações acessórias. É por exemplo o caso das substâncias naturalmente coradas (pigmentos), das que absorvem os raios UV (ácidos nucleicos), ou os raios X (metais pesados) ou das substâncias autofluorescentes (vitamina A). Contudo, na maior parte dos casos, é necessário introduzir, ou criar, um cromóforo, na substância a identificar, ou seja, um grupo visualizável pela cor, pela absorção dos raios UV ou por emissão de fluorescência, por exemplo. A formação do cromóforo pode resultar duma reacção directa ou indirecta. No primeiro caso o reagente forma, com a substância em estudo, um produto de reacção imediatamente identificável, enquanto no segundo, o produto de reacção só é visualizado por uma reacção secundária, na qual intervém outro reagente.

De um modo geral utilizam-se os chamados corantes biológicos. Estes são substâncias incolores (cromogénicas) ou coradas, orgânicas ou inorgânicas, que ao conferirem cor às estruturas celulares (animais ou vegetais) permitem elucidar a sua estrutura e natureza química.

Ainda que muito esteja por explicar sobre a cor, sabe-se que certos grupos atómicos, designados cromóforos, lhe estão associados. Os mais importantes são C=C, C=O, C=S, C=N, N=N, N=O e NO₂, e destes, quanto maior for o seu número num determinado composto, mais intensa é a cor. Embora os cromóforos difiram muito uns dos outros, todos têm em comum, a propriedade de serem facilmente reduzidos: o grupo imina pode ser reduzido a amina; o grupo azo pode ser reduzido, e 2 hidrogénios podem ligar-se, um a cada um dos N, o mesmo acontecendo aos cromóforos com ligações duplas. A redução do cromóforo, leva a que o composto perca a cor. É o caso da fucsina que, por redução, dá um composto incolor, designado leucofucsina, ou, mais vulgarmente, Reagente de Schiff.

A cor resulta da absorção selectiva de radiação, de modo que a luz transmitida ou reflectida por uma substância possui um espectro que não apresenta os comprimentos de onda que foram absorvidos. Por outras palavras, a substância actua como se fosse um filtro, bloqueando certas zonas do espectro. Os grupos cromóforos conferem à molécula este tipo de propriedade, actuando, possivelmente, como um sistema de ressonância que vibra ao mesmo ritmo dos

comprimentos de onda absorvidos. Os compostos insaturados mostram uma tendência para a ressonância, nomeadamente a nível das ligações duplas dos cromóforos. Com o aumento do grau de insaturação e complexidade do composto, o espectro de absorção tende a passar do ultravioleta para o infravermelho, isto é, a cor transmitida (ou reflectida) muda do azul para vermelho, passando pelo amarelo.

Para além dos cromóforos, existem grupos funcionais (-OH, -NH₂, -Cl, -COOH, -SO₃H) designados auxocromos, que possuindo electrões de valência não ligantes absorvem radiação de comprimento de onda <200nm. Os auxocromos revelam absorção intensa na banda do UV-longínquo. Quando um auxocromo se liga a um cromóforo verifica-se um deslocamento da banda de absorção do cromóforo para comprimentos de onda mais elevados (efeito batocromático). Em histoquímica o auxocromo é responsável pelas ligações do corante às estruturas celulares. Os auxocromos mais comuns são ácidos sulfónicos ou carboxílicos, que se ligam electrostaticamente a bases, presentes nos tecidos, ou sais imínio que se ligam aos grupos ácidos. Estas ligações podem ocorrer directamente ou serem mediadas por um ião metálico di- ou trivalente (Al, Fe, Cr, W, Mo, Cu), que pode formar complexos de coordenação ou ligações iónicas, quer com o auxocromo, quer com os grupos funcionais disponíveis à superfície do tecido.

Nos corantes básicos o grupo auxocromo é uma amina primária, secundária ou terciária, o qual por adição de um ácido como o HCl, pode formar um sal. Contudo, as soluções dos corantes básicos podem ter um comportamento moderadamente ácido, porquanto o carácter ácido do ião cloro se sobrepõe ao carácter básico do ião imínio. O inverso é igualmente verdade para os corantes que formam fenolatos ou carbanolatos sódicos.

Num grupo importante de reacções histoquímicas, o cromóforo é um grupo funcional introduzido na molécula a identificar. Por exemplo, na reacção de Feulgen, o ácido desoxirribonucleico é posto em evidência pela ligação da fucsina sulfurosa corada ao aldeído, entretanto criado. Num outro grupo de reacções histoquímicas, o cromóforo não é introduzido na molécula a identificar, como acontece, por exemplo, na detecção de vitamina C com nitrato de prata. A vitamina C, fortemente redutora, reduz o sal de prata a prata metálica, que se deposita, no local de reacção, sob a forma de um precipitado de cor negra. O cromóforo criado (a prata metálica), não é introduzido na vitamina C, que continua invisível.

Neste grupo de reacções histoquímicas importa introduzir dois conceitos: a) reacções falsamente positivas e b) reacções falsamente negativas (Fig. 1).

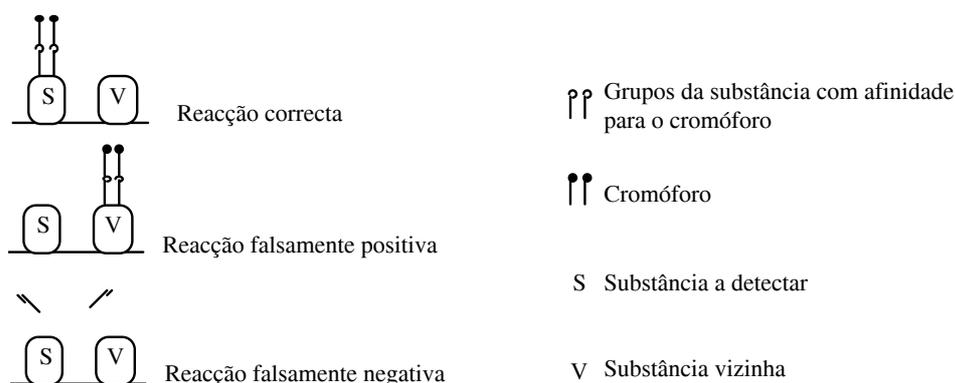


Fig. 1

a) Reacções falsamente positivas – Resultam do facto de o cromóforo se ligar a estruturas diferentes das que lhe deram origem. Este tipo de reacção depende do tempo que medeia entre a formação do cromóforo e a sua imobilização definitiva, e do grau de afinidade da outra substância

para esse cromóforo.

b) Reacções falsamente negativas - Resultam do facto do cromóforo não ser retido nas estruturas celulares, durante a sua formação.

Assim, a especificidade da reacção depende da velocidade de formação do cromóforo, da sua solubilidade no meio (em ambos os casos para evitar a sua dispersão) e da afinidade para a substância a detectar.

Como se pode então ter a certeza de que a localização de uma substância está correcta? Em princípio, a concordância dos resultados de diversos testes histoquímicos diminui a possibilidade duma localização errónea. Por outro lado, a execução de controlos apropriados e a observação crítica dos resultados obtidos de diferentes testes são, igualmente, factores determinantes para a correcta interpretação dos resultados histoquímicos.

A característica mais relevante das reacções histoquímicas é, salvo raríssimas excepções, identificar apenas grupos funcionais. É o caso, por exemplo, dos grupos carbonilo (—CH=O), ou dos grupos sulfidrílo (—SH), que ocorrem em substâncias de origem e significado bioquímico bem diversos. Noutros casos, a reacção revela apenas propriedades que são apanágio comum a muitos grupos funcionais, como, por exemplo, o carácter redutor, ou a afinidade para corantes básicos. Por exemplo a basofilia pode ser encontrada num grupo carboxilo, fosfato, sulfato, etc., isto é, em proteínas, lípidos, glúcidos, pigmentos, entre outros. A utilidade prática duma reacção histoquímica depende pois, do conhecimento da localização dos grupos funcionais passíveis de reagir nas condições de análise e, entre outros, do tipo de pré-tratamento a que foi sujeito o material (com ou sem fixação, tipo de fixador).

BASOFILIA E ACIDOFILIA

Em termos gerais, a fixação de um corante básico, carregado positivamente, a uma substância ácida ionizada, define uma reacção basófila. No entanto, esta reacção só tem significado histoquímico quando é efectuada sob condições experimentais bem definidas. Com efeito, diversos factores influenciam a fixação do corante catiónico. Assim, para além da coloração ter de ser efectuada dentro de certos limites de pH, é importante ter em mente que a ligação electrostática, entre o corante e os componentes das estruturas celulares, pode ser inibida pela presença de outros catiões, quer endógenos, quer presentes no veículo da solução corante. Por outro lado, a penetração deficiente das moléculas do corante, no tecido, ou a inacessibilidade dos grupos aniónicos, por razões conformacionais, pode determinar a ausência de coloração. Ao contrário, as estruturas celulares podem aparecer coradas e isso não se deve ao estabelecimento de ligações electrostáticas, mas sim à formação de ligações covalentes, de hidrogénio ou de van der Waals.

À semelhança da basofilia, a acidofilia também só tem significado histoquímico, quando há controlo rigoroso das condições experimentais. No entanto, os corantes ácidos, ao contrário do que se verifica com os básicos, são pouco utilizados em histoquímica, por razões de natureza essencialmente técnica e porque a coloração é, em geral, muito ténue.

METACROMASIA

Diversos corantes têm a capacidade de corar, selectivamente, as estruturas celulares com tons de cor diferentes das do corante em solução aquosa diluída (reacção metacromática). Os corantes com estas propriedades designam-se corantes metacromáticos e as substâncias às quais se ligam recebem o nome de cromótopos. Embora tanto os corantes ácidos como os básicos sejam susceptíveis de evidenciar metacromasia, por definição só os corantes básicos são

metacromáticos.

Estudos espectrofotométricos em corantes metacromáticos, por exemplo Azul de Toluidina, Violeta de Cristal ou Safranina O, revelam que estes não obedecem à lei de Lambert-Beer, em solução aquosa, e que a cor da solução corante se altera, significativamente, com a concentração. No entanto, a lei de Lambert-Beer é respeitada, dentro de certos limites, quando o solvente não é aquoso (etanol, acetona ou ácido acético).

São várias as teorias que tentam explicar a metacromasia. Inicialmente, admitia-se que a metacromasia era um fenómeno resultante da formação de tautómeros, com espectros de absorção diversos dos da solução original. Esta teoria não encontrou suporte experimental e foi rapidamente abandonada. Ulteriormente, passou a admitir-se que a metacromasia resultava da polimerização do corante. Segundo esta teoria, a forma ortocromática do corante correspondia a um monómero e a forma metacromática a um polímero. Os dímeros, os trímeros, os tetrámeros, etc., seriam, neste contexto, responsáveis pelos tons de cor intermédias. Também esta teoria não encontrou suporte experimental. Actualmente, o fenómeno metacromático é explicado pela alteração da distribuição de carga à superfície do corante.

Qualquer que seja o mecanismo da viragem metacromática de uma solução corante, o importante, em histoquímica, é saber quais os grupos químicos que num tecido fixam o corante e determinam a viragem metacromática e quais os factores capazes de influenciar a reacção.

Os estudos efectuados revelam que a metacromasia não está ligada a nenhum grupo químico particular, mas depende, unicamente, da presença de elevada densidade de cargas negativas, alinhadas e espaçadas regularmente à superfície do cromótopo. Os ácidos nucleicos, os lípidos com carácter ácido e os polissacáridos ácidos são consideradas, em histoquímica, como substâncias cromótropas

A densidade de carga é factor determinante, quer da reactividade do cromótopo com o corante metacromático, quer da intensidade da metacromasia. É necessária a distância de cerca de 5Å, entre os grupos aniónicos, para que se verifique o fenómeno metacromático. Nos casos em que essa distância é inferior, a metacromasia é mais intensa. Além disso, a orientação paralela das moléculas do corante é também factor determinante no aumento dessa intensidade. Para tal, muito contribui a água que, ao estabelecer ligações de hidrogénio com as moléculas do corante, leva a que este forme um falso polímero, com um espectro de absorção distinto do corante na sua forma ortocromática.

Tal como a basofilia, a metacromasia é influenciada pelo pH e pela presença de catiões, quer na solução corante, quer no tecido. A ausência de reacção metacromática, por parte de uma macromolécula com grupos aniónicos à superfície, pode dever-se à sua ligação a outros catiões, que não os do corante (iões inorgânicos ou proteínas), à inacessibilidade dos grupos aniónicos, por razões conformacionais, ou à insuficiente densidade de carga. Por outro lado, o estudo histoquímico do fenómeno metacromático, a pH controlado, permite obter informação sobre a natureza química do grupo ionizável do cromótopo.

ALOCROMASIA

Existe um outro grupo de corantes, também utilizado em histoquímica, que à semelhança dos corantes metacromáticos cora as estruturas celulares com cor diversa (corantes alocromáticos). No entanto, o mecanismo de reacção é distinto, a alocromasia resulta do facto de o corante não ser uma substância pura, mas possuir pequenas quantidades de compostos contaminantes, também eles com propriedades tintoriais. O exemplo, que melhor se conhece, é o da coloração com Sulfato Azul do Nilo, em que os lípidos neutros ou ácidos, em fase líquida, coram de rosa, enquanto todas as substâncias com carácter ácido, lípidos ou não, coram de azul.

FLUORESCÊNCIA

Os corpos, que devido à sua temperatura elevada, são auto-luminosos dizem-se incandescentes, sendo todas as outras formas de emissão de luz designadas luminescentes. A emissão de luz como resultado da absorção de energia luminosa é designada fotoluminescência e inclui os processos de fluorescência e fosforescência.

A fluorescência é a propriedade que as moléculas têm de emitir radiação electromagnética sob a forma de luz, como resultado da absorção de energia luminosa.

Quando um átomo é bombardeado por um fóton animado de certa energia pode, em certos casos, sofrer alteração da sua estrutura electrónica, que consiste na passagem de um electrão de uma órbita para outra mais afastada do núcleo, portanto para um nível mais elevado de energia. Um átomo nestas circunstâncias denomina-se excitado e é muito instável, tendo tendência a regressar ao estado inicial de energia. Quando isso acontece, o excesso de energia é libertado sob a forma de um fóton, o qual se propagará segundo um movimento ondulatório em que comprimento de onda dependerá da energia do fóton. Devido a perdas de energia inevitáveis (térmicas e outras) a energia do fóton emitido é sempre menor do que a do fóton perturbador da estrutura electrónica (Fig.2).

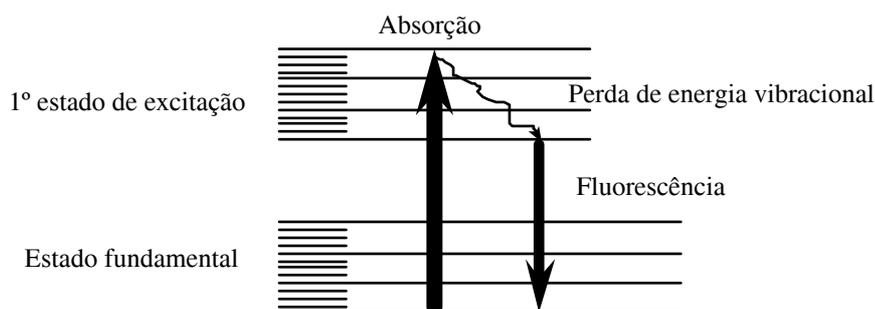


Fig. 2

Na microscopia de fluorescência, caso se use, por exemplo, radiação na região do ultra-violeta (aproximadamente 350-450nm) próxima do visível, a luz emitida é luz visível, que pode ir do azul ao vermelho. Este tipo de microscopia é muito utilizado na caracterização histoquímica de diversas substâncias. A sua importância deriva, não só do facto de permitir detectar substâncias em muito baixa concentração, mas também de pôr em evidência um grande número de substâncias, quer directamente, quer após tratamento químico.

Algumas moléculas orgânicas são naturalmente fluorescentes (fluorescência natural ou primária), sendo as estruturas que as contêm visíveis quando irradiadas por UV. Contudo, na maioria dos casos, as estruturas não possuem fluorescência natural e é então necessário torná-las fluorescentes “corando-as” com compostos fluorescentes (fluorescência induzida ou secundária). Os compostos que exibem fluorescência são denominados fluorocromos ou fluoróforos e apresentam características espectrais diversas como resultado das suas diferentes configurações electrónicas.

As alterações observadas no espectro de excitação e emissão dos fluorocromos, como resultado da sua ligação aos componentes de uma qualquer estrutura celular, permitem obter informação sobre a conformação das moléculas às quais se ligam.

1. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células e dos tecidos, e por isso a sua detecção selectiva foi, durante muito tempo, considerada pouco relevante. Contudo, em muitos casos, é importante evidenciar a presença de determinadas proteínas e/ou de aminoácidos particulares, ou demonstrar a sua ausência em algumas células ou tecidos.

Para além das proteínas estruturais e enzimáticas, algumas proteínas vegetais desempenham um papel importante como material de reserva, em particular nas sementes e nas raízes.

As proteínas podem ser caracterizadas, quer pela sequência de aminoácidos, quer pela sua conformação tridimensional. Como todas as proteínas são constituídas por aminoácidos, a sua coloração histoquímica é determinada e limitada pelas propriedades físico-químicas dos aminoácidos. Contudo, é possível caracterizar e localizar *in situ* tipos particulares de proteínas de modo mais preciso do que corando apenas os grupos de aminoácidos. Em alguns casos pode fazer-se uso de propriedades de absorção características, evidenciadas por algumas proteínas como a hemoglobina. Método diferente requer a localização de enzimas, em que se recorre às suas actividades bioquímicas específicas e/ou às suas propriedades antigénicas, utilizando neste caso anticorpos. Algumas proteínas conjugadas (glicoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, fosfoproteínas e as cromoproteínas como hemoglobinas, hemocianinas e flavoproteínas, etc.) podem ainda ser detectadas mais ou menos selectivamente com base no grupo não proteico (por ex., o PAS pode ser utilizado na detecção de glicoproteínas).

Em muitos casos, os tecidos são previamente fixados, antes de se proceder à detecção histoquímica das proteínas. Deste modo, convém realçar que não se conhece, até agora, nenhum processo de fixação capaz de, em simultâneo, preservar a morfologia celular e manter a reactividade das proteínas. Esta é, em maior ou menor grau, alterada por:

a) Deslocamento relativo das cadeias, o que implica distorção morfológica das estruturas:

b) Desaparecimento dos grupos reactivos da superfície das cadeias, por inactivação ou bloqueio, pelo fixador, ou por terem sido utilizados para criação de novas ligações entre as moléculas. A título de exemplo, refira-se que o formaldeído forma pontes metileno entre os grupos aminados (-NH-CH₂-HN-); o cloreto de mercúrio forma pontes entre os grupos sulfidrilo (-S-Hg-S-), etc. Os fixadores como o álcool e a acetona desnaturam as proteínas e aproximam as cadeias polipeptídicas, ao eliminarem as moléculas de água que revestem as proteínas, permitindo assim a formação de ligações electrostáticas.

c) Aparecimento de novos grupos reactivos como consequência da desnaturação das proteínas. Devido à deslocação das cadeias, alguns grupos anteriormente inacessíveis no interior da cadeia vêm à superfície e tornam-se acessíveis à detecção histoquímica. Isto é particularmente evidente no caso dos grupos sulfidrilo das proteínas. Por exemplo, a albumina desnaturada reage positivamente ao teste do nitroprussiato para os grupos -SH, enquanto a albumina nativa não.

Atendendo às características das proteínas e aos pontos anteriormente mencionados podemos considerar basicamente cinco tipos de coloração histoquímica de proteínas: 1) Coloração de tipos particulares de aminoácidos, 2) Coloração de proteínas por ligação do corante a vários grupos de aminoácidos; 3) Coloração selectiva de determinadas proteínas; 4) Coloração de proteínas com fluorocromos, 5) Detecção de proteínas através das suas propriedades físico-químicas. Em qualquer dos casos, a coloração é determinada, entre outros factores, pela quantidade total de proteína, pela presença de grupos reactivos e, de entre estes, pela percentagem dos que estão acessíveis ao corante.

1.1. EM LUZ VISÍVEL

1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos

A grande limitação deste tipo de coloração deve-se ao facto de não fornecer uma ideia correcta da quantidade total de proteínas. Indica-nos apenas a quantidade de um tipo específico de aminoácido ou de um número restrito de resíduos, uma vez que se baseia na identificação de aminoácidos particulares. Por exemplo, a taxa de tirosina varia entre 11% e 0%, respectivamente nas cerdas e gelatina e a da arginina entre 87% e 1,5%, respectivamente na salmina e cerdas.

Reacção de Sakaguchi para a arginina

Baseia-se no desenvolvimento de um produto corado, resultante da reacção da arginina com o α -naftol e subsequentemente com o hipoclorito ou hipobromito, em meio fortemente alcalino. A reacção é considerada específica para a arginina, pelo menos nas células animais. A coloração resultante (vermelho-alaranjado) é contudo instável (Fig. 3).

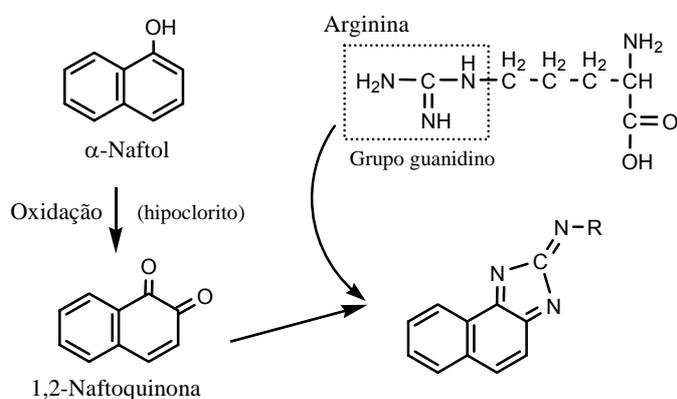


Fig. 3

1.1.2. Coloração de proteínas por ligação do corante a grupos de aminoácidos

Existem numerosas reacções coradas, destinadas à caracterização geral de proteínas (reacções gerais), que são outras tantas tentativas de adaptação, aos cortes histológicos, de métodos utilizados em química orgânica. No entanto, a maioria destes testes não tem qualquer utilidade em histoquímica, quer por serem demasiado agressivos e destruírem o material biológico, quer por as colorações serem muito ténues, quer ainda por não possuírem qualquer especificidade.

Alguns dos métodos, que a seguir se referem, têm sido aplicados na detecção de proteínas em agregados cristalinos que ocorrem, em plantas, nos núcleos de células glandulares de tricomas. A função destas inclusões intranucleares é ainda desconhecida. Para alguns autores constituem reservas proteicas, uma vez que em alguns casos estão só presentes no Verão, desaparecendo sempre que as plantas se encontram em défice nutritivo. Muitas vezes estes agregados formam complexos com hidratos de carbono, pelo que reagem também positivamente ao teste de PAS.

a) Corantes que formam ligações covalentes

Reacção Ninidrina-Schiff

Todos os aminoácidos proteicos, à excepção da prolina e de hidroxiprolina, reagem com a ninidrina (hidrato de indano-1,2,3-triona) dando origem ao mesmo anião de cor púrpura. Nas proteínas, as amina primárias terminais ou da cadeia lateral da lisina reagem da mesma forma com a ninidrina. Além do anião forma-se um carbonilo à superfície da proteína que pode ser revelado pelo Reagente de Schiff (Fig. 4). A presença de iões Cu^{2+} , mesmo em concentrações reduzidas pode impedir a oxidação pela ninidrina.

Os métodos histoquímicos, baseados, no emprego da ninidrina, como único reagente, revelam-se, no entanto, de pouca utilidade, dada a elevada instabilidade e difusibilidade do produto corado

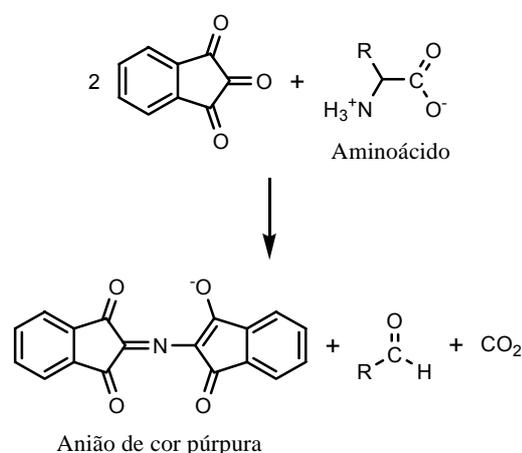


Fig. 4

Azul Mercúrico de Bromofenol

Este corante não foi de início utilizado em histoquímica e, mesmo hoje, as opiniões quanto à sua aplicabilidade são controversas. Segundo alguns autores, o Azul Mercúrico de Bromofenol (HgBPB) é um bom corante, sendo a quantidade de corante ligado proporcional à quantidade de proteína para uma vasta gama de concentrações. Todavia, de acordo com outros autores, a coloração é pouco específica e apresenta muitas limitações. Com efeito, sendo o azul de bromofenol um corante ácido, é natural que se ligue a substâncias ionizadas, com carga positiva, como é o caso das proteínas. Por outro lado, nas condições experimentais da prática histoquímica, existe a possibilidade real do corante estabelecer ligações iónicas com substâncias ionizadas, com carga negativa, por intermédio dos iões de mercúrio, presentes na solução (Fig. 5). Isto mostra claramente que as substâncias, que potencialmente podem corar com o Azul Mercúrico de Bromofenol, não se restringem ao grupo das proteínas.

Tal como acontece com outros iões metálicos, o Hg^{2+} complexa-se com os grupos carboxilo e hidroxilo das proteínas (COOH e OH). O mercúrio possui também afinidade para os grupos sulfidrilo, sendo, neste caso, a ligação mais estável, podendo levar à formação de ligações entre cadeias de proteínas adjacentes. No entanto, nem todos os grupos -SH estão acessíveis devido à conformação tridimensional da proteína.

Algumas moléculas orgânicas, que normalmente não apresentam afinidade para as proteínas, formam com elas complexos fortes na presença de iões metálicos, que actuam como pontes de ligação. Os metais mais eficazes neste processo são: Hg, Cu, Ag, Ni, Zn, Co e Mn. A formação destes complexos pode levar a que grupos hidroxilo, envolvidos em ligações de hidrogénio

intramoleculares, possam tornar-se disponíveis para estabelecer ligações de hidrogénio com o corante (Fig. 5).

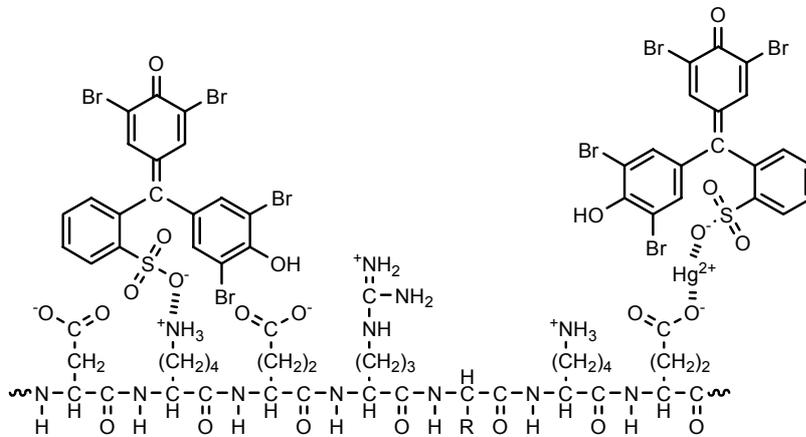


Fig. 5

b) Corantes que formam ligações electrostáticas

A carga eléctrica de uma proteína e o modo como ela é criada pelos resíduos de aminoácidos, é de importância primordial em histoquímica de proteínas. Quase todas as proteínas, que ocorrem nos tecidos animais e vegetais, são anfóteras (apresentam propriedades de ácido e de base fracas), embora algumas estejam em tais extremos, que são virtualmente sempre básicas ou ácidas. Em condições de pH neutro, a maioria das proteínas têm uma carga positiva e, como tal, liga-se a corantes ácidos (com carga negativa, como a Eosina). Por outro lado, os ácidos nucleicos do núcleo possuem uma carga negativa a pH neutro, e portanto estas moléculas ligam-se a corantes básicos, como é o caso da Hematoxilina. A coloração dupla Hematoxilina-Eosina baseia-se exactamente nesta dualidade: o núcleo cora de azul e o citoplasma de vermelho. Em alguns casos, como acontece com o nucléolo que contém ácidos nucleicos e proteínas básicas, pode ocorrer uma certa competição entre os dois corantes.

As protaminas, devido à predominância de arginina e lisina, e as histonas, são exemplos de proteínas de carácter fortemente básico, enquanto que as albuminas e as escleroproteínas são ligeiramente ácidas e as globulinas variam de ligeiramente ácidas a neutras.

Reacção do Biureto

A Reacção do Biureto, é uma reacção corada, clássica da química, que permite detectar a presença de ligações peptídicas em compostos com mais de três resíduos de aminoácidos (Fig. 6). Em meio alcalino, as ligações peptídicas formam complexos corados de cor púrpura com os iões de cobre.

Apesar da sua elevada especificidade para as proteínas, a transposição da Reacção do Biureto para a prática histoquímica revelou-se inadequada. O teste revela baixa sensibilidade e destrói o material biológico.

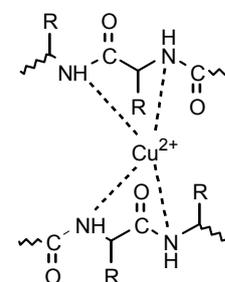


Fig. 6

Azul Brilhante de Comassie

O Azul Brilhante de Comassie é um corante muito sensível que existe sob duas formas, uma vermelha e uma azul. Por ligação do corante à proteína, a forma vermelha é convertida na forma azul, provocando um desvio na banda de absorção máxima de 465 para 595 nm. Tal facto permite determinar por espectrofotometria a quantidade da proteína de uma amostra.

1.1.3. Coloração selectiva de determinadas proteínas

Em histologia animal, em particular em histopatologia, utilizam-se vários métodos para detectar a presença de tipos específicos de proteínas, tais como a queratina, o colagénio, a reticulina, a elastina e a fibrina. Do ponto de vista da histoquímica vegetal as nucleoproteínas são as únicas detectadas selectivamente, pela Reacção de Feulgen.

1.2. EM UV

Os corantes, referidos anteriormente para detecção de proteínas, são diacromos. Contudo, alguns deles, como a Eosina e o Naphtol Yellow podem ser utilizados como fluorocromos, embora sejam menos eficientes. Os fluorocromos não são de aplicação convencional, no estudo histoquímico de proteínas, mas encontram grande aplicação no campo da imunofluorescência, em que, um anticorpo conjugado com um fluorocromo, se liga especificamente ao antigénio correspondente.

Um dos fluorocromos mais utilizados na detecção de proteínas é o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), que produz fluorescência de cor verde quando irradiado com UV. Este reagente liga-se a grupos amina de proteínas celulares.

a) Determinação da viabilidade celular

Diacetato de Fluoresceína

O Diacetato de Fluoresceína (FDA) é um fluorocromo utilizado na determinação da viabilidade celular. O FDA atravessa livremente a membrana celular, mas só nas células viáveis é sujeito à acção de uma esterase que quebra os resíduos acetato, libertando a fluoresceína, que se acumula intracelularmente (retida pela membrana celular intacta), originando uma intensa fluorescência amarelo-esverdeada.

2. DETECÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO

Os hidratos de carbono, polihidroxi-aldeídos ou cetonas, compreendem monossacáridos (uma cetose ou aldose; ex. glucose), dissacáridos (duas unidades; ex. sacarose), oligossacáridos (4-10 unidades de monossacáridos), polissacáridos (moléculas lineares ou ramificadas com centenas ou milhares de unidades de monossacáridos; ex. celulose, glicogénio). Os polissacáridos de massa molecular elevada, frequentemente agrupados em polissacáridos estruturais (celulose, calose, quitina, mucopolissacáridos ácidos e neutros) e os polissacáridos de reserva (amido e glicogénio), constituem a maioria dos hidratos de carbono que ocorrem na natureza.

Nas plantas, os polissacáridos mais comuns são o amido e a celulose, embora se possam encontrar outros polissacáridos, que contêm diversos tipos de açúcares para além da glucose. Estes polissacáridos de reserva (xiloglucanos - amilóides - e galactomananos) acumulam-se a nível das paredes celulares do endosperma, albúmen e embrião e são utilizadas aquando da germinação.

Os monossacáridos são os glúcidos mais simples que, para além de carbono, oxigénio e hidrogénio, possuem, em alguns casos, átomos de azoto e enxofre. Os monossacáridos podem ocorrer, nas células, sob a forma livre, ou ligar-se covalentemente entre si para originar moléculas com diversos graus de complexidade, oligossacáridos (di-, trissacáridos, etc.) e polissacáridos. Muitos oligossacáridos, com três ou mais resíduos de monossacáridos, e bem assim alguns polissacáridos (polissacáridos conjugados), encontram-se associados, quer com péptidos, quer com lípidos. Nestes complexos macromoleculares, os glúcidos podem estabelecer, nomeadamente com as proteínas, ligações fortes, do tipo covalente, ou ligações mais fracas, do tipo iónico e/ou de hidrogénio.

Do ponto de vista estritamente histoquímico, o problema da fixação dos glúcidos põe-se de forma diversa, consoante se pretenda preservar monossacáridos ou polissacáridos simples, ou conjugados.

A elevada difusibilidade dos monossacáridos levanta problemas delicados no que refere à sua preservação nos tecidos. Existe apenas um método que permite preservar e detectar a glucose e outras hexoses e pentoses. Este método baseia-se na precipitação dos monossacáridos pelo metanol, saturado com hidróxido de bário. O complexo açúcar-bário, insolúvel em metanol, é seguidamente transformado num complexo açúcar/prata, por tratamento do material com uma solução alcoólica de nitrato de prata. Esta é, por sua vez, reduzida a prata metálica, pelo formaldeído, o que permite a sua fácil visualização ao microscópio óptico. Os estudos efectuados, sobre a especificidade do teste, revelam que este permite detectar diversas hexoses e pentoses. Contudo, a N-acetilglucosamina, a sacarose e as oses fosfatadas não se revelaram sensíveis ao método, pelos menos nos ensaios *in vitro*.

Em histoquímica, caracterizam-se essencialmente polissacáridos e hidratos de carbono conjugados quer com proteínas (glicoproteínas), quer com lípidos (glicolípidos). A sua detecção é realizada através de reacções que caracterizam um ou mais radicais ou grupos funcionais (tais como grupos 1,2-glicol, grupos carboxilo ou sulfato, etc.), que podem pertencer a diferentes classes de hidratos de carbono ou a substâncias não glucídicas. Deste modo, há necessidade de efectuar reacções múltiplas para distinguir as diferentes classes e reacções de controlo para determinar a especificidade dos métodos de detecção escolhidos.

O estudo histoquímico dos polissacáridos baseia-se em quatro tipos de reacções: a) Reacções ligadas à presença do grupo *vic*-glicol (-CHOH-CHOH) ou grupos aparentados; b) Reacções ligadas à presença de grupos ácido (éster sulfúrico -OSO₃H e carboxilo -COOH), o que permite a distinção entre polissacáridos ácidos e polissacáridos neutros, c) Reacção do grupo hidroxilo (-OH); d) Métodos de digestão enzimática. De entre os diferentes métodos incluídos em cada um dos grupos, a Reacção Ácido Periódico-Reagente de Schiff (PAS) e os métodos de digestão enzimática são os mais relevantes. Pela sua larga utilização, a Reacção Ácido Periódico-Reagente de Schiff será tratada com maior detalhe.

2.1. EM LUZ VISÍVEL

2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados

Estas reacções permitem detectar, para além de polissacáridos e mucoproteínas neutras, também hidratos de carbono de natureza ácida.

Reacção Ácido Periódico-Reagente de Schiff

A técnica do PAS (*Periodic Acid Schiff*) é das mais utilizadas na caracterização geral de polissacáridos.

1ª Fase. Por tratamento com Ácido Periódico (HIO_4), os compostos com dois ou mais grupos $-\text{OH}$ em carbonos vicinais (1,2-glicol = *vic*-glicol, ou α -glicol, $-\text{CHOH}-\text{CHOH}$) são oxidados com ruptura das ligações carbono-carbono e consequente formação de dois carbonilos aldeídicos (Fig. 7).

Embora a oxidação dos 1,2-glicol seja facilitada pela configuração *cis* dos grupos hidroxilo, a configuração *trans* não põe dificuldades, porquanto se verificam alterações conformacionais durante a reacção. A oxidação com o ácido periódico ocorre, igualmente, quando o substituinte do carbono alfa é uma amina primária, secundária, ou um grupo carbonilo (aldeído ou cetona) (Fig. 8), formando-se neste caso um só grupo aldeído.

A acção oxidante do ácido periódico não se limita aos grupos já mencionados, também os grupos 1,2-metoxilo e os 1,2-dicetona ($-\text{CO}-\text{CO}-$) são igualmente sensíveis, não se formando, neste caso, grupos aldeído. O tempo de reacção com o ácido periódico deve ser reduzido ao mínimo indispensável, não devendo exceder por norma os 10 min, uma vez que se torna necessário impedir a oxidação ulterior dos aldeídos nos correspondentes ácidos carboxílicos. Se tal acontecer, a reacção histoquímica é inconsequente, pois não se forma o complexo corado com o Reagente de Schiff. Os aldeídos endógenos livres, que reagem do mesmo modo com o Reagente de Schiff, originando falsas localizações, podem ser previamente bloqueados com dimedona (5,5-dimetilciclohexano-1,3-diona) (Fig. 9), ou reduzidos com tetrahidreto borato de sódio. A dimedona estabelece ligações com os aldeídos, de tal forma que duas moléculas de dimedona bloqueiam um grupo aldeído. O tetrahidreto borato de sódio é um redutor fraco, que reduz apenas os carbonilos nos correspondentes álcoois.

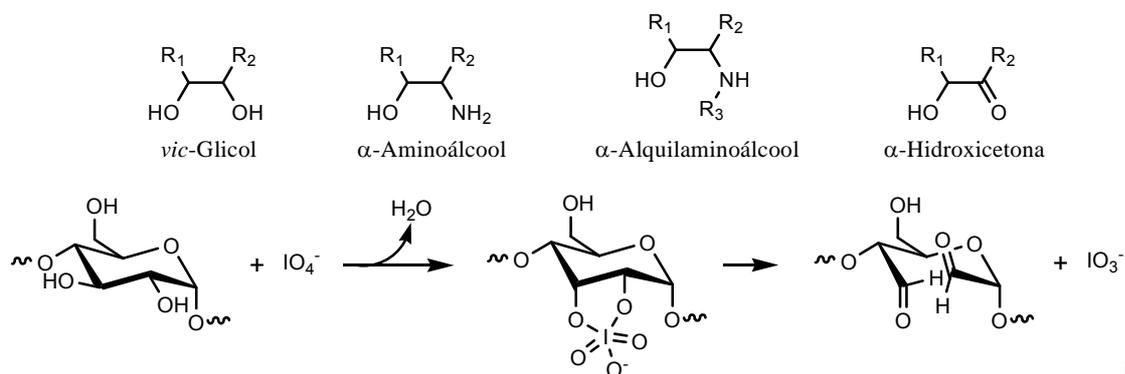


Fig. 7

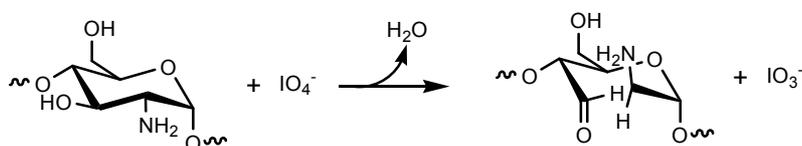


Fig. 8

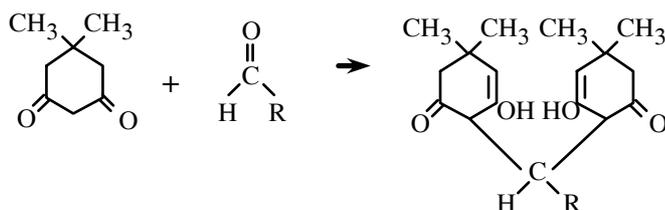


Fig. 9

Para visualizar histoquimicamente os grupos aldeído, formados pela acção do ácido periódico (sensibilidade da reacção PAS), estes têm de existir em concentração elevada para serem revelados pelo Reagente de Schiff, dando origem a um produto intensamente corado. É ainda necessário que se mantenham covalentemente ligados ao resto da molécula e não difundam durante a reacção. Tal facto nem sempre se verifica, o que explica que compostos, que de acordo com a sua constituição molecular, deviam dar uma reacção PAS positiva, sejam PAS negativos.

2ª Fase. Numa segunda etapa, os aldeídos formados pela acção do ácido periódico condensam com a fucsina do Reagente de Schiff, formando um complexo corado (Fig. 10).

Durante a preparação do Reagente de Schiff, a fucsina reage com o metabissulfito de sódio, e, em consequência de alterações na estrutura da sua molécula, em particular no grupo quinonóide, obtém-se uma solução incolor. A fucsina do Reagente de Schiff, ao reagir com os dialdeídos readquire o grupo quinonóide, originando-se um produto de reacção corado.

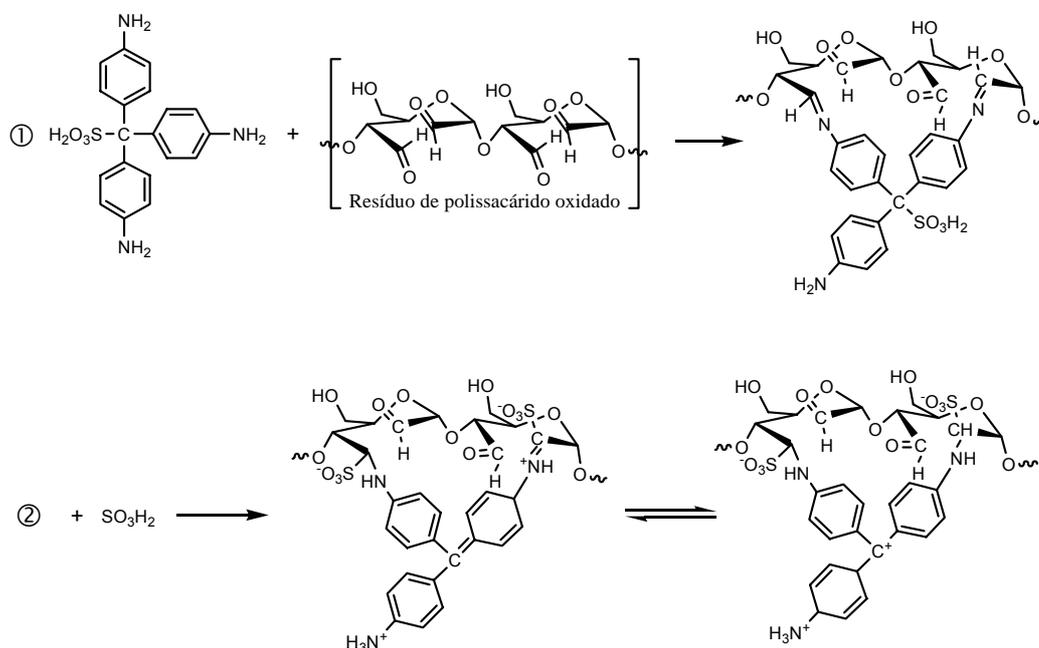


Fig. 10

Especificidade histoquímica. Na interpretação dos resultados da reacção é importante considerar os resultados positivos e os negativos. Embora os métodos utilizados permitam, em geral, visualizar os grupos 1,2-glicol dos polissacáridos, há excepções que não podem ser ignoradas. A maioria dos polissacáridos (Fig. 11, intervalo [1]) reage positivamente ao teste, contudo há polissacáridos (Fig. 11, intervalo [2]), como por exemplo a calose e todos os hidratos de carbono com ligações 1,3 que não são sensíveis. Verifica-se ainda, que alguns compostos de natureza não glucídica (Fig. 11, intervalo [3]), nomeadamente lípidos, dão reacção positiva.

[1] *Polissacáridos com reacção positiva:* Os compostos detectados possuem grupos *vic*-glicol livres. Quanto mais regulares e menos ramificadas forem as cadeias polissacarídicas, mais intensa é a reacção (ex., amilose no amido). A ramificação reduz o número de grupos *vic*-glicol disponíveis e, quando a molécula é compacta, como a celulose cristalina, só os grupos exteriores podem reagir. De um modo geral, verifica-se que o reagente Schiff difunde livremente apenas através de interstícios com diâmetro superior a 1.2nm.

[2] *Polissacáridos com reacção negativa*: Quando grupos *vic*-glicol não estão acessíveis, devido a numerosas ramificações laterais ou substituições, a reacção é fraca. Se no polissacárido existirem ligações 1,3-glucano, a reacção não ocorre.



Fig. 11

[3] *Compostos não polissacarídicos com reacção positiva*: Certos ácidos gordos e polipéptidos sofrem oxidação pelo ácido periódico, reagindo positivamente ao teste PAS. A situação é problemática quando se estudam estruturas que possuem glicoproteínas ou glicolípidos.

Estas limitações não reduzem o valor do método, reforçam apenas a importância de ter sempre em conta o mecanismo da reacção e o tipo de composto(s) em estudo. O estudo químico das reacções demonstrou que os únicos grupos reactivos são os grupos: 1,2-glicol, 1-hidroxi-2-amino, 1-hidroxi-2-alquilamino, α -hidroxialdeído e α -hidroxicetona. Com base nestes dados é difícil estabelecer uma lista completa das substâncias susceptíveis de serem detectadas histoquimicamente em secções de tecidos animais ou vegetais, normais ou patológicos. É absolutamente indispensável efectuar controlos que permitam avaliar a especificidade do teste, tais como, bloqueio de grupos químicos reactivos, extracções selectivas, e omissão ou modificação de passos críticos do método.

Reacções de controlo de especificidade: A especificidade da reacção pode ser controlada de duas maneiras: a) Por bloqueio da reacção, com o objectivo de controlar a especificidade geral da reacção, ou b) Por verificação da natureza glucídica de compostos PAS-positivos para eliminar certas substâncias lipídicas complexas (glicolípidos, fosfolípidos e lipopigmentos) susceptíveis de darem uma reacção PAS-positiva.

a) Reacções de bloqueio

Bloqueio dos grupos *vic*-glicol (antes da acção do agente oxidante)

Os grupos hidroxilo (-OH) dos *vic*-glicol podem ser esterificados com anidrido acético ou cloreto de benzoilo. O tratamento do material com uma mistura de anidrido acético-piridina ou cloreto de benzoilo-piridina leva à formação dos correspondentes ésteres. Esta reacção, que decorre em tempo variável consoante a temperatura (Fig. 12a), impede o desenvolvimento normal da reacção histoquímica. Os ésteres dos *vic*-glicóis não são susceptíveis à oxidação pelo ácido periódico. A reacção de esterificação é reversível quando o material é tratado com soluções diluídas (0.1N) de HCl, KOH, NaOH ou álcool amoniacal (Fig. 12b). Contudo, os diferentes hidratos de carbono não reagem de forma constante e idêntica à esterificação e, por outro lado, a esterificação seguida de saponificação pode interferir na reacção PAS subsequente.

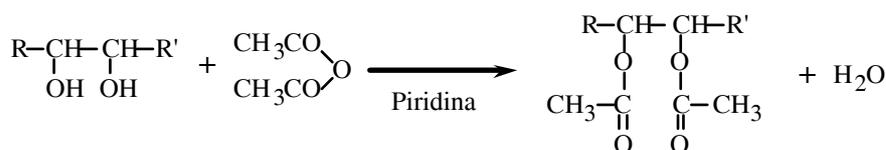


Fig. 12a

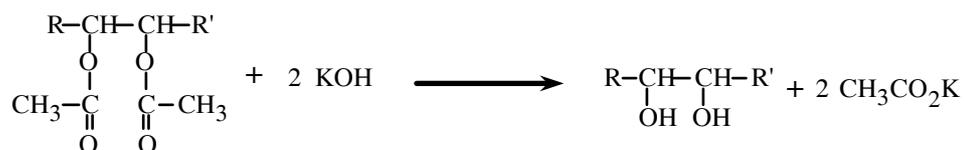


Fig. 12b

Os vic-glicóis podem ainda ser bloqueados por tratamento prolongado com álcool metílico. O mecanismo da metilação é incerto e o seu interesse é, por isso, limitado.

Bloqueio dos grupos aldeído (antes da visualização pelo Reagente de Schiff)

É possível impedir a visualização dos aldeídos formados por oxidação dos grupos *vic*-glicol, através da acção de agentes de bloqueio dos grupos aldeído, tais como, a dimedona (durante toda a noite), a hidroxilamina (tratamento eficaz durante 1 a 3h a pH 4.5-4.7), a fenilhidrazina (bloqueio rápido e completo), entre outros. Os aldeídos podem também ser reduzidos a álcoois por tratamento com tetraidreto borato de sódio (30 min).

b) Verificação da natureza glucídica de substâncias PAS-positivas

O material não fixado, pode ser sujeito a extracções sucessivas com acetona, para eliminar a possibilidade de algumas substâncias lipídicas darem reacção PAS-positiva (método muito destrutivo).

2.1.2. Caracterização diferencial dos hidratos de carbono

Existem diversos métodos para a caracterização diferencial dos glúcidos, nomeadamente dos heterósidos, baseados na afinidade dos seus grupos ácidos para os corantes básicos. Dos vários corantes disponíveis, o Azul de Alciano é, pela simplicidade do método, o corante básico mais utilizado na detecção destas substâncias. Merecem ainda destaque alguns outros reagentes, frequentemente utilizados na detecção de polissacáridos e/ou moléculas aparentadas.

a) Polissacáridos ácidos

Azul de Alciano

O Azul de Alciano, utilizado em histoquímica, é a forma solúvel de uma ftalocianina cúprica substituída (Fig. 13). Embora o mecanismo da coloração tenha sido alvo de alguma discussão, actualmente não parecem existir muitas dúvidas sobre a participação dos grupos isotiourónio do corante neste processo.

À semelhança de outros corantes básicos, a afinidade do Azul de Alciano para os polissacáridos ácidos depende do pH do veículo do corante. Neste contexto, é possível determinar a natureza dos grupos funcionais responsáveis pela retenção do corante, sempre que se trabalha em condições de pH controlado. Assim, ao utilizar-se uma solução corante a pH 2,4-2,6, a alcianofilia registada pode dever-se à presença de grupos carboxilo, fosfato e/ou sulfato. No entanto, se o pH for inferior ao pK dos grupos carboxilo e fosfato (pH 1,0), é muito provável que a coloração se deva à presença de grupos sulfato, os quais são ionizáveis, mesmo a este valor de pH. Importa, todavia, realçar que na prática histoquímica, a interpretação da basofilia, em função do pH, é uma tarefa delicada, pois não é possível avaliar as alterações verificadas nos grupos reactivos, durante a manipulação do material. Para além disso, outras substâncias com grupos

aniônicos, nomeadamente os ácidos nucleicos e as proteínas, podem igualmente fixar o corante.

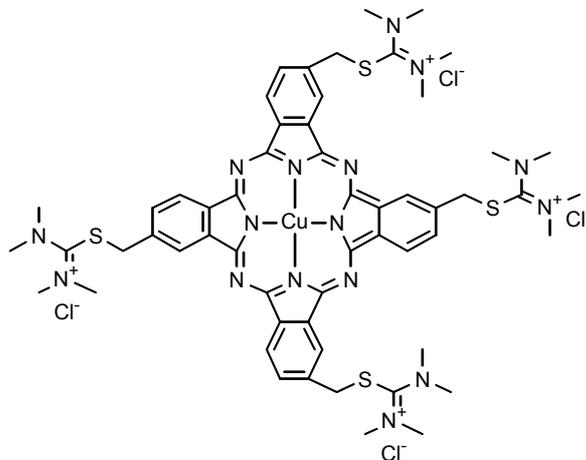


Fig. 13

b) Amido

Lugol

O Lugol é constituído por Iodeto de Potássio (KI), um sal iónico, que provoca a ruptura das pontes de hidrogénio e a consequente separação das várias unidades de glucose que constituem a macromolécula de amido. O KI permite, desta forma, que o iodo se acumule na molécula de amido.

c) Pectinas

Vermelho de Ruténio

O Vermelho de Ruténio é um composto catiónico hexavalente que, *in vitro*, na ausência de Tetróxido do Ósmio reage com substâncias ácidas de natureza muito diversa. É utilizado em histoquímica na detecção de pectinas e de mucilagens vegetais. Nas Angiospérmicas a maioria das mucilagens vegetais são ácidas, derivadas dos ácidos urónicos (glucorónico e galactóronico).

Vários autores sugerem o emprego de corantes metacromáticos para distinguir polissacáridos ácidos de polissacáridos neutros. Do ponto de vista histoquímico, a caracterização diferencial dos glúcidos, por meio de corantes metacromáticos, deve ser cautelosa. A metacromasia, como já foi anteriormente referido, não caracteriza nenhum composto, nem nenhum grupo funcional particular, além de que é um fenómeno estritamente dependente da elevada densidade de carga à superfície do cromótopo. As pectinas, por exemplo, que possuem graus de esterificação dos resíduos de ácido galacturónico da ordem dos 30%, podem não revelar metacromasia, se os grupos aniônicos não ocorrerem com a periodicidade adequada. A ausência de metacromasia, não nega, só por si, o carácter ácido dos polissacáridos.

2.2. EM UV

a) Polissacáridos ácidos

Laranja de Acridina

Vários reagentes do tipo Schiff são obtidos por adição de anidrido sulfuroso (SO) a soluções

aquosas de corantes básicos da série aminoacridina. A Acriflavina e o Laranja de Acridina têm sido recomendados por alguns autores como eficientes substitutos da fucsina básica na coloração de PAS. A coloração com Laranja de Acridina, um fluorocromo metacromático catiónico, permite, por exemplo, distinguir DNA, que emite fluorescência de cor verde, de RNA, DNA desnaturado e polissacáridos ácidos, que emitem fluorescência de cor vermelha.

b) β -Glucanos

Calcoflúor

O Calcoflúor é um fluorocromo comercialmente usado, como agente branqueador, no fabrico de detergentes.

Em histoquímica tem sido utilizado com sucesso para detectar β -glucanos. Quando irradiado com UV o complexo calcoflúor/ β -glucano fluoresce intensamente de azul.

c) Calose

Azul de Anilina

O Azul de Anilina induz, em luz azul a baixa concentração, uma fluorescência amarela muito intensa em áreas da parede ricas em calose. Embora o Azul de Anilina se ligue de uma forma fraca a uma grande variedade de β -1,3 e β -1,4 glucanos, a intensa fluorescência observada, em áreas da parede ricas em calose, pode dever-se à rápida penetração do fluorocromo nestas regiões da parede. Contudo, a natureza exacta desta reacção não foi ainda estabelecida.

3. DETECÇÃO DE MUCILAGENS E MUCOPOLISSACÁRIDOS ÁCIDOS

As mucilagens, ou gomas vegetais, são substâncias de natureza polissacarídica que, quando dispersas em água, intumescem para formar géis, dispersões pegajosas ou soluções viscosas. As propriedades viscoso-pegajosas variam segundo o grau de hidratação ou com o pH. Os mucopolissacáridos são glucosaminoglicanos (contêm açúcares aminados), com que têm elevada afinidade para a água, que ocorrem em condições fisiológicas, sob a forma de géis mais ou menos viscosos.

3.1. EM LUZ VISÍVEL

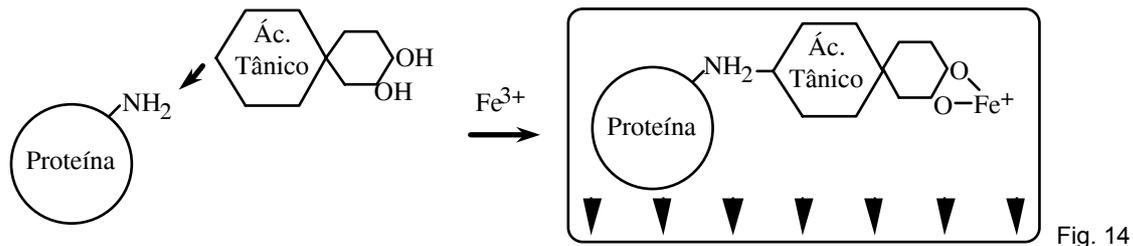
a) Mucilagens

Ácido Tânico/Cloreto Férrio

As mucilagens vegetais são polissacáridos, quase puros, de elevada massa molecular. São polímeros de ácido urónico, bem diferentes das mucilagens animais que são glicoproteínas.

O ácido tânico complexa-se com as aminas das mucilagens, sendo o complexo ácido tânico-amina revelado pelo cloreto férrio. Da reacção resulta um precipitado escuro, que põe em evidência a presença de mucilagens animais. Assim, este teste tem pouca ou nenhuma aplicação nos vegetais.

O emprego de proteases, no fabrico da cerveja, para prevenir a formação de complexos entre as proteínas e os taninos, que precipitam a baixas temperaturas, é o exemplo mais típico deste tipo de reacção (Fig. 14).



Vermelho de Ruténio

O Vermelho de Ruténio parece ser, de acordo com a maioria dos autores, o melhor corante para detectar mucilagens em plantas [vide 2.1.2 c) Pectinas].

b) Mucopolissacáridos ácidos

Azul de Alciano

Como referido anteriormente [vide 2.1.2 a) Polissacáridos ácidos] o Azul de Alciano é um corante vulgarmente utilizado na detecção deste tipo de compostos.

4. DETECÇÃO DE LÍPIDOS

A designação genérica de lípidos abrange um conjunto muito heterogéneo de compostos, que têm em comum uma reduzida solubilidade em água e uma forte solubilidade em solventes orgânicos.

As reservas lipídicas encontram-se, em geral, sob a forma de gotículas dispersas no citoplasma. As ceras e as cutículas são igualmente ricas em compostos lipídicos e seus derivados.

Do ponto de vista histoquímico, as distinções mais importantes dos lípidos, são entre lípidos hidrófobos/hidrófilos e lípidos em estado sólido/estado líquido. As propriedades das moléculas de lípidos determinam o seu comportamento preferencial por solventes orgânicos ou aquosos. Alguns fosfolípidos, por exemplo, têm propriedades mais polares o que implica que sejam miscíveis em água, enquanto que as ceras e os ésteres de glicerol ou de colesterol apresentam uma predominância de grupos não polares o que os torna hidrófobos. Por outro lado, lípidos com um ponto de fusão próximo de 37 °C podem cristalizar à temperatura ambiente e, portanto, não reagem às colorações como o fariam *in vivo*. Os triglicéridos, os lípidos mais abundantes nos animais e plantas, são hidrófobos e sudanofílicos, excepto quando cristalinos.

De todos os grandes grupos de compostos detectados histoquimicamente, os lípidos parecem ser os mais sujeitos a artefactos. A maioria dos lípidos não apresenta *in vivo* o mesmo comportamento que *in vitro*. Por outro lado, *in vivo*, estão, em muitos casos, conjugados com proteínas e hidratos de carbono. O processo de fixação pode ainda alterar a solubilidade dos lípidos, o que implica a alteração da sua reacção aos reagentes. Depósitos de cálcio, por exemplo resultantes da fixação com Formol-Cálcio, podem também causar artefactos, já que em técnicas em que se utilizam sais de metais pesados (Co⁺⁺ e Pb⁺⁺), estes são substituídos pelo Ca⁺⁺ levando a uma reacção falsamente positiva. De tudo isto ressalta a necessidade de se efectuarem controlos positivos e negativos. No caso dos controlos positivos, utilizam-se compostos-padrão, que são aplicados numa rodela de papel de filtro que é tratado como o tecido a estudar. Nos controlos negativos procede-se à remoção dos lípidos com acetona ou com uma mistura de clorofórmio, metanol, HCl e água. A extracção com acetona anidra permite a remoção de gorduras

e colesterol, mas não de fosfolípidos. Se a acetona não for anidra os fosfoglicéridos são extraídos juntamente com os lípidos apolares. A mistura clorofórmio, metanol, HCl e água promove uma remoção mais completa dos lípidos, já que a água facilita a dissolução dos fosfolípidos e o HCl quebra as ligações lipoproteicas.

4.1. EM LUZ VISÍVEL

4.1.1. Birrefringência dos lípidos

Os lípidos não podem ser classificados apenas com base nas suas propriedades ópticas, mas, em alguns casos, a observação de uma preparação, corada com *Oil Red*, em luz polarizada, dá informações importantes. Os lípidos sólidos são muito birrefringentes e contrastam com as gorduras, que em fase líquida coram de vermelho.

4.1.2. Detecção geral de lípidos

Os corantes utilizados na detecção de lípidos não possuem auxocromo e, conseqüentemente, não são ionizados, nem ionizáveis. A coloração deve-se a um processo puramente físico, isto é, “os reagentes que coram” apresentam maior afinidade para os lípidos do que para os solventes em que estão dissolvidos, o que significa que o seu coeficiente partição lípido/solvente é elevado. Os compostos utilizados para corar os lípidos por um processo deste tipo designam-se por lisocromos.

Os Sudões são os lisocromos mais utilizados na detecção de lípidos. Contudo, apenas detectam os lípidos que se encontrem em fase líquida à temperatura ambiente. A sudanofilia do lípido depende do seu ponto de fusão, do número de ligações duplas e do comprimento da cadeia carbonada.

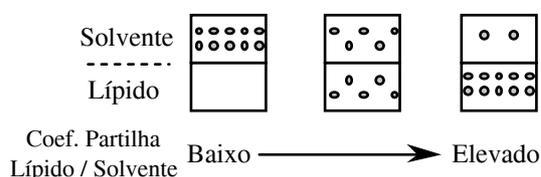


Fig. 15

A elevada tensão superficial de qualquer gordura, na interface lípido-água, fá-la tomar uma forma globular, impermeável aos reagentes aquosos, mas muito permeável aos Sudões. No entanto, a maioria dos Sudões não coram nem os fosfolípidos nem o colesterol livre. Para facilitar a penetração dos Sudões nas gorduras, estas devem ser dissolvidas em solventes orgânicos, que têm de estar suficientemente diluídos para evitar a sua extração. Porém, observa-se sempre uma certa extração, sobretudo de ácidos gordos e fosfolípidos.

Na escolha do solvente para um lisocromo deve ter-se em conta a não dissolução da substância que se pretende corar (os ácidos gordos são extraídos com etanol), a boa dissolução do lisocromo e o coeficiente de partição lípido/solvente deve ser elevado (Fig. 15). Alguns lípidos podem ser estabilizados pela adição de bromo. Os ácidos gordos e as lecitinas, por exemplo, tornam-se resistentes à extração etanólica e o colesterol é convertido num derivado halogenado líquido que é sudanófilo.

Sudões

O Negro Sudão B é considerado, pela maioria dos autores, como o melhor corante para lípidos. É o único Sudão diiminoazóico, i.e, possui dois grupos azóicos e um anel heterocíclico contendo dois átomos de azoto (Fig. 16). Já o Vermelho Sudão IV (Fig. 16) é um corante orto-oxiazóico com um grupo azóico (N=N) em posição *orto* (grupo cromóforo). Ao contrário dos outros Sudões, o Negro Sudão B possui dois componentes distintos, um cora gorduras de azul-negro e o outro, um corante básico, cora os fosfolípidos de cinzento.

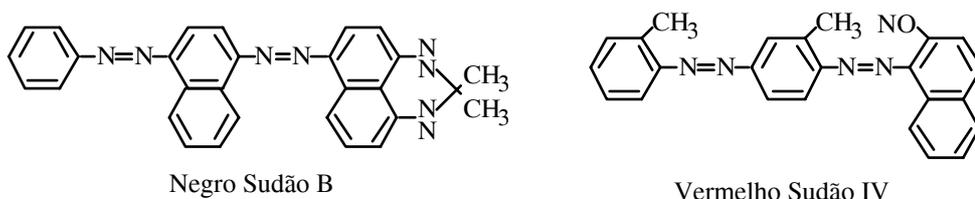


Fig. 16

4.1.3. Detecção diferencial de lípidos

Em muitos casos, é necessário proceder à caracterização mais detalhada dos lípidos, detectados pelos métodos de caracterização geral. Existem diversos métodos histoquímicos que permitem, por exemplo, distinguir lípidos ácidos e/ou de neutros, determinar a sua natureza insaturada e detectar ácidos gordos.

a) Lípidos ácidos e neutros

Sulfato Azul do Nilo

O Sulfato Azul do Nilo é um corante alocromático utilizado na detecção diferencial de lípidos, os lípidos neutros coram de vermelho e os ácidos de azul (Fig. 17). Segundo alguns autores, no caso particular das plantas, os terpenos neutros tendem a corar de rosa e os ácidos resínicos de violeta a azul.

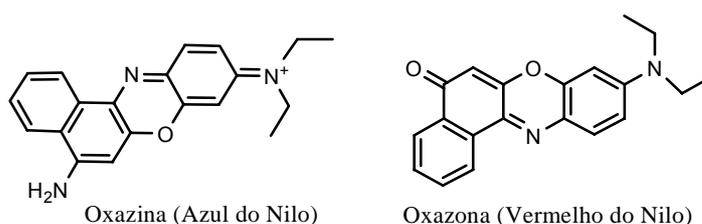


Fig. 17

A coloração diferencial com o Sulfato Azul do Nilo deve-se à presença de duas substâncias, uma oxazona de cor vermelha (lisocromo), que se dissolve nos lípidos neutros (gorduras), e uma oxazina de cor azul, uma base livre que reage com os grupos carboxilos dos ácidos gordos livres e com os resíduos de ácido ortofosfórico dos fosfolípidos. É importante realçar, que a coloração azul não é específica dos lípidos ácidos, pode ser também devida à reacção da oxazina com quaisquer outros compostos basófilos presentes na célula.

A coloração roxa, que frequentemente se obtém por aplicação deste teste, deve-se à presença de uma mistura de lípidos nos tecidos. Neste caso, devem-se extrair previamente os ácidos gordos com acetona.

Convém não esquecer, que em material fixado com Formol-Cálcio, a acetona não retira os ácidos gordos, já que os sabões de cálcio são insolúveis e coram tal como os fosfolípidos.

b) Lípidos insaturados

Tetróxido de Ósmio

O OsO₄ pode ser utilizado na detecção de lípidos insaturados. A presença de ligações duplas (C=C) nos ácidos gordos é evidenciada pelo OsO₄, o qual é reduzido, formando um composto negro de ósmio (Fig. 18).

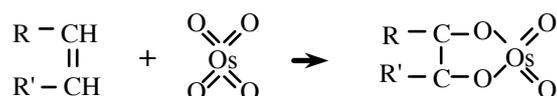


Fig. 18

O OsO₄, não detecta especificamente lípidos. Com efeito, o OsO₄ pode reagir com outros grupos funcionais como por exemplo álcoois, tióis, aminas, aldeídos e cetonas. Por exemplo o OsO₄ reage rapidamente com *orto*-dihidroxifenóis (Fig. 19). Deste modo, o OsO₄ é apenas utilizado para detectar lípidos insaturados quando, por outro método, a presença de lípidos já foi revelada.

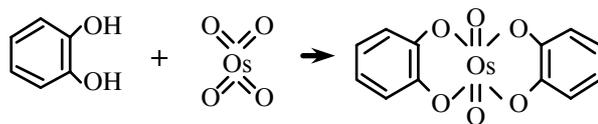


Fig. 19

c) Ácidos gordos

Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico

Os métodos de detecção histoquímica de ácidos gordos livres baseiam-se todos no emprego de metais pesados. Na generalidade dos métodos, o material é tratado com acetato de cobre que, reagindo com os ácidos gordos livres, forma sabões cúpricos que são, ulteriormente, revelados por procedimento adequado. Dos diversos reagentes empregues para este fim, o ácido rubeânico (ditioamida) é o que dá resultados melhores e mais consistentes. Os iões metálicos que não formam ligações com os ácidos gordos são eliminados pelo EDTA (etileno diamina tetracética), sendo os fixados, revelados pelo ácido rubeânico. Podem ocorrer reacções falsamente positivas, quando os depósitos de cálcio e de ferro são substituídos pelo cobre.

4.2. EM UV

Vermelho Neutro

O Vermelho Neutro, como fluorocromo para lípidos, induz uma fluorescência amarela ou azul esverdeada, que depende da composição dos diferentes tipos de lípidos.

5. DETECÇÃO DE TERPENÓIDES

Os isoprenóides ou terpenóides, apesar do seu carácter lipídico, são aqui tratados à parte, não só por desempenham uma grande variedade de funções, mas também por constituem uma das classes de metabolitos com vasta distribuição nas plantas. Os terpenóides acumulam-se preferencialmente em estruturas glandulares especializadas (tricomas, idioblastos, canais, bolsas e laticíferos), que secretam misturas mais ou menos complexas de terpenos (como os que ocorrem nos óleos essenciais, nas resinas e no látex), o que torna difícil a sua detecção histoquímica.

5.1. EM LUZ VISÍVEL

5.1.1. Detecção diferencial de terpenóides

a) Essências e ácidos resínicos

Reagente de Nadi

O Reagente de Nadi é um reagente de preparação extemporânea, uma vez que por mistura dos seus dois componentes (α -naftol e cloridrato de dimetil-*p*-fenilenodiamina) resulta, por oxidação, Azul de Indofenol (Fig. 20).

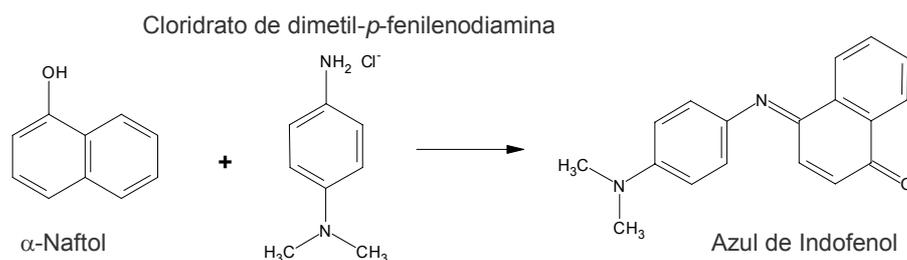


Fig. 20

O Azul de Indofenol, um composto fortemente lipossolúvel, altera a cor por variação do pH, permitindo uma coloração diferencial de essências e ácidos resínicos.

b) Esteróides

Tricloreto de Antimónio

A presença de terpenóides é evidenciada por uma coloração vermelha que ocorre provavelmente devida à quelação do ião antimónio Sb^{3+} pelo aldeído e pelo hidroxilo ligado ao C-7 de alguns terpenóides relacionados com o gossipol (Fig. 21).

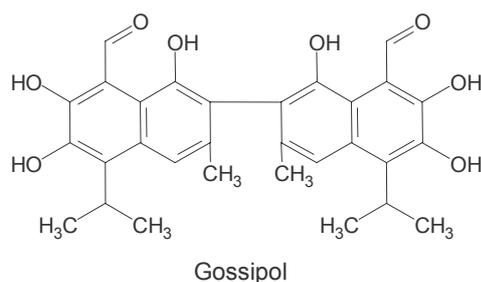


Fig. 21

5.2. EM LUZ VISÍVEL E EM UV

a) Detecção de partículas de borracha

Oil Red O ou Oil Blue N

A borracha, um politerpenóide de elevada massa molecular com cerca de 1500 a 6000 unidades de isopreno, ocorre, sob a forma de partículas, no látex de alguns laticíferos de Angiospérmicas. A sua produção e acumulação são especialmente elevadas em espécies arbóreas tropicais, donde é extraída para fins industriais. Algumas plantas laticíferas produzem, em vez de borracha, um outro hidrocarboneto poli-isoprénico, a gutta, um estereoisómero da borracha. O ácido fórmico coagula as partículas de borracha que são reveladas por estes lisocromos, corando de vermelho em luz visível e com fluorescência vermelho pálido em UV.

5.3. EM UV

a) Detecção de partículas de borracha

Cloreto de Dansil

O Cloreto de Dansil, sulfonato de dimetilaminonaftaleno, reage com os aminoácidos e proteínas dando origem a um complexo secundário fluorescente de cor esbranquiçada. A ocorrência desta fluorescência, em secções a que previamente se extraíram as resinas, os lípidos e as proteínas, permite assumir que se deve à presença de partículas de borracha.

6. DETECÇÃO DE FENÓIS

Designam-se por fenóis ou compostos fenólicos uma grande variedade de compostos químicos que têm em comum um anel aromático ao qual estão ligados um ou mais grupos hidroxilo. As substâncias fenólicas são, dum modo geral, solúveis em água, já que se encontram normalmente glucosiladas, mas podem também apresentar-se sob a forma de agliconas (agliconas flavonólicas, por exemplo) em secretados de plantas com natureza lipofílica.

Alguns compostos fenólicos, como a lenhina e os taninos, estão amplamente distribuídas nas plantas. A lenhina, que confere resistência às paredes das células de esclerênquima e xilema, são polifenóis que resultam da polimerização de três monómeros: álcool coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Fig. 24).

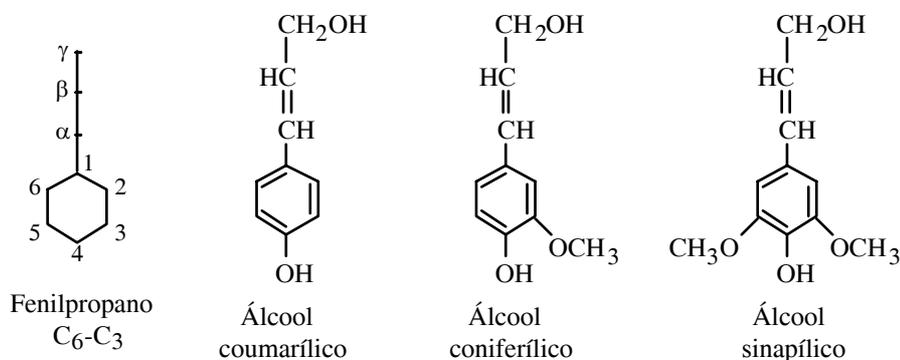


Fig. 24

Os taninos são polifenóis responsáveis pela adstringência dos alimentos e bebidas,

particularmente do chá, café e vinhos. Há dois tipos de taninos, os condensados e os hidrolisáveis. Os condensados, frequentes nas plantas lenhosas, são formados pela polimerização de unidades de flavonóides e como originam, por hidrólise com ácidos fortes, antocianidinas, são muitas vezes designados pro-antocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são polímeros heterogêneos contendo ácidos fenólicos, particularmente ácido gálico, e açúcares simples. São moléculas mais pequenas e podem ser hidrolisados mais facilmente com ácidos diluídos.

6.1. EM LUZ VISÍVEL

6.1.1. Caracterização geral de fenóis

Cloreto de Ferro III

Este é um método clássico para a detecção de fenóis simples. Os *orto*-dihidroxifenóis complexam o Fe^{3+} , formando precipitados cuja coloração pode variar do verde intenso, púrpura, azul a negro (Fig. 25).

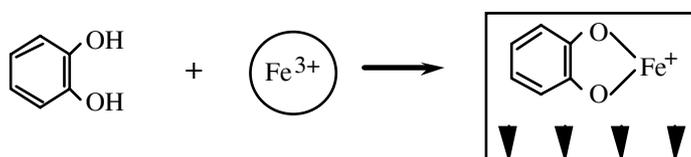


Fig. 25

Dicromato de Potássio

Os grupos $-OH$ livres dos fenóis, condensam com o crómio da mistura reagente, formando um produto castanho-avermelhado.

Diazoreacção

Este método consiste, essencialmente, na formação de um complexo azóico corado, por condensação do fenol com um sal de diazónio, em meio alcalino (Fig. 26).

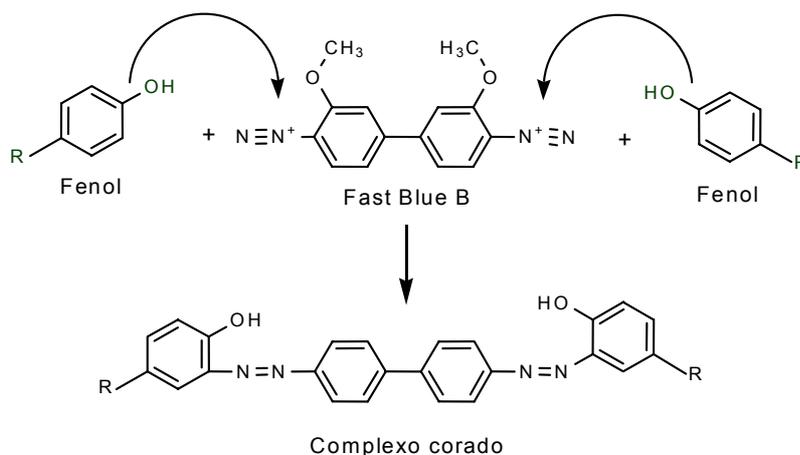


Fig. 26

Tanto o fenol como o sal de diazónio são substâncias incolores, contudo, o produto da reacção é vermelho.

A azoreacção é característica dos compostos fenólicos com um grupo -OH livre e sem substituintes em posição *orto* ou *para*, relativamente ao -OH. Os únicos compostos que podem reagir nas mesmas condições dos fenóis, são os compostos heterocíclicos.

6.1.2. Caracterização diferencial de fenóis

a) Detecção de lenhina

Floroglucinol

A detecção de lenhina, pelo método de Wiesner, baseia-se no facto do Floroglucinol reagir, em particular, com o ácido coniferílico (Fig. 24) dando um cromóforo vermelho em meio clorídrico.

b) Detecção de taninos

Vanilina Clorídrica

O método da Vanilina Clorídrica fundamenta-se na formação de um produto de condensação resultante da reacção dos grupos aldeídicos da vanilina com os fenóis.

6.2. EM UV

A lenhina é autofluorescente, apresentando uma coloração amarela ou amarela-esverdeada característica. Além disso, os compostos fenólicos são todos aromáticos e, como tal, a sua maioria, e em particular os flavonóides, pode ser detectada por indução de fluorescência na banda dos UV.

a) Detecção de flavonóides

Fluorocromos

Segundo alguns autores a utilização de fluorocromos, para a detecção de compostos fenólicos, é não só uma técnica muito sensível, mas também mais específica do que a diazoreacção.

Os flavonóides (Fig. 27) formam quelados com os fluorocromos. Utilizando cloreto de alumínio, acetato de magnésio e acetato neutro de chumbo é possível detectar flavonóides (flavonas) com grupos hidroxilo livres em 3' ou 5' (Fig. 28).

Na presença de acetato de sódio, o ácido bórico é quelado por todos os grupos *orto*-dihidroxilo dos flavonóides, excepto os ligados aos carbonos C5 e C6.

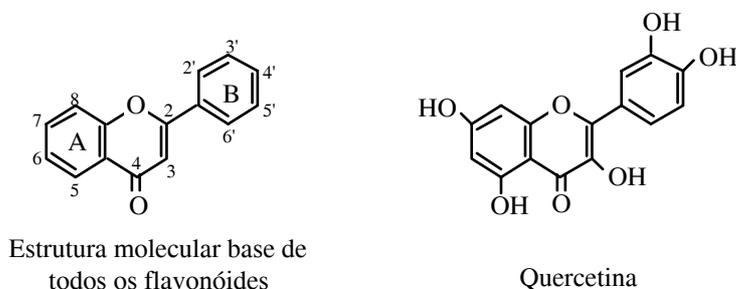


Fig. 27

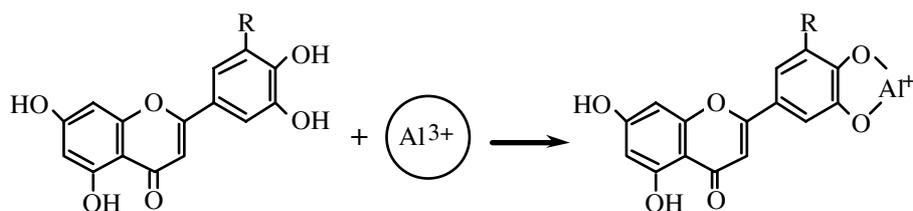


Fig. 28

7. DETECÇÃO DE ALCALÓIDES

Os alcalóides constituem um grupo vasto de metabolitos secundários, que se podem definir genericamente como substâncias básicas com um ou mais átomos de azoto, geralmente fazendo parte dum anel heterocíclico.

Os alcalóides acumulam-se nos vacúolos, particularmente em células epidérmicas e hipodérmicas e laticíferos. Muitas vezes acumulam-se longe do local de síntese, como seja a nicotina, que é sintetizada nas raízes e, depois, translocada e acumulada nas folhas.

Os alcalóides precipitam por acção de bases, de ácidos oxigenados, de sais de metais pesados e de halogéneos, o mesmo sucedendo com outros compostos que possuam grupo básico azotado.

7.1. EM LUZ VISÍVEL

7.1.1. Caracterização geral de alcalóides

Reagente de Dragendorff

De todos os reagentes propostos para a detecção de alcalóides o reagente de Dragendorff é o mais utilizado. Permite detectar o azoto terciário ou quaternário (Fig. 29), e não revela as aminas primárias e secundárias, a não ser que se encontrem em concentração elevada. Outros compostos com carbonilos α,β insaturados ou lactonas reagem positivamente ao Reagente de Dragendorff (Fig. 30). De acordo com alguns autores, compostos com um grupo hidroxilo e uma ligação dupla isolada, ou compostos como as coumarinas, psoralenos, monoterpénos, triterpénos, esteróides e polietilénos podem apresentar reacção positiva a este teste.

Classificação do átomo de azoto

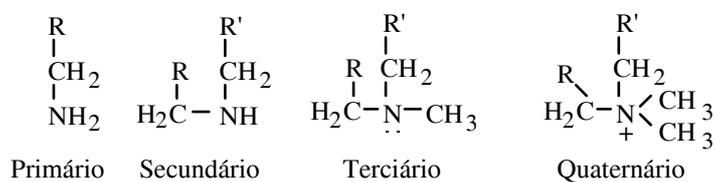


Fig. 29

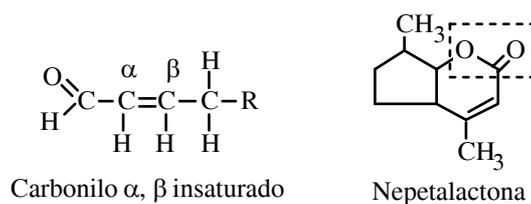


Fig. 30

O reagente de Dragendorff cora a maioria dos alcalóides de laranja-acastanhado, contudo, alguns alcalóides como a boldina, morfina e nicotina perdem essa coloração rapidamente. A cor pode ser intensificada por tratamento com uma solução de nitrito de sódio. Os alcalóides coram então de castanho-escuro (morfina) ou de violeta-acastanhado (atropina), mas a coloração da pilocarpina e nicotina permanece instável.

7.2. EM UV

Alguns alcalóides possuem, quando irradiados com UV, autofluorescência azul, que intensifica em alguns casos com o tempo de irradiação, como a serpentina, quinino, quinidina, cefaleina, emetina, ioimbina, noscapina. Alcalóides, como a cinchonina e a cinchonidina, apresentam fluorescência violeta, após algum tempo de irradiação, outros como a berberina e sanguinarina revelam autofluorescência amarela.

8. MÉTODOS DE COLORAÇÃO DUPLA

A utilização sequencial de dois corantes ou de dois testes histoquímicos (coloração dupla) permite corar em simultâneo e de forma diferencial dois ou mais constituintes celulares de natureza química diversa. Os resultados negativos, que por vezes se obtêm com a aplicação sequencial de colorações comuns em histoquímica, devem-se frequentemente ao facto do primeiro tratamento inactivar ou extrair o(s) composto(s) que seria(m) evidenciados pela segunda reacção.

Algumas duplas colorações, de fácil aplicação mas de reduzida especificidade e sensibilidade, são rotineiramente utilizadas em Anatomia, como a coloração Verde Iodo-Carmim Aluminado, Azul de Astra-Safranina e Azul de Metileno-Vermelho de Ruténio que permitem distinguir paredes celulares lenhificadas, suberificadas ou cutinizadas de paredes pecto-celulósicas. Para além destas colorações, outras como o Azul de Metileno-Azur A-Safranina, a Toluidina ou o PAS-Toluidina são de igual modo usadas em Anatomia, como colorações gerais de material fresco ou incluído em parafina ou resina.

Em secções de material fresco deve-se previamente extrair o conteúdo celular por imersão prolongada em hipoclorito de sódio, ou utilizar, alternativamente, material extraído e/ou diafanizado.

Verde Iodo-Carmim Aluminado e Azul de Astra-Safranina

Com o Verde Iodo-Carmim Aluminado as paredes celulares lenhificadas, suberificadas ou cutinizadas coram de verde enquanto que com o Azul de Astra-Safranina coram de rosa. De igual modo, as paredes pecto-celulósicas coram de rosa com a primeira coloração e de azul, com a segunda.

Azul de Metileno-Azur A-Safranina

O Azul de Metileno-Azur A liga-se aos constituintes basófilos dos tecidos, conferindo-lhes colorações que variam entre o azul e o púrpura, enquanto que a Safranina cora de vermelho as paredes celulares lenhificadas, suberificadas, cutinizadas ou ricas em esporopolenina.

Azul de Toluidina

O Azul de Toluidina é um corante que pertence ao mesmo grupo que o Azur A e o Azul de Metileno (grupo das tiazinas). No método original o corante é dissolvido em Tampão Fosfato 0.1 M pH 6.8, contudo pode ser utilizado outro tampão, sendo apenas crucial manter o pH acima de 4, uma vez que pHs inferiores a intensidade da coloração vermelha, metacromática, é muito reduzida.

PAS-Azul de Toluidina

Frequentemente para realçar a coloração do PAS, para detecção de polissacáridos, pode usar-se uma contra-coloração com o Azul de Toluidina (coloração metacromática)

9. HISTOQUÍMICA EM SECÇÕES SEMIFINAS DE RESINAS EPÓXI

Dos blocos de material biológico, incluído em resina para realização de cortes ultrafinos para microscopia electrónica de transmissão, podem ser feitos cortes mais espessos de 0,5-1µm, secções semifinas, para observação em microscopia óptica. As secções semifinas de resinas epóxi permitem acompanhar, a nível histológico, as células que se estão a estudar em microscopia electrónica de transmissão, podendo ser observadas sem coloração em microscopia de contraste de fase, ou após coloração, em campo claro.

Na sua maioria, os métodos utilizados na coloração de secções semifinas derivam dos usados para coloração de secções de material impregnado em parafina. A coloração e contraste desejados dependem do material e do tipo de resina utilizada, devendo ser otimizados para cada caso em particular.

9.1.1. Detecção de hidratos de carbono**Ácido Periódico - Reagente de Schiff (PAS)**

Como referido anteriormente [vide 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo vic-glicol ou grupos aparentados], o Ácido Periódico - Reagente de Schiff (PAS) é um corante vulgarmente utilizado na detecção deste tipo de compostos.

9.1.2. Detecção de lípidos**Negro Sudão B**

O Negro Sudão B [vide 4.1.2. Detecção geral de lípidos] é um corante de utilização corrente na detecção de lípidos.

9.1.3. Detecção de proteínas**Azul Brilhante de Comassie**

Como referido anteriormente [vide 1.1.2. Coloração de proteínas por ligação do corante a grupos de aminoácidos], o Azul Brilhante de Comassie é um corante vulgarmente utilizado na detecção de proteínas.

II. CITOQUÍMICA: PRINCÍPIOS

A Citoquímica em plantas, tal como outras áreas da Biologia Vegetal, desenvolveu-se a partir de metodologias inicialmente propostas e aplicadas a tecidos animais, nomeadamente de mamíferos, incluindo o próprio Homem. Apenas os métodos desenvolvidos para a caracterização da actividade do malato sintetase foram excepção a esta regra. As plantas, devido às suas características particulares, apresentam, também neste campo de estudo, problemas específicos. Por exemplo, a parede celular constitui uma barreira à penetração de reagentes, sendo um problema difícil de ultrapassar em estudos de imunocitoquímica.

O objectivo da citoquímica é efectuar, *in situ*, reacções químicas específicas, a nível das estruturas celulares, de modo a conhecer a sua composição ou a localizar a actividade das enzimas de determinadas vias metabólicas. Este tipo de aproximação introduz vários problemas, técnicos e metodológicos:

- **Visualização:** pelo menos um dos produtos finais tem de ser opaco aos electrões, i. e., conter um metal pesado
- **Resolução:** o produto final opaco tem de ser insolúvel, e suficientemente fino para permitir uma boa localização ultrastructural, não podendo difundir do local de reacção (risco de reacções falsamente positivas)
- **Acessibilidade:** o reagente deve ser suficientemente permeável para ter acesso às estruturas reactivas
- **Preservação:** as reacções não devem ser agressivas para não haver destruição da organização celular.

Os passos fundamentais dum teste citoenzimológico realizado directamente no material são:

1. Pré-fixação: para preservar a estrutura celular e diminuir a extracção utiliza-se, em geral, o glutaraldeído, evitando-se normalmente a utilização do OsO₄ devido ao seu forte poder oxidante. Contudo, é preciso não esquecer que os fixadores aldeídicos estabelecem ligações cruzadas, imobilizando os constituintes proteicos, nomeadamente das enzimas, o que pode induzir alterações conformacionais das proteínas e diminuição da sua actividade enzimática. Para além disso, outros factores podem igualmente promover, durante a pré-fixação, alterações no comportamento das enzimas:

Duração da fixação: algumas enzimas são demasiado sensíveis e apenas toleram alguns minutos de exposição ao fixador. Na maioria dos casos a fixação não excede 1-2h a baixa temperatura, sendo conveniente que decorra no mais curto período de tempo. Para tornar mais rápida a penetração do fixador utilizam-se muitas vezes misturas de de glutaraldeído e paraformaldeído e permeabilizantes (DMSO), diminuindo-se concomitantemente a espessura do bloco.

Concentração do fixador: o glutaraldeído pode ser usado numa gama de concentrações que varia entre 0.5%-6.0%, sendo a de 1% a mais utilizada, atendendo que as altas concentrações destroem a actividade enzimática por excesso de ligações, e as baixas preservam mal a estrutura celular.

Temperatura: a pré-fixação decorre normalmente a baixa temperatura. Embora as temperaturas elevadas aumentem a velocidade de penetração do fixador e a velocidade das reacções entre este e as enzimas, promovem também a autólise celular e uma maior extracção de compostos.

pH: o pH utilizado é normalmente entre 7.0-7.3, mas depende da espécie e da enzima a estudar, do fixador e do tampão utilizados.

Tampão: a escolha do tampão depende do fixador, da enzima que se pretende estudar e da duração da pré-fixação. Com os fixadores aldeídicos não é aconselhável a utilização de tampões

com grupos amina, já que há reacção entre o tampão e o fixador. No caso da fosfatase desaconselha-se a utilização do Tampão Fosfato, por ser o fosfato o produto de reacção catalizado por aquela enzima. Este tampão também não deve ser usado quando se adiciona Cl_2Ca ao meio, porque se forma fosfato de cálcio que precipita. Os tampões mais utilizados são o Pipes e o Cacodilato.

2. Lavagem: para retirar o excesso de fixador e evitar os precipitados que se podem formar no processamento ulterior, utiliza-se normalmente o tampão que serviu de veículo ao fixador.

3. Incubação: com a incubação promove-se a reacção catalisada pela enzima, fornecendo o substrato apropriado. O produto de reacção é capturado em seguida com a formação de precipitados, geralmente electrodensos ou osmiófilos. Vários factores podem influenciar o correcto desenrolar deste passo:

Temperatura: as baixas temperaturas diminuem a actividade enzimática tornando-a insuficiente para ser detectada. Por este motivo a temperatura mais utilizada é próxima da temperatura ambiente.

pH: o pH deve ser próximo do pH óptimo da enzima a detectar. Por vezes utiliza-se um pH inferior ou superior, de molde a diminuir a difusão do produto não precipitado. Apesar disso, podem surgir problemas como a desnaturação da enzima, solubilização do precipitado ou actividade de outras enzimas que dão origem ao mesmo produto.

Tampão: geralmente os produtos de hidrólise são ácidos pelo que é necessário o uso de um tampão para evitar a inactivação da enzima por desnaturação. Ao seleccionar o tampão há de ter em conta que alguns inibem a actividade enzimática, por exemplo, o malato forma quelados com iões de metais pesados.

Substrato: a concentração de substrato deve ser tal que não interfira com a cinética enzimática (inibição, combinação com o agente de captura).

Controlos: um teste enzimático só tem validade quando acompanhado de controlos adequados, que se obtém quer por utilização de inibidores específicos, por omissão do substrato ou por inactivação das enzimas por aquecimento. Os métodos de extracção, quer químicos, quer enzimáticos, aumentam a possibilidade duma localização correcta e diminuem o número de falsas reacções positivas.

Para além dos factores condicionantes de uma correcta incubação, existe ainda a possibilidade de ocorrerem artefactos:

Por difusão do produto de reacção: devido à baixa velocidade de precipitação, ou por baixa concentração do reagente de captura, por ocorrer uma hidrólise não enzimática do substrato, ou ainda por o produto de reacção se formar em concentrações tais que inibe a enzima ou se liga ao substrato.

Por penetração lenta dos agentes de captura.

4. Lavagem: após a incubação procede-se a várias lavagens para eliminar o excesso do meio de incubação, de forma a evitar a formação de precipitados não específicos entre os componentes do meio de incubação (substrato e agente de captura) e o fixador utilizado na pós-fixação.

5. Pós-fixação: como na maioria dos casos a pré-fixação é de curta duração, torna-se necessária uma pós-fixação para completar a estabilização da ultraestrutura e da marcação citoquímica.

6. Lavagem, desidratação, impregnação e seccionamento: semelhante ao do processamento de material para microscopia electrónica de transmissão. O seccionamento é muitas vezes difícil devido à dureza dos precipitados formados, o que leva à obtenção de cortes vibrados e faça com as facas tenham curta duração.

Referimo-nos, até agora, a reacções citoquímicas efectuadas directamente no material, em que o espécime é tratado antes ou depois da fixação aldeídica e se evita a utilização do OsO_4 . Uma

das grandes limitações desta metodologia é a falta de protecção do material aquando da incubação, a outra, é o risco de deslocação, durante a desidratação e inclusão, dos produtos de reacção, e a sua possível adsorção a locais diferentes dos de formação. Por estes motivos, a citoquímica sobre cortes colocados em grelhas é muitas vezes preferida. A barreira principal neste caso é a natureza hidrófoba das resinas, que diminuem a acessibilidade dos reagentes às estruturas celulares. Este óbice pode ser reduzido, incluindo o material em resinas hidrófilas ou utilizando criotécnicas.

As técnicas citoquímicas em grelha não requerem equipamento especial, a não ser a utilização de grelhas de ouro para recolher os cortes ou de uma ansa para transferi-los de recipiente para recipiente de acordo com o método que se está a usar.

A gama de detecções citoquímicas passíveis de serem actualmente aplicadas em microscopia electrónica de transmissão é extremamente variada.

1. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

Os métodos para a detecção citoquímica de proteínas são, em geral, pouco específicos. Dos diversos métodos propostos, apenas três revelam alguma selectividade.

1.1. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO GERAL

O método para a detecção de proteínas, por via indirecta, utilizando a acroleína como fixador, foi inicialmente desenvolvido para microscopia óptica e posteriormente adaptado à microscopia electrónica. Como todos os aldeídos α,β -insaturados, a acroleína é susceptível de sofrer uma reacção de adição nucleófila sobre o átomo de carbono etilénico- β , em vez do carbono carbonílico (Fig. 31). O grupo aldeído deixado livre, pode então ser revelado, com uma solução de nitrato de prata amoniacal, directamente sobre os cortes montados em grelha.

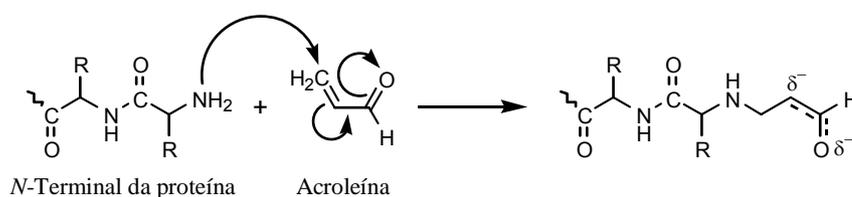


Fig. 31

Em termos de especificidade, este teste não deixa dúvidas quanto à possibilidade das proteínas reagirem com a acroleína, através dos grupos, tiol, amina, imidazol ou fenol, e serem detectadas em microscopia electrónica. No entanto, quer os fosfolípidos, com grupos amínicos livres, quer os polissacáridos, com açúcares aminados, quer ainda outros compostos nucleófilos, podem reagir com o fixador e serem fonte de falsas localizações positivas.

O segundo método para a caracterização geral de proteínas, em microscopia electrónica, utiliza o ácido fosfotúngstico, a pH ácido (pH 4,0-5,0). Nestas condições, a contrastação parece dever-se à ligação dos polianiónicos do fosfotungstato aos grupos amínicos das proteínas, carregados positivamente. Este mecanismo de reacção hipotético é apoiado pela ausência de contrastação em material previamente acetilado ou sujeito a digestão enzimática. Em todo o caso, a ausência de marcação em material acetilado não pode constituir prova da natureza proteica das estruturas reactivas, porquanto a acetilação é uma reacção que bloqueia todos os grupos amínicos, independentemente de estarem ligados, ou não, a proteínas.

1.2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DE GRUPO

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de detectar, citoquimicamente, o grupo tiol dos resíduos da cisteína. No entanto, nenhum método de aplicação geral foi até agora desenvolvido. Esta dificuldade parece dever-se ao facto de o grupo tiol se encontrar em pequena concentração em muitas proteínas e, além disso, poder ser mascarado, quer pelo fixador, quer pelos componentes da resina de inclusão.

Dos diversos métodos propostos, o que utiliza o complexo de metenamina de prata, é o que dá melhores resultados. Embora se obtenham depósitos electrodensos, de prata reduzida, em estruturas celulares ricas em cisteína, não é possível excluir a hipótese da reacção se dever, também, ao grupo dissulfeto da cistina. Com efeito, a alquilação com iodoacetato, reagente que bloqueia o grupo tiol, apenas reduz parcialmente a reacção. Por outro lado, a redução das ligações dissulfeto da cistina, com benzilmercaptano, seguida de alquilação com iodoacetato, elimina por completo a formação de depósitos electrodensos.

O método da metenamina de prata pode ser considerado específico para a detecção citoquímica de proteínas ricas em enxofre, sempre que a formação dos depósitos electrodensos seja inibida por reacções de redução e alquilação e, desde que se assegure, que não resultam da revelação dos grupos carbonilo (aldeído), introduzidos pela fixação, ou da quelação dos iões de prata, por compostos de natureza química diversa.

Visualização de Ribo- e Desoxirribonucleoproteínas pelo método da Contrastação Regressiva

Este método permite distinguir zonas com desoxirribonucleoproteínas (DNP) de zonas com ribonucleoproteínas (RNP). Embora não se conheça em pormenor o mecanismo desta contração, sabe-se que o urânio ligado às RNP é menos susceptível de extracção pelo EDTA do que o ligado às DNP.

Detecção da actividade das fosfatases

As fosfatases constituem um vasto grupo de enzimas que têm em comum a capacidade de hidrolizar uma grande diversidade de ésteres fosfóricos. Este método baseia-se na formação de precipitados insolúveis, resultantes da reacção de catiões metálicos presentes no meio de incubação (chumbo, cálcio e cério) com os iões fosfato libertados, por hidrólise enzimática, dos vários fosfatos orgânicos que servem de substracto.

Detecção da actividade de oxidases

A 3,3'-diaminobenzidina (DAB) é utilizada como reagente para a detecção inframicroscópica das oxidases. O método baseia-se na formação de um composto insolúvel, por polimerização oxidativa e consequente ciclização, resultante da actividade da enzima. Este composto, em presença de OsO₄ origina um produto electrodense.

Detecção da actividade da celulase

As celulasas são complexos multienzimáticos que hidrolizam os glucanos com ligações $\beta(1-4)$. Este método baseia-se na redução dos sais de cobre, pelos açúcares redutores libertados pela acção das enzimas, o que origina um precipitado electrodense de óxido de cobre.

2. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE HIDRATOS DE CARBONO

2.1. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO GERAL

Detecção de Polissacáridos (PATAg)

Diversos métodos têm sido sugeridos para a detecção inframicroscópica de glúcidos. De entre eles, o teste PATAg (ácido periódico/tiosemicarbazida ou tiocarbohidrazida/proteínato de prata), é dos mais utilizados para a caracterização geral de oligo- e polissacáridos. Este teste, que é efectuado directamente sobre secções ultrafinas, é uma adaptação, para microscopia electrónica, do teste clássico PAS e baseia-se na detecção, pelo proteínato de prata, da tiosemicarbazida (TSC) ou da tiocarbohidrazida (TCH) ligada aos carbonilos, formados pela oxidação dos *vic*-glicóis dos resíduos monossacáridicos (Fig. 32).

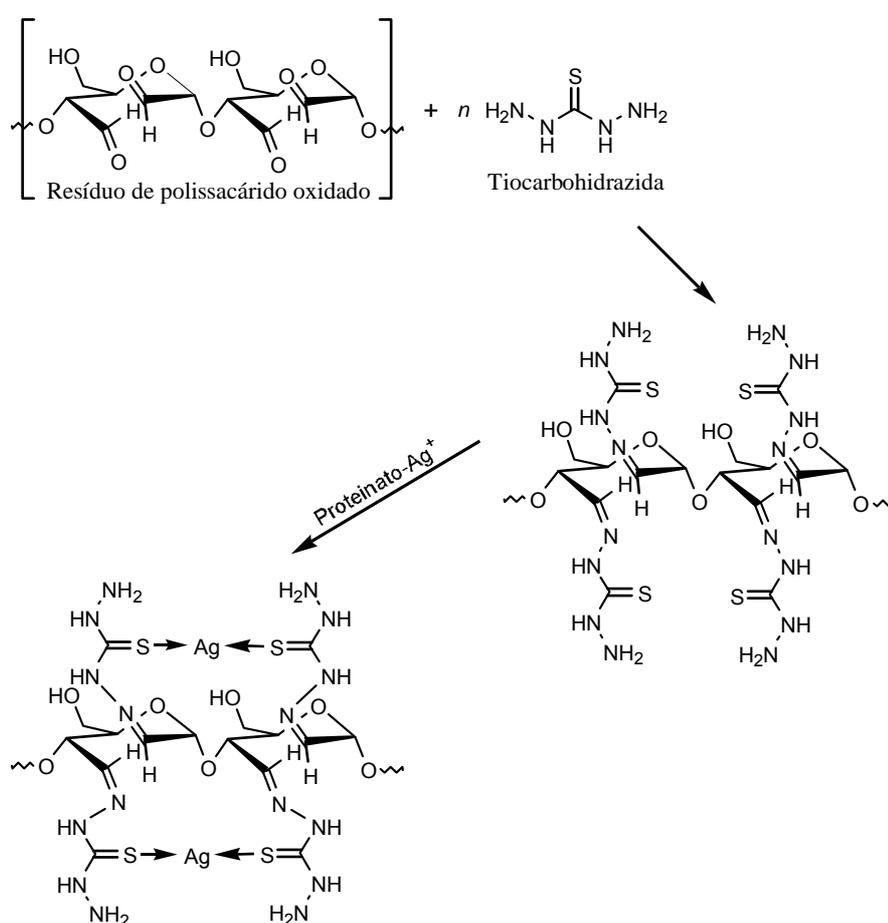


Fig.32

A prata reduzida permite visualizar os locais de ligação da tiocarbohidrazida aos carbonilos dos polissacáridos oxidados. Este teste é tido como muito específico para as substâncias PAS-positivas. No entanto, podem verificar-se falsas localizações positivas, pela reacção da TSC ou da TCH, quer com metais pesados ligados às estruturas celulares, quer com carbonilos endógenos (aldeídos ou cetonas) ou introduzidos durante a fixação. Artefactos desta natureza podem ainda dever-se à presença de proteínas ricas em cistina e/ou cisteína (o grupo tiol reduz a prata do proteínato de prata), à adsorção não específica da prata ou à presença de tetróxido de ósmio. É importante que as secções não tenham quaisquer vestígios deste agente fixador, pelo que se

aconselha a utilização de material fixado só com glutaraldeído. Caso se tenha utilizado uma dupla fixação o ósmio reduzido deverá ser convenientemente retirado com peróxido de hidrogénio ou ácido periódico.

Apesar do grande número de artefactos que poderão causar falsas localizações positivas, este teste é de grande confiança e sensibilidade quando acompanhado de controlos adequados. Os aldeídos endógenos e os introduzidos pela fixação devem ser bloqueados ou, de preferência, reduzidos antes da oxidação com ácido periódico. Também os grupos tiol podem ser alquilados, antes da oxidação com ácido periódico. Para além disso, a prata adsorvida, uma vez que não se encontra na sua forma metálica, pode ser retirada das secções com tiosulfato de sódio. Reveste-se igualmente de grande importância o bloqueio ou a redução dos aldeídos formados por oxidação dos *vic*-glicóis, para que se possa avaliar a especificidade geral desta reacção. De uma forma geral, todas as considerações feitas a propósito do teste PAS são válidas também para o teste PATAg.

2.2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DIFERENCIAL

Os polissacáridos ácidos podem ser também detectados em microscopia electrónica utilizando, por exemplo, Ferro Coloidal. Neste caso, o teste pode ser efectuado, quer “en bloc” após a fixação, quer directamente sobre as secções recolhidas na grelha. O produto de reacção electrodenso parece resultar da interacção iónica das partículas de ferro coloidal, carregadas positivamente, com os grupos aniónicos dos polissacáridos ácidos (Fig. 33). Os resultados obtidos são consistentes e reprodutíveis e o teste parece ser altamente específico para os polissacáridos ácidos, quando efectuado a pH 1,2-2,4.

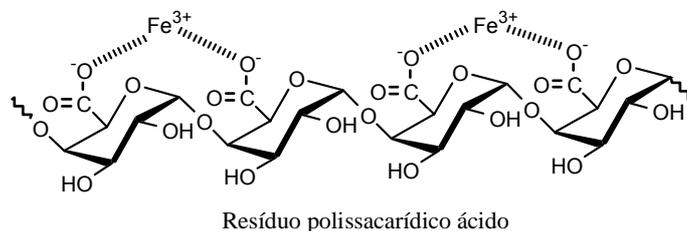


Fig. 33

Em alternativa pode utilizar-se o Vermelho de Ruténio, um composto catiónico hexavalente, usado em microscopia óptica na detecção de pectinas. Na variante para microscopia electrónica, o Vermelho de Ruténio é utilizado na pós-fixação, em combinação com o OsO₄. Embora não se conheça o mecanismo de reacção, sabe-se, no entanto, que a formação do produto electrodenso depende da presença do OsO₄ e é influenciada pelo tipo de tampão utilizado na fixação.

Ensaio *in vitro* revelaram que o Vermelho de Ruténio, na ausência do OsO₄, reage com substâncias ácidas de natureza química muito diversa. Estes resultados, embora sugerindo falta de especificidade, não reflectem a realidade citoquímica. Com efeito, quando utilizado em ensaios citoquímicos, a pH ácido, o Vermelho de Ruténio é muito mais selectivo.

3. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE LÍPIDOS

Não existem muitos métodos para a detecção citoquímica de lípidos e, os que existem, são de utilidade muito limitada. Apesar da baixa selectividade, a fixação com OsO₄ é muito utilizado na caracterização inframicroscópica dos lípidos. As objecções, feitas anteriormente, ao uso deste reagente, na detecção histoquímica de ligações duplas, são também válidas para este caso. Os

resultados falsamente negativos, que frequentemente se obtêm em material incluído em resinas epoxídicas, podem dever-se à extracção de lípidos durante a desidratação e impregnação. Este problema pode, no entanto, ser ultrapassado pela utilização de resinas hidrossolúveis. O emprego destas resinas permite caracterizar vários grupos de lípidos, com base na sua solubilidade diferencial em solventes orgânicos.

Para a detecção de esteróis, não esterificados, usa-se um método que é considerado, por muitos autores, como específico. Baseia-se na formação de complexos insolúveis entre os esteróis e a digitonina, adicionada ao fixador. Embora o colesterol e o sitosterol sejam convenientemente preservados nas células, outro tanto não se verifica com vários esteróis vegetais que, dificilmente, formam digitonitos. De um modo geral, a preservação celular é boa, embora possam ocorrer algumas espículas, ligadas às membranas.

III. HISTOQUÍMICA: PROTOCOLOS

IMPORTANTE:

Observar sempre as secções antes de terem sido submetidas a qualquer teste histoquímico.

Nota: *Vide* em Apêndice o modo de preparação dos reagentes assinalados com *

1. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

1.1. EM LUZ VISÍVEL

1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos

Reacção de Sakaguchi para a arginina (McLeish e Sherrat 1958)

- | | |
|---|-------|
| 1. Solução de α -Naftol-Hipoclorito* | 15min |
| 2. Lavagem rápida em H ₂ O | |
| 3. Solução de Piridina-Clorofórmio* | 2min |

Controlo Positivo: Aplicar algumas gotas duma solução de proteínas sobre uma rodela de papel de filtro, deixar secar e tratar como o material vegetal.

Controlo Negativo: Cortes previamente submetidos à acção de uma solução de Anidrido Acético 10% em Piridina durante 2 a 4h. Lavar em água antes de efectuar o teste.

Resultado: As proteínas coram de vermelho-alaranjado. Observar imediatamente porque a coloração tem tendência a desaparecer.

1.1.2. Coloração de proteínas por ligação do corante a grupos de aminoácidos

a) Corantes que formam ligações covalentes

Reacção Ninidrina-Schiff (Yasuma e Ichikawa 1953)

- | | |
|---|-------------------------------|
| 1. Solução de Ninidrina a 0.5% em Etanol, a 37 °C | durante toda a noite (16-20h) |
| 2. Lavagem em H ₂ O | 5min |
| 3. Reagente de Schiff*, à temperatura ambiente | 30min |

Controlo Positivo e Negativo: Idênticos ao teste anterior.

Resultado: As proteínas coram de vermelho.

Azul Mercúrico de Bromofenol (Mazia *et al.* 1953)

- | | |
|---|--------|
| 1. Solução de Azul de Bromofenol* | 10 min |
| 2. Solução de Ácido Acético a 0.5% | 3x5min |
| 3. Lavagem rápida em H ₂ O | |
| 4. Tampão Fosfato de Sódio 0.1 M pH 7.0 | 3 min |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos.

Resultado: As proteínas coram de azul claro.

Azul Brilhante de Comassie (Fischer 1968)

- | | |
|---|---|
| 1. Solução de Azul de Comassie R250 a 0,25% em Ácido Acético a 7% | 10 min à temperatura ambiente ou a 60°C |
| 2. Solução de Ácido Acético a 7% | 3x5 min |
| 3. Lavagem rápida em H ₂ O | |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 1.1.1. Coloração de tipos particulares de aminoácidos.

Resultado: As proteínas coram de azul.

1.2. EM UV

a) Determinação da viabilidade celular

Diacetato de Fluoresceína (Widholm 1972, Larkin 1976)

- | | |
|---|-------|
| 1. Montar as secções de material numa gota de água. | |
| 2. Adicionar uma gota de Diacetato de Fluoresceína* | 5 min |

Resultado: As células viáveis apresentam uma fluorescência secundária, normalmente amarela-esverdeada.

2. DETECÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO

2.1. EM LUZ VISÍVEL

2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados

Ácido periódico - Reagente de Schiff [PAS] (McManus 1948)

- | | |
|--|-----------|
| 1. Solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1 % (recém preparada) | 30 min |
| 2. Solução de Ácido Periódico a 1 % | 10 min |
| 3. Lavagem rápida em H ₂ O | |
| 4. Reagente de Schiff | 15-30 min |
| 5. Lavagem em solução de Metabissulfito de Sódio a 0.5%* | 3x2 min |
| 6. Lavagem em H ₂ O | |

Controlo Positivo: Aplicar algumas gotas numa solução de polissacáridos sobre uma rodela de papel de filtro, deixar secar, e tratar como o material vegetal.

Controlo Negativo: Aplicar o método, omitindo o tratamento com ácido periódico.

Resultado: Os polissacáridos coram de rosa. O amido e os polissacáridos da parede celular coram intensamente de rosa assim como alguns fenóis. A celulose e a calose não coram.

2.1.2. Caracterização diferencial dos hidratos de carbono

a) Polissacáridos ácidos

Azul de Alciano (Pearse 1980)

Este teste é igualmente utilizado na Detecção de Mucopolissacáridos Ácidos.

- | | |
|--|-------|
| 1. Solução de Azul de Alciano 8 GX a 1% em Ácido Acético a 3% pH 2,5 | 30min |
| 2. Lavagem em H ₂ O | 5min |

Controlo Positivo: Idêntico ao anterior.

Resultado: Os mucopolissacáridos ácidos das paredes celulares ou das secreções coram de azul-turquesa.

b) Amido

Lugol (Jensen 1940)

- | | |
|--|----------|
| 1. Solução de Lugol (solução de Iodo a 0,5% adicionada de Iodeto de Potássio a 1%) | 5-10 min |
| 2. Lavagem em H ₂ O | |

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Resultado: O amido cora de roxo ou de castanho

c) Pectinas

Vermelho de Ruténio (Johansen 1940)

1. Solução de Vermelho de Ruténio a 1000p.p.m. (recém preparado) 5-10 min
2. Lavagem em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Resultado: As pectinas coram intensamente de rosa.

2.2. EM UV

a) Polissacáridos ácidos

Laranja de Acridina (Armstrong 1956)

1. Lavagem em Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS)* 2min
2. Solução de Laranja de Acridina * 15min
3. Lavagem em PBS 2x2min
4. Montagem em PBS

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Resultado: Para detectar de forma diferenciada (metacromasia), ácidos nucleicos e inclusões virais. Fluorescência verde a amarelo – DNA (cromatina e cromossomas); laranja a vermelho – RNA (citoplasma, nucléolo) e polissacáridos ácidos.

Ácido Periódico/Acriflavina-Pseudo Schiff [F-PAS] (Clark 1981)

1. Solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% (recém preparado) 30min
2. Solução de Ácido Periódico 1% 10min
3. Lavagem rápida em H₂O
4. Pseudo-Schiff* saturado com Dióxido de Enxofre 15-30min
5. Lavagem em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Controlo Negativo: Aplicar o método, omitindo o tratamento com ácido periódico.

Resultado: Os polissacáridos fluorescem de amarelo a laranja.

b) β -Glucanos

Calcoflúor (Hughes e McCully 1975)

1. Solução de Calcoflúor (*Calcofluor White MR2*) a 0,01 % (recém preparada) 5-10 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Resultado: A celulose, os polissacáridos carboxilados, os β -1,3 e os β -1,4 glucanos, as pectinas e alguns polissacáridos das mucilagens fluorescem de amarelo-esverdeado a azul pálido.

c) Calose

Azul de Anilina (Smith e McCully 1978a, 1978b)

1. Solução de Azul de Anilina a 0,05% em Tampão Fosfato de Potássio 0,06M pH 8 (recém preparado ou armazenado no frigorífico) 5 min

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 2.1.1. Reacções ligadas à detecção do grupo *vic*-glicol ou grupos aparentados.

Resultado: A calose fluoresce intensamente de amarelo pálido.

3. DETECÇÃO DE MUCILAGENS E MUCOPOLISSACÁRIDOS ÁCIDOS

3.1. EM LUZ VISÍVEL

a) Mucilagens

Ácido Tânico / Cloreto de Ferro (Pizzolato e Lillie 1973)

1. Solução de Ácido Tânico a 5% 10min
2. Lavagem em H₂O
3. Solução de Tricloreto de Ferro a 3% 1min
4. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Aplicar algumas gotas numa solução de polissacáridos sobre uma rodela de papel de filtro, deixar secar, e tratar como o material vegetal.

Controlo Negativo: Cortes tratados apenas com Ácido Tânico ou com Tricloreto de Ferro.

Resultado: As mucilagens coram de negro.

Vermelho de Ruténio (Gregory e Baas 1989)

1. Solução de Vermelho de Ruténio* 10 min
2. Lavagem em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 3. Detecção de Mucilagens e Mucopolissacáridos Ácidos.

Resultado: As mucilagens vegetais coram de rosa brilhante

b) Mucopolissacáridos Ácidos

Azul de Alciano (Pearse 1980)

1. Solução de Azul Alciano 8 GX a 1% em Ácido Acético a 3% a pH 2,5 30 min
2. Lavagem em H₂O 5 min

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 3. Detecção de Mucilagens e Mucopolissacáridos Ácidos.

Resultado: Os mucopolissacáridos ácidos das paredes celulares ou das secreções coram de azul-turquesa.

4. DETECÇÃO DE LÍPIDOS

4.1. EM LUZ VISÍVEL

4.1.2. Detecção geral de lípidos

Negro Sudão B ou Vermelho Sudão IV (Pearse 1980)

1. Solução saturada (0.3%) de Negro Sudão B ou de Vermelho Sudão IV em Etanol 70%,
(filtrar antes de usar) 5-15 min
2. Lavagem rápida em Etanol 70%
3. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Aplicar, numa rodela de papel de filtro, padrões dissolvidos em clorofórmio e secretado da planta. Tratar como o tecido vegetal.

Controlo Negativo: Cortes previamente tratados em metanol / clorofórmio / H₂O / HCl (66:33:4:1) durante 1h, à temperatura ambiente. Em alguns casos pode utilizar-se acetona anidra, 20min a 1h, a 4 °C.

Resultado: Os lípidos coram de azul negro com o Negro Sudão B e vermelho com o Vermelho Sudão IV.

Vermelho Sudão 7B (Brundrett *et al.* 1991)

- | | |
|---|--------|
| 1. Vermelho Sudão 7B a 0.1% em Polietilenoglicol 400 e Glicerol a 90% (v/v) | 60 min |
| 2. Lavagem rápida em H ₂ O | |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao anterior.

Resultado: Os lípidos coram de carmim.

4.1.3. Detecção diferencial de lípidos

a) Lípidos ácidos e neutros

Sulfato Azul do Nilo (Cain 1947, Ganter e Jollès 1969, 1970)

- | | |
|--|-----------------|
| 1. Solução de Sulfato de Azul do Nilo 1%*, a 37 °C | 5-30 min |
| 2. Solução de Ácido Acético a 1% | 1/2-2min a 60°C |
| 3. Lavagem rápida em H ₂ O | |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: Os lípidos neutros coram de rosa e os lípidos ácidos coram de azul.

b) Lípidos insaturados

Tetróxido de Ósmio (Ganter e Jollès 1969, 1970)

- | | |
|---|------------------|
| 1. Solução de Tetróxido de Ósmio a 0.1% | 60 min (na hote) |
| 2. Lavagem em H ₂ O | |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: Os lípidos insaturados coram de negro.

c) Ácidos gordos

Acetato de Cobre / Ácido Rubeânico (Ganter e Jollès 1969, 1970)

- | | |
|--|---------|
| 1. Solução de Acetato de Cobre a 0.05% | 1-3h |
| 2. Solução de Na ₂ EDTA a 0.1% em Tampão Fosfato de Sódio 0.1M pH 7 | 5-15min |
| 3. Lavagem em H ₂ O | 10min |
| 4. Solução de Ácido Rubeânico a 0.1% em Etanol a 70% (recém preparada) | 30min |
| 5. Lavagem em Etanol a 70% | 5min |
| 6. Lavagem rápida em H ₂ O | |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: Os ácidos gordos coram de verde-escuro.

4.2. EM UV

Vermelho Neutro (Kirk 1975)

1. Solução de Vermelho Neutro a 0.1% em Tampão Fosfato de Sódio a 0.1%, pH 6.5 10-20min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: Fluorescência amarela ou azul-esverdeada, dependendo da composição dos diferentes tipos de lípidos.

5. DETECÇÃO DE TERPENÓIDES

5.1. EM LUZ VISÍVEL

5.1.1. Detecção diferencial de terpenóides

a) Essências e ácidos resínicos

Reagente de Nadi (David e Carde 1964)

- | | |
|---|-----------|
| 1. Reagente de Nadi*, à temperatura ambiente, no escuro | 60-90 min |
| 2. Lavagem em Tampão Fosfato de Sódio 0.1 M pH 7.2 | 2 min |

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultados: As essências coram de azul e os ácidos resínicos coram de vermelho escuro. As misturas de óleos essenciais e ácidos resínicos são evidenciadas por uma coloração que vai de violeta a púrpura, de acordo com a predominância de um ou de outro componente.

b) Esteróides

Tricloreto de Antimónio (Hardman e Sofowora 1972, Mace *et al.* 1974)

1. Montar directamente os cortes numa solução saturada de Tricloreto de Antimónio em Ácido Perclórico 60%
2. Observar ao fim de 3 a 10 min, em luz visível e ultravioleta.

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Controlo Negativo: Cortes previamente tratados com uma solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% (recém preparado) durante 10min, seguido de lavagem em H₂O (3x15min). Realizar também um controlo utilizando apenas Ácido Perclórico.

Resultado: Os esteróides coram de vermelho-alaranjado em luz visível e de amarelo a púrpura em luz ultravioleta.

c) Terpenóides com grupo carbonilo

2,4-Dinitrofenilhidrazina (Ganter e Jollés 1969, 1970)

1. Solução saturada de 2,4 - Dinitrofenilhidrazina em HCl 2N, a 25 °C 10min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos. Alternativamente aplicar o método a cortes previamente tratados com uma solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% (recém preparada) durante 10min e ulteriormente lavados em água (3x15min). Realizar também um controlo utilizando apenas o Ácido Clorídrico 2N, durante 1 min.

Resultado: Os terpenóides coram de vermelho-alaranjado.

d) Lactonas sesquiterpénicas

Ácido Sulfúrico (Geissmen e Griffin 1971)

1. Montar os cortes directamente em Ácido Sulfúrico e observar imediatamente

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: As lactonas sesquiterpénicas coram de vermelho-acastanhado.

Reacção Modificada de Abraham (Caniato *et al.* 1989)

1. Solução Metanólica de Tiocianato Ferroso* (recém preparada) 15-20min, em recipiente fechado
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlos Positivo e Negativo: Aplicar o método a secções previamente tratadas com Clorofórmio durante 20min.

Resultado: As lactonas sesquiterpénicas coram de vermelho-acastanhado.

5.2. EM LUZ VISÍVEL E EM UV

a) Detecção de partículas de borracha

Oil Red O ou Oil Blue N (Pearse 1968 modificado por Jayabalan e Shah 1986)

1. Solução saturada de Oil Red O ou de Oil Blue N em Ácido Fórmico a 90% 3-5min
2. Lavagem em H₂O
3. Montagem em glicerina para luz visível ou em glicerina a 50% para fluorescência.

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: As partículas de borracha coram de vermelho em luz visível e fluorescem de vermelho pálido em UV.

5.3. EM UV

a) Detecção de partículas de borracha

Cloreto de Dansil (Jayabalan e Shah 1986)

1. Para extracção de resinas
Mistura de Acetona/Água 88:12 (v/v) 3x15min a 55°C
2. Para extracção de lípidos
Mistura de Clorofórmio/Metanol 1/1 (v/v) 30min
3. Lavagem em Hidróxido de Sódio a 5% em Etanol a 95% durante 30s com agitação.
4. Lavagem em Ácido Clorídrico 2N 2x3min
5. Lavagem em H₂O
6. Para extracção de proteínas
Pepsina (pH 6) 6h
7. Para remover as proteínas precipitadas
Lavagem rápida, com agitação, em ácido tricloroacético a 10%
8. Etanol a 70% durante 5min
9. Lavagem em água
10. Lavagem em Bicarbonato de Sódio a 1% (pH 8 – 9)
11. Cloreto de Dansil (1mg/4ml de acetona) 2-3min
12. Lavagem em H₂O
13. Montagem em Bicarbonato de Sódio a 1% (para evitar o *background* durante a fotografia).

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: As partículas de borracha fluorescem de branco.

Oil Red O/Cloreto de Dansil (Jayabalan e Shah 1986)

1. A reacção realiza-se em secções em que as resinas, os lípidos e as proteínas foram extraídos de modo idêntico ao do teste anterior.
2. Solução saturada de Oil Red O em Ácido Fórmico a 90% 3-5min
3. Cloreto de Dansil (1 mg/4 ml de Isopropanol a 60%) 2-3min
4. Lavagem em H₂O
5. Montagem em solução de Bicarbonato de Sódio a 1%

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 4.1.2. Detecção geral de lípidos.

Resultado: As partículas de borracha fluorescem de branco.

6. DETECÇÃO DE FENÓIS

6.1. EM LUZ VISÍVEL

6.1.1. Caracterização geral de fenóis

Cloreto de Ferro III (Johansen 1940)

1. Solução de Tricloreto de Ferro a 10 % 15-30 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Aplicar, numa rodela de papel de filtro, padrões dissolvidos em metanol e secretado da planta. Tratar como o tecido vegetal.

Resultado: Os fenóis coram de verde intenso, púrpura, azul ou negro.

Dicromato de Potássio (Gabe 1968)

1. Solução de Dicromato de Potássio a 10 % 15-30 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao anterior.

Resultado: Os fenóis coram de castanho avermelhado a castanho-escuro.

Diazoreacção (Ganter e Jollés 1969, 1970)

1. Solução Fast Blue B a 0.1 % em Tampão Veronal 0.1 M pH 7.5-8.5 (recém preparado) a 4 °C 1-2 min
2. Lavagem em HCl a 1 % em Etanol a 70 % 3x2min
3. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 6.1.1. Caracterização geral de fenóis.

Resultado: Os fenóis coram de vermelho.

6.1.2. Caracterização diferencial de fenóis

a) Detecção de lenhina

Fluoroglucinol (Johansen 1940)

1. Solução de Fluoroglucinol a 1 % 20 min
2. Montar em HCl a 50 %

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 6.1.1. Caracterização geral de fenóis.

Resultado: A lenhina cora de vermelho (em particular o monómero álcool coniferílico).

b) Detecção de taninos

Vanilina Clorídrica (Mace e Howell 1974, Gardner 1975)

1. Vanilina a 0,5% em Ácido Clorídrico (HCl) a 9% 10 min
2. Montagem em HCl a 9% (cuidado com os vapores de HCl)

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 6.1.1. Caracterização geral de fenóis. Observar igualmente secções montadas apenas em HCl a 9%.

Resultado: Os taninos coram de vermelho a castanho.

6.2. EM UV

Os fenóis apresentam, em geral, autofluorescência azul em UV e autoflorescência amarela-esverdeada, muito intensa, em luz azul.

a) Detecção de flavonóides

Acção de Fluorocromos (Charrière-Ladreix 1976)

1. Solução do fluorocromo* 15-30 min
2. Lavagem rápida no solvente

Controlo Positivo: Idêntico ao referido em 6.1.1. Caracterização geral de fenóis.

Controlo Negativo: Cortes não submetidos ao tratamento com os fluorocromos. Verificar, também, se a fluorescência não se deve aos fluorocromos só por si.

Resultado: Os flavonóides emitem, em geral, uma fluorescência secundária amarelo-esverdeada em presença dos fluorocromos (Cloreto de Alumínio, Acetato de Magnésio e Acetato Neutro de Chumbo). As agliconas flavonólicas apresentam uma fluorescência secundária amarela muito intensa com o Reagente de Wilson.

7. DETECÇÃO DE ALCALÓIDES

7.1. EM LUZ VISÍVEL

7.1.1. Caracterização geral de alcalóides

Reagente de Dragendorff (Svendsen e Verpoorte 1983)

1. Reagente de Dragendorff* 5-10 min
2. Passagem numa Solução de Nitrito de Sódio a 5%
3. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo: Aplicar, numa rodela de papel de filtro, padrões e secretado da planta. Tratar como o tecido vegetal.

Controlo Negativo: Cortes previamente tratados com Ácido Tartárico a 5% em Etanol a 95%, durante 48-72h.

Resultado: Os alcalóides coram de castanho-avermelhado.

Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg 1981)

1. Reagente de Dittmar* 5-10 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo: Idêntico ao teste anterior.

Resultado: Os alcalóides coram de castanho-avermelhado.

Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg 1981)

1. Reagente de Wagner* 5-10 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 7.1.1. Caracterização geral de alcalóides.

Resultado: Os alcalóides coram de laranja vivo a castanho-avermelhado.

Reagente de Ellram (Furr e Mahlberg 1981)

1. Reagente de Ellram (Solução de Vanilina a 1% em Ácido Sulfúrico a 40%) 5-10 min
2. Lavagem rápida em H₂O

Controlo Positivo e Negativo: Idêntico ao referido em 7.1.1. Caracterização geral de alcalóides.

Resultado: Os alcalóides coram de laranja vivo a castanho-avermelhado.

7.2. EM UV

Autofluorescência azul: serpentina, quinino, quinidina, cefaleina, emetina, ioimbina, noscapina.

Autofluorescência azul a violeta (dependendo do tempo de irradiação): cinchonina e a cinchonidina.

Autofluorescência amarela: berberina e sanguinarina.

8. MÉTODOS DE COLORAÇÃO DUPLA

Verde Iodo-Carmim Aluminado (Mirande 1920, modificado)

- | | |
|--------------------------------|-----------|
| 1. Hipoclorito de Sódio | 30-40 min |
| 2. Lavagem em água acética 1 % | 2 min |
| 3. Verde iodo | 10 seg |
| 4. Lavagem em H ₂ O | 1 min |
| 5. Carmim Aluminado | 10 min |
| 6. Lavagem em H ₂ O | |

Resultado: As paredes lenhificadas, suberificadas e cutinizadas coram de verde enquanto que as pecto-celulósicas coram de vermelho

Azul de Astra-Safranina (Bukatsch 1972, modificado)

- | | |
|---|---------|
| 1. Ácido Acético a 5% | 1-2min |
| 2. Lavagem em água destilada | |
| 3. Solução de Azul de Astra a 1% /Safranina a 1%, 9:1 (v/v) | 5-15min |
| 4. Lavagem em água destilada | 1-2min |
| 5. Secagem e montagem | |

Resultado: As paredes lenhificadas, suberificadas e cutinizadas coram de vermelho enquanto que as pecto-celulósicas coram de azul. Os núcleos coram de vermelho.

Azul de Metileno-Azure A-Safranina (Warmke e Lee 1976)

- | | |
|---|--------------|
| 1. Solução de Azul de Metileno - Azure A* aquecida a 60°C | 30min a 60°C |
| 2. Lavagem em água corrente | |
| 3. Solução de Safranina* aquecida a 60°C | 2min a 60°C |
| 4. Lavagem em água corrente e depois em água destilada. | |
| 5. Secagem e montagem | |

Resultado: Celulose (vermelha); cutícula e intina (laranja-avermelhado); exina (azul-esverdeado); calose, plastos, mitocôndrias e invólucro nuclear (púrpura); cromatina e nucléolo (púrpura-escura); nucleoplasma (púrpura-clara); citoplasma (púrpura-rosa claro).

Azul de Toluidina (Feder e O'Brien 1968)

- | | |
|--|--------------|
| 1. Solução a 0.05% de Azul de Toluidina | 5 min a 55°C |
| 2. Lavagem em água corrente e depois em água destilada | |
| 3. Secagem e montagem. | |

Resultado: Paredes do xilema e esclerênquima (verde ou azul-esverdeado); paredes do colênquima e parênquima, (vermelho-púrpura); lamela média e paredes do floema (vermelho). A calose e o amido não coram.

9. HISTOQUÍMICA EM SECÇÕES SEMIFINAS DE RESINAS EPÓXI

9.1.2. Detecção de hidratos de carbono

Ácido periódico-Reagente de Schiff (PAS) (Feder e O'Brien 1968)

- | | |
|---|-----------|
| 1. Bloqueio dos Aldeídos | |
| a. Solução saturada de Dimedona* (5,5 - dimetilciclohexano - 1,3 - diona) | 16 a 24 h |
| b. Lavagem em água corrente | 20-30 min |
| ou | |
| a. Solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% | 30 min |
| b. Lavagem em água | 1 min |
| 2. Solução de Ácido Periódico a 1 % | 10 min |
| 3. Lavagem em água corrente | 5-10 min |
| 4. Solução de Reagente de Schiff | 20-30 min |
| 5. Solução de Metabissulfito de Sódio a 0.5% | |
| 3x2 min | |
| 6. Lavagem em água corrente | 10 min |
| 7. Secagem e montagem | |

Controlo: Omissão do tratamento com o Ácido Periódico.

Resultado: O amido e alguns polissacáridos complexos (especialmente os compostos da lamela média) coram de vermelho. A celulose geralmente não cora.

9.1.3. Detecção de lípidos

Negro Sudão B (Bronner 1975, Parham e Kaustinen 1976)

- | | |
|---|-------------|
| 1. Solução saturada de Negro Sudão B (filtrar e aquecer a 60°C) | 1-2h a 60°C |
| 2. Lavagem em Etanol 70% | 1 min |
| 3. Lavagem rápida em água destilada | |
| 4. Secagem e montagem. | |

Controlo: Observação em microscopia de contraste de fase de cortes não corados.

Resultado: Os lípidos coram de azul a negro e os taninos de castanho alaranjado.

9.1.4. Detecção de proteínas

Azul Brilhante de Comassie R250 (Fisher 1968)

1. Solução de Azul Brilhante de Comassie a 1% em ácido acético a 7% 3-10min a 30°C
2. Diferenciação em Ácido Acético a 7%
3. Lavagem rápida em água destilada
4. Secagem e montagem.

Controlo: Observação de secções de material fresco.

Resultado: As proteínas coram de azul.

IV. CITOQUÍMICA: PROTOCOLOS

1. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

Visualização de Ribo- e Desoxirribonucleoproteínas pelo método da Contrastação Regressiva (Bernhard, 1968; Bernhard, 1969)

(Método efectuado em secções recolhidas em grelhas de ouro)

- | | |
|--|----------|
| 1. Solução de Ácido Periódico a 2% | 30min |
| 2. Solução de Acetato de Uranilo a 1% em metanol | 1min |
| 3. Lavagem em Metanol | |
| 4. Lavagem em H ₂ O | |
| 5. Solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0.2M, pH 7.0 | 30-90min |
| 6. Lavagem em H ₂ O | |
| 7. Solução de Citrato de Chumbo a 0.4% | 5min |
| (na preparação da solução de citrato de chumbo, por cada 100ml de H ₂ O adiciona-se 1ml de NaOH 10N de forma a dissolver o Citrato de Chumbo) | |
| 8. Lavagem em H ₂ O | |

Controlo: Omissão do tratamento com EDTA (ponto 5).

Detecção da actividade fosfatásica ácida (Hulstaert *et al.* 1983, modificado)

(Método efectuado em bloco)

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão PIPES 0.05M pH 7.4 | 20min a 4 °C |
| 2. Lavagens no tampão da mistura fixadora | 3x10min |
| 3. Pré-incubação* | durante a noite a 4 °C |
| 4. Incubação* | 1h30min a 37 °C |
| 5. Lavagem em Tampão PIPES 0.05M pH 6.0. | |
| 6. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão PIPES 0.05M pH 7.4 | 2 h à temperatura ambiente |
| 7. Lavagens no tampão da mistura fixadora | 3x10min |
| 8. Pós-fixação em OsO ₄ 1% em Tampão PIPES 0.05M pH 6.8 | 2h à temperatura ambiente |
| 9. Desidratação, impregnação e inclusão. | |

Controlos: Incubação do material no meio sem β-Glicerofosfato de Na (substracto) e incubação em meio completo na presença de Fluoreto de Sódio 0,01M (inibidor).

Detecção da actividade adenosina trifosfatase (Wachstein e Meisel 1957, modificado)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7.2
1h a 4°C
2. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
3x20min
3. Incubação*
2h a 22°C
4. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
5. Lavagens em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2
6. Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2 2h à temperatura ambiente
7. Desidratação, impregnação e inclusão.

Controlos: Incubação do material no meio sem Nitrato de Chumbo (substracto) e incubação em meio completo na presença de Fluoreto de Sódio 0,01M (inibidor).

Detecção da actividade inosina difosfatase (Novikoff e Goldfisher 1961, modificado)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7.2
1h a 4°C
2. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
3x20min
3. Incubação*
2h a 22°C
4. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
5. Lavagens em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2
6. Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2 2h à temperatura ambiente
7. Desidratação, impregnação e inclusão

Controlos: Incubação do material no meio sem Nitrato de Chumbo (substracto) e incubação em meio completo na presença de Fluoreto de Sódio 0,01M (inibidor).

Detecção da actividade tiamina pirofosfatase (Goldfisher et al. 1971, modificado)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2
1h a 4 °C
2. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
3x20min
3. Incubação*
2h a 22 °C
4. Lavagens em Tampão Tris-Maleato 0,05M pH 7,2
5. Lavagens em Tampão Cacodilato 0,02M pH 7,2
- 6 Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Acetato-Cacodilato 0,02M pH 7,2
2h à temperatura ambiente
7. Desidratação, impregnação e inclusão

Controlos: Incubação do material no meio sem Nitrato de Chumbo (substracto) e incubação em meio completo na presença de Fluoreto de Sódio 0,01M (inibidor).

Detecção da actividade peroxidásica da catalase (Silverberg e Sawa, 1973 modificado)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Paraformaldeído 2% e Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0.1 M pH 7.2
3h à temperatura ambiente
2. Lavagens no tampão da mistura fixadora
3x10 min
3. Incubação*, durante 1h30min, a 37 °C, no escuro e em agitação permanente
4. Paragem da incubação em gelo fundente e
5. Lavagem em Tampão Glicina / NaOH 0.05M pH 10
3x15 min
6. Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0.1M pH 7.2
3x15 min
5. Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Cacodilato de Sódio 0.1 M pH 7.2
2h à temperatura ambiente
6. Desidratação, impregnação e inclusão

Controlos: O controlo é efectuado sujeitando o material a pré-incubação numa solução de aminotriazole (3-amino-1,2,4-triazole) 0.02M, em Tampão Glicina/NaOH 0.05M pH 10, sem peróxido de hidrogénio, durante 30min, à temperatura ambiente, e ulterior incubação no meio completo em presença de 3-amino-1,2,4-triazole 0.02M.

Detecção da actividade das peroxidases (Graham e Karnovsky 1966 modificado)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato de Sódio 0.075M pH 7.2 3h a 4°C
2. Lavagens no tampão da mistura fixadora 3x10 min
3. Incubação* 90min a 37°C, no escuro e em agitação permanente
4. Lavagem em Tampão Cacodilato de Sódio 0.075M pH 7.2 3x15 min
5. Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Cacodilato de Sódio 0.075M pH 7.3
1h à temperatura ambiente
6. Desidratação, impregnação e inclusão

Controlo: O controlo é efectuado por omissão do Peróxido de Hidrogénio do meio de incubação.

Detecção da actividade da celulase (Bal 1974)

(Método efectuado em bloco)

1. Fixação em Paraformaldeído/Glutaraldeído (Karnovsky) em Tampão Fosfato de Na 0,02M pH 7.2 1h a 4°C
2. Lavagens no tampão da mistura fixadora 18h (pelo menos 10 lavagens)
3. Incubação* 5-10min a 22-25°C
4. Solução de Benedict a 70-100 °C 5-10min
5. Lavagens em água destilada
6. Pós-fixação em OsO₄ 1% em Tampão Fosfato de Na 0,02M pH 7,2
1h à temperatura ambiente
7. Desidratação, impregnação e inclusão.

Controlo: Incubação do material no meio sem carbometilcelulose (substracto)

Digestão enzimática por acção de uma pronase (Monneron 1966)

(Método efectuado em secções recolhidas em grelhas de ouro)

1. Peróxido de Hidrogénio a 10% 20min
2. Lavagem em H₂O bidestilada 3min
3. Solução de Pronase a 0.5% em Tampão Fosfato de Sódio 0.1M pH 7.4 2-6h a 37°C
4. Lavagem cuidadosa em H₂O bidestilada

Controlo: Incubação no Tampão desprovido de enzima ou em solução de pronase inactivada pelo calor (fervura), durante o mesmo tempo e nas mesmas condições do teste

2. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE HIDRATOS DE CARBONO

Detecção de Polissacáridos (PATAg) (Thiéry, 1967)

(Método efectuado em secções recolhidas em grelhas de ouro)

- | | |
|---|-------|
| 1. Solução de Ácido Periódico a 1% | 30min |
| 2. Lavagens rápidas em H ₂ O | 2x |
| 3. Solução de Tiocarbohidrazida a 0.2% em Ácido Acético a 20%
(centrifugada a 6000g imediatamente antes de usar) | 6h |
| 4. Lavagens cuidadosas em solução de Ácido Acético a 20% | 3x |
| 5. Lavagens rápidas em H ₂ O | 2x |
| 6. Proteinato de Prata a 1% (às escuras) | 30min |
| 7. Lavagens rápidas em H ₂ O | 3x |

Controlo: Redução prévia dos aldeídos com solução de Tetrahidreto Boreto de Sódio a 1% 30min

3. DETECÇÃO CITOQUÍMICA DE LÍPIDOS

Digestão enzimática por acção de uma lipase (Morii *et al.*, 1982)

(Método efectuado em secções recolhidas em grelhas de ouro)

Uma unidade de lipase liofilizada de pâncreas de porco (tipo VI da SIGMA), a pH 7.7 e a 37°C durante 1h, hidroliza 1 microequivalente de ácido gordo dum triglicérido, quando utilizado o óleo de azeitona como substracto.

- | | |
|--|-------------|
| 1. Solução de Peróxido de Hidrogénio a 10% | 20min |
| 2. Lavagem em H ₂ O bidestilada | 3min |
| 3. Solução de Lipase a 0.2% em Tampão Fosfato de Sódio 0.1M pH 7.4 | 3-6h a 37°C |
| 4. Lavagem cuidadosa em H ₂ O bidestilada | |

Controlo: Incubação no Tampão desprovido de enzima ou em solução de lipase inactivada pelo calor (fervura), durante o mesmo tempo e nas mesmas condições do teste

APÊNDICE

Solução de α -Naftol-Hipoclorito

NaOH 1 %	200 ml
α -Naftol 1% em Etanol 70 %	10 ml
Hipoclorito de Sódio 1 %	20 ml

Solução de Piridina-Clorofórmio

(trabalhar na hote)	
Piridina	90 ml
Clorofórmio	30 ml

Reagente de Schiff

Dissolver 2g de Pararosanilina (Fucsina Diamante) em 60ml de HCl 1 N. Juntar 300ml de água destilada à qual se adicionaram 2g de Metabissulfito de Sódio. Misturar bem e deixar repousar 24h, em frasco rolhado. Adicionar 1.2g de carvão activado e agitar durante 2min. até ficar incolor. Filtrar a solução e manter no escuro a 4 °C (por um período máximo de dois meses).

Pseudo Schiff

Acriflavina a 0,1% saturada com SO por adição de 2 a 3 gotas de cloreto de tionil a 40ml da solução corante ou por adição de 0,5g de Metabissulfito de Potássio e de 10ml de HCL 1N (8% HCL concentrado) a 50ml da solução corante. Neste segundo caso esperar cerca de 12h antes de usar.

Azul de Bromofenol

Azul de Bromofenol 0.1 % em Etanol 95 % adicionado de Cloreto de Mercúrio (10 % final).

Azul de Comassie

Azul de Comassie R250 a 0,25 % em ácido acético a 7%.

Metabissulfito de Sódio 0.5%

Metabissulfito de Na ou K ou Bissulfito de Na	1 g
HCl 1 N	10 ml
H ₂ O	190 ml

Vermelho de Ruténio

Vermelho de Ruténio	8 mg
Acetato de Chumbo a 10%	10ml

Sulfato de Azul do Nilo

Adicionar 10 ml H₂SO₄ 1 % a 200 ml de Sulfato Azul do Nilo a 1 %. Ferver durante 4h, deixar arrefecer e filtrar.

A solução deve ficar a pH 2 para diminuir a coloração doutras substâncias não lipídicas.

Reagente de Nadi

(preparar no momento)	
α - Naftol 0.1 % em EtOH 40 %	0.5 ml
Cloridrato de dimetilparafenileno diamina 1 %	0.5 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0.05 M pH 7.2	49.0 ml

Solução Metanólica de Tiocianato Ferroso

Solução Metanólica saturada de Sulfato Ferroso	1V
Solução Metanólica saturada de Tiocianato de Amônio	1V

Fluorocromos para detecção de flavonóides

Cloreto de Alumínio 5 - 15 % (sol. aquosa ou metanólica)
Acetato de Magnésio 5 % (sol. metanólica)
Acetato Neutro de Chumbo 1 - 3 % (sol. aquosa)
Mistura Citrobórica de Wilson: 1 vol. de Ácido Cítrico 10 % em Acetona + 1 vol. de Ácido Bórico em Acetona.

Reagente de Wagner

Iodeto de potássio	2 g
Iodo	1.27 g
H ₂ O	100 ml

Reagente de Dittmar

Iodeto de potássio	1 g
Nitrito de sódio	1 g
Ácido Clorídrico	30 ml
H ₂ O	30 ml

Reagente de Dragendorff

Misturar as soluções I e II. Esta solução stock pode ser guardada 6 meses. Na altura de usar retirar 5 ml desta solução, juntar 10 ml de ácido acético e diluir para 100 ml de água.

I. Nitrato de Bismuto 12.5 % em H ₂ O contendo 25 % de Ácido Acético	25 ml
II. Iodeto de Potássio 40 %	10 ml

Diacetato de Fluoresceína

Diacetato de Fluoresceína 0.5 % em Acetona. Guardar no escuro, e não armazenar mais de 3h.

Laranja de Acridina em PBS

Laranja de Acridina 0.1 % aquoso: PBS (1:9)

Safranina

(filtrar antes de usar)

Safranina	0.1 g
Tampão Tris 0.2M pH 9.0	100 ml

Solução saturada de Dimedona

0.5 g em 100 ml H₂O com agitação durante 5 h e filtrar.

Azul de Metileno-Azur A

(filtrar antes de usar)

Azul de Metileno	0.13 g
Azur A	0.02 g
Glicerol	10 ml
Metanol	10 ml
Tampão Fosfato de Sódio 0.1 M pH 6.9	30 ml
Água destilada	50 ml

PBS (Phosphate Buffer Saline) – Tampão Fosfato Salino (sem cálcio nem magnésio)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Para 1 l de água	

Tampão Fosfato (0.1M)

A. Solução stock: Tampão Fosfato 0.2 M

1. Solução de Fosfato de Sódio Dibásico 0.2 M

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2.68 g (ou 3.58 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)
Água Destilada	50 ml

2. Solução de Fosfato de Sódio Monobásico 0.2 M

NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	1.38 g
Água Destilada	50 ml

B. Solução de Trabalho: Tampão Fosfato 0.1M

Para um determinado pH, misturar os volumes das soluções de Fosfato de Sódio Dibásico e Monobásico, de acordo com a Tabela I, e perfazer para um volume de 100ml com Água Destilada.

Tabela I

pH	Fosfato de Sódio 0.2 M	
	Monobásico (ml)	Dibásico (ml)
6.8	25.5	24.5
7.0	19.5	30.5
7.2	14.0	36.0
7.4	9.5	40.5

Tampão Veronal (0.1M) pH 7.4-8**A. Solução Acética**

Acetato de Sódio	0.2 g
Água destilada	10 ml

B. Solução Veronal

Veronal Sódico (barbital)	0.26 g
Água destilada	10 ml

10 ml de A + 10 ml de B + 20 ml de água destilada. Acertar o pH com HCl 0.1 N.

Tampão Tris (0.1M)

Soluções stock: Tampão Tris 0.2 M

1. Solução de Tris(hidroximetil)aminometano 0.2M: 24,2g em 1000 ml
2. HCl 0.2M

Para um determinado pH, misturar os volumes das soluções Tris e HCl, de acordo com a Tabela II, e perfazer para um volume de 100ml, com Água Destilada.

pH	Solução Tris (ml)	HCl (ml)
7.2	50	44.2
8.0	50	26.8
8.6	50	12.2
9.0	50	5.0

Tampão Tris- Maleato (0.1M)

A. Solução stock: Tampão Tris-Maleato 0.2 M

1. Solução de Tris- Maleato 0.2M

Tris (hidroximetil) aminometano	24,2g
Ácido Málico	23,2g
Ou	
Anidrido Málico	19,6g

2. Solução de NaOH 0.2M

B. Solução de Trabalho: Tampão Tris-Maleato 0.1M

Para um determinado pH, misturar 50ml da solução Tris-Maleato 0,2M com o volume de NaOH, de acordo com a Tabela III, e perfazer para um volume de 100ml com Água Destilada.

pH	NaOH (ml)
7.0	48.0
7.2	51.0
7.4	54.0
7.6	58.0

Tampão Glicina

Dissolver 751mg de glicina em 80ml de Água Destilada. Ajustar para pH 10 com NaOH 1N e perfazer para um volume de 100ml, com Água Destilada.

Solução de HCl 1N

O HCL fumante tem:	
Peso molecular	36.46 g
Densidade	1.19
Percentagem em solução	37 %

Para preparar 100 ml de HCl 1 N:

36.46 g / l de HCl para 1N

100 g de solução - 37 g de HCl \approx 98.55 g de solução

sendo a densidade 119g - 100ml então os 98.55g de sol. estão em 82.8ml de HCl fumante

Em 82.8 ml de HCl fumante existem 36.46 g de HCl

Para 100ml: 82.8ml - 1l \approx 8.28ml de HCl fumante preencher para 100ml de água destilada.

Detecção da actividade fosfatásica ácida

Meio de pré-incubação:

Tampão Tris-maleato pH 5.0	100mM
Cloreto de Cério III	1mM

Meio de incubação:

Tampão Tris-maleato pH 5.0	100mM
Cloreto de Cério III	1 mM
β -Glicerofosfato de Na	7 mM
O pH final do meio de incubação é 5.0	

Detecção da actividade adenosina trifosfatase

Meio de incubação:

Tampão Tris-Maleato 0.05 M pH 7.2	200mM
ATP (disódico)	2mM
Nitrato de Chumbo	2mM
Nitrato de Magnésio	2mM

Detecção da actividade inosina difosfatase

Meio de incubação:

Tampão Tris-Maleato 0.05 M pH 7.2	200mM
Inosina Difosfato (sódico)	2mM
Nitrato de Chumbo	2mM
Nitrato de Magnésio	2mM

Detecção da actividade tiamina pirofosfatase

Meio de incubação:

Tampão Tris-Maleato 0.05 M pH 7.2	200mM
Tiamina Pirofosfato (cloreto)	2mM
Nitrato de Chumbo	2mM
Nitrato de Magnésio	2mM
ATP (disódico)	2mM

Detecção da actividade peroxidásica da catalase

Meio de incubação:

Tampão Glicina / NaOH 0.05M pH 10	5 ml
DAB (3,3'-diaminobenzidina, free base)	1 mg
Peróxido de Hidrogénio 3%	0.1 ml
O pH final do meio de incubação é 9.5-10	

Detecção da actividade das peroxidases

Meio de incubação:

Tampão Tris - HCl 0.05M pH 7.6	10 ml
DAB (3,3'-diaminobenzidina, free base)	5 mg
Peróxido de Hidrogénio 1%	0.1 ml

Detecção da actividade da celulase

Meio de incubação:

Carbometilcelulose	0.2g
Tampão Fosfato de Na 0.01M pH 6.0	10ml

Solução de Benedict:

Solução A

Citrato de Sódio	17.3g
Carbonato de Sódio Anidro	10.0g
Água destilada aquecida a 60°C	80ml
(A solução deve ser filtrada e deixada a arrefecer antes de se misturar com a solução B)	

Solução B

Sulfato de Cobre	1.7g
Água destilada	10ml

Misturar as soluções A e B e perfazer com água destilada até um volume de 100ml.

BIBLIOGRAFIA

- Armstrong JA (1956) Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Exp. Cell. Res.* 11: 640-643.
- Bal AK (1974) Cellulase. In: Electron microscopy of enzymes. Principles and methods. Vol. III, pp. 68-76. Hayat MA (Eds.) Van Nostrand Reinhold Company, N.Y, London.
- Bernhard W (1968) Une méthode de coloration régressive à l'usage de la microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci.* 267: 2170-2173.
- Bernhard W (1969) A new staining procedure for electron microscopy cytology. *J. Ultras. Res.* 27: 250-265.
- Bronner R (1975) Simultaneous demonstration of lipids and starch in plant tissues. *Stain. Technol.* 50: 1-4.
- Brundrett MC, B Kendrick, CA Peterson (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. & Histochem.* 66: 111-116.
- Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 1-255.
- Cain AJ (1947) The use of Nile Blue in the examination of lipids. *Quarter. J. Microsc. Sci.* 88: 383-392.
- Caniato R, R Filippini, EM Cappelletti, G Appendino (1989) Detection of peroxides in intact plant material. *Fitoterapia* LX: 549-551.
- Charrière-Ladreix Y (1976) Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L., *Planta* 129: 167-174.
- Clark G (1981) Staining procedures. Williams & Wilkins, Baltimore.
- David R, JP Carde (1964) Coloration différentielle des pseudophylles de *Pin maritime* au moyen du reactif de Nadi. *C. R. Acad. Sci. Paris*, ser. D 258: 1338-1340.
- Eschrich EW, HB Currier (1964) Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. *Stain Technol.* 39: 303-307.
- Essner E (1973) Phosphatases. In: Electron microscopy of enzymes. Principles and methods. Vol. I, pp. 45-69. Hayat MA (Eds.) Van Nostrand Reinhold Company, N.Y, London.
- Feder N, TP O'Brien (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* 55: 123-142.
- Fisher DB (1968). Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96.
- Furr Y, PG Mahlberg (1981) Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J. Nat Prod.* 44: 153-159.
- Gabe M (1968) *Techniques histologiques*. Masson & Cie, Paris.
- Ganter P, G Jollès (1969, 1970) *Histologie normale et pathologique*. Vols. 1, 2 Gauthier-Villars, Paris.
- Gardner RO (1975) Vanillin-Hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technol.* 50: 315-317.
- Geissman TA, TS Griffin (1971) Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry* 10: 2475-2485.
- Goldfisher S, E Essner, B Schiller (1971) Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Histochem. Cytochem.* 19: 349-360.
- Graham RC, MJ Karnovsky (1966) The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291-302.
- Gregory M, Baas P (1989) A survey of mucilage cells in vegetative organs of Dicotyledons. *Isr. J. Bot.* 38: 125-174.
- Hardman R, EA Sofowora (1972) Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technol.* 47: 205-208.
- High OB (1984) *Lipid Histochemistry*. Microscopy Handbooks 06. Oxford University Press. Royal Microscopy Society.
- Hughes J, ME McCully (1975) The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain. Technol.* 50: 319-329.
- Hulstaert CE, D Kalicharan, MJ Hardonk (1983) Cytochemical demonstration of phosphatases in the rat liver by a cerium-based method in combination with osmium tetroxide and potassium ferrocyanide postfixation. *Histochemistry* 78: 71-79.
- James J, J Tas (1984) *Histochemical protein staining methods*. Microscopy Handbooks 04. Oxford University Press. Royal Microscopy Society.
- Jayabalan M, JJ Shah (1986) Histochemical techniques to localize rubber in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Stain Technol.* 61: 303-308.
- Jensen WA (1962). Botanical histochemistry. WH Freeman and Co, San Francisco.

- Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Kirk PWJr (1975) Neutral Red as a lipid fluorochrome. *Stain Technol.* 45: 1-4.
- Larkin P (1976) Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta* 128: 213-216.
- Lillie RD (1990) *H. J. Conn's Biological Stains*. 9th ed. Sigma Chemical Company.
- Lison L (1960) *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Vols. 1, 2. Gauthier-Villars, Paris.
- Mace ME, AA Bell, RD Stipanovic (1974) Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytophathol.* 64: 1297-1302.
- Mace ME, CR Howell (1974) Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Can. J. Bot.* 52: 2423-2426.
- Mazia D, PA Brewer, M Alfert (1953) The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biol. Bull.* 104: 57-67.
- McLeish J, HA Sherrat (1958) The use of Sakaguchi reaction for the cytochemical determination of combined arginine. *Exp. Cell Res.* 14: 625-628.
- McManus JFA (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23: 99-108.
- Mirande R (1920) Sur le carmin aluné et son emploi, combiné avec celui du vert d' iode, en Histologie végétale. *CR Acad. Sci.* 170. 197-199.
- Monneron A (1966) Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale. *J. Microsc.* 5: 583-596.
- Morii S, S Takigami, Y Kaneda, N Shikata (1982) Ultracytochemical analysis of cytoplasmic lipids by enzymic digestive methods. *Acta Histochem. Cytochem.* 15: 185-191.
- Novikoff AS, S Goldfisher (1961) Nucleoside-phosphatase activities in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 47: 803-806.
- Parham RA, HM Kaustinen (1976) Differential staining of tannin in sections of epoxy-embedded plant cells. *Stain Technol.* 51:237-240.
- Pearse AGE (1980) *Histochemistry: Theoretical and applied*. 4th ed. Longman Group Limited.
- Pizzolato TD, RD Lillie (1973) Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 56-64.
- Reeve RM (1951) Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain Technol.* 26: 91-96.
- Robert D, JC Roland (1990) *Biologie Végétale. Caractéristiques et stratégies évolutives des plantes*. Doin, Paris.
- Silverberg BA, T Sawa (1973) An ultrastructural and cytochemical study of microbodies in the genus *Nitella* (Characeae). *Can. J. Bot.* 51: 2025-2032.
- Smith MM, ME McCully (1978a) A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. *Protoplasma* 95: 229-254.
- Smith MM, ME McCully (1978b) Enhancing aniline blue fluorescent staining of the cell wall structures. *Stain Technol.* 53: 79-85.
- Svendsen AB, R Verpoorte (1983) *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Thiéry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6: 978-1018.
- Wachstein M, E Essner (1957) Citado por Essner E (1973)
- Warmke HE, S-LJ Lee (1976) Improved staining procedures for semithin epoxy sections of plant tissues. *Stain Technol.* 51: 179-185.
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47: 189-194.
- Yasuma A, T Ichikawa (1953) Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 296-299.

ÍNDICE REMISSIVO

Absorção	1, 2, 4, 5, 6, 10
Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico	21, 43
Acetato de Uranilo	53
Ácido Etilenodiaminotetracético	53
Ácido Perclórico	44
Ácido Periódico	12, 13, 14, 34, 35, 39, 40
Ácido Rubeânico	21
Ácido Sulfúrico	45, 49
Ácido Tânico	17, 41
Acidofilia	3
Ácidos fortes	23
Ácidos gordos	14, 19, 20, 21, 43
Ácidos resínicos	20, 22, 44
Actividade adenosina trifosfatase	54, 62
Actividade da celulase	63
Actividade das peroxidases	56, 63
Actividade fosfatásica ácida	53, 62
Actividade inosina difosfatase	54, 62
Actividade peroxidásica da catalase	55, 63
Actividade tiamina pirofosfatase	55, 63
Agliconas	24, 48
Alcalóides	27, 28, 48, 49
Alocromasia	4
Alocromáticos	4
Amido	10, 13, 16, 39, 51
Artefactos	18, 31, 35
Autofluorescência	28, 48, 49
Auxocromos	2
Azoreacção	26
Azul Brilhante de Comassie	10, 29, 38, 52
Azul de Alciano	15, 18, 39, 42
Azul de Anilina	17, 41
Azul de Astra	28, 50
Azul de Bromofenol	8, 38, 58
Azul de Comassie	38, 58
Azul de Indofenol	22
Azul de Metileno	28, 50, 60
Azul de Metileno-Azur A-Safranina	28
Azul de Metileno-Vermelho de Ruténio	28
Azul de Toluidina	29
Azur A	28, 60
Basofilia	3, 4, 15
Bloqueio dos Aldeídos	51
Bolsas	22
Borracha	24, 45, 46
Calcoflúor	17, 41
Calose	10, 13, 17, 39, 41, 50, 51
Canais	22
Carbonilos	12, 27, 34
Celulase	33, 56
Celulose	10, 13, 39, 41, 50, 51
Ceras	18
Citrato de Chumbo	53
Cloreto de Dansil	24, 46
Cloreto de Ferro III	25, 47
Colesterol	18, 19, 36
Coloração diferencial	20, 22, 28
Coloração dupla	9, 28, 50
Contrastação Regressiva	33, 53
Controlos	3, 14, 18, 31, 35
Cromóforo	1, 2, 3, 20, 26
Cromogénicas	1
Cutícula	50
Desoxirribonucleoproteínas	33
Diacetato de Fluoresceína	10, 38, 59
Diaminobenzidina	33, 63
Diazoreacção	26
Dicromato de Potássio	25, 47
Difusibilidade	8, 11
Digestão enzimática	11, 32
Dimedona	12, 15
Dinitrofenilhidrazina	23, 45
Dióxido de Enxofre	40
Dissacáridos	10
DNA	17, 40
Dragendorff	27, 28, 48, 59
EDTA	21, 33, 53
Eosina	9, 10
Esclerênquima	24, 51
Essências	22
Esteróides	23, 27, 36, 44
Estruturas glandulares	22
Exina	50
Fenóis	24, 25, 26, 39, 47, 48
Ferro Coloidal	35
Fixação	1, 3, 6, 11, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 53, 54, 55, 56
Flavonóides	25, 26, 48, 59
Floroglucinol	3, 26
Fluorescência	1, 5, 10, 17, 21, 24, 26, 28, 38, 45, 48
Fluoreto de Sódio	53, 54, 55
Fluorocromos	5, 6, 10, 26, 48
fluoróforos	5
Fluoroglucinol	47
Formol-Cálcio	18, 21
Fosfatases	33
Fosfolípidos	14, 18, 19, 20, 21, 32
Fosforescência	5
Fucsina	1, 2, 13, 17
Glicogénio	10
Glicósidos	23
Glucosaminoglicanos	17
Gomas vegetais	17
Grupo vic-glicol	11, 39, 40, 41
Grupos aldeído	12, 13, 15
Grupos funcionais	2, 3, 11, 15, 21
HCl 1N	VI, 58, 62
Hematoxilina-Eosina	9

Hidratos de carbono.....	7, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 29, 39, 51, 57	Quitina	10
Hipoclorito de Sódio.....	50, 58	Reacção Ácido Periódico-Reagente de Schiff...	11
Histoquímica.....	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 28, 29, 35, 51	Reacção de Sakaguchi	7, 37
Idioblastos.....	22	Reacção do Biureto	9
Imunocitoquímica.....	30	Reacção metacromática	3
Incubação	31, 32, 33, 53, 54, 55, 56, 62, 63	Reacção Modificada de Abraham.....	23, 45
Intina	50	Reacção Ninidrina-Schiff	8, 37
Iodeto de Potássio	16, 39, 59	Reacções falsamente negativas	2
Isoprenóides	22	Reacções falsamente positivas	2, 21, 30
Isotiocianato de Fluoresceína	10	Reagente de Dittmar.....	49, 59
Lactonas	23, 27, 45	Reagente de Dragendorff	27
Laranja de Acridina	16, 17, 40, 59	Reagente de Ellram	49
Laticíferos	22, 24, 27	Reagente de Nadi.....	22, 44, 59
Lenhina	24, 26, 47	Reagente de Schiff.....	1, 8, 11, 12, 13, 15, 29, 37, 39, 51, 58
Ligações covalentes	8, 37	Reagente de Wagner.....	V, 49, 59
Ligações duplas	1, 2, 19, 21, 35	Redução dos aldeídos	35
Ligações electrostáticas.....	3, 6, 9	Resinas.....	22, 24, 29, 32, 36, 46, 51
Lipase	57	Ribonucleoproteínas.....	33
Lípidos.....	1, 3, 4, 11, 13, 18, 19, 20, 21, 24, 29, 35, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 57	RNA	17, 40
Lisocromos.....	19, 24	Safranina	4, 28, 50, 60
Lugol	16, 39	Sal de diazónio	25
Luz visível.....	7, 11, 17, 19, 22, 24, 25, 27, 37, 39, 41, 42, 44, 45, 47, 48	Secções semi finas	29, 51
Metacromasia	3, 4, 16, 29, 40	Solução de Benedict.....	56, 63
Metenamina de prata	33	Solução de Piridina-Clorofórmio	37, 58
Monossacáridos.....	10, 11	Solução de Tiocarbohidrazida	57
Mucilagens.....	16, 17, 18, 41, 42	Solução de α -Naftol-Hipoclorito	37, 58
Mucopolissacáridos	10, 17, 39, 42	Solução saturada de Dimedona.....	60
Naphtol Yellow	10	Substracto	31, 33, 53, 54, 55, 56, 57
Negro Sudão B	20, 29, 42, 51	Sudões	19, 20
Nitrato de Chumbo.....	54, 55, 62, 63	Sulfato Azul do Nilo	20, 43, 58
Nitrito de Sódio	28, 48	Tampão	29, 30, 31, 35, 53, 55, 56
Oil Red.....	19, 24, 45, 46	Tampão Acetato-Cacodilato	55
Oligossacáridos	10, 11	Tampão Cacodilato.....	54, 55, 56
Oxidases.....	33	Tampão Fosfato.....	28, 31, 38, 40, 41, 43, 44, 56, 57, 59, 60, 63
PAS.....	6, 7, 11, 13, 14, 15, 17, 28, 29, 34, 35, 39, 40, 51	Tampão Fosfato de Na	56
PATAg	34, 35, 57	Tampão PIPES	53
PBS.....	40, 59, 60	Tampão Tris	54, 55, 60, 61, 62, 63
Pectinas	16, 35, 40, 41	Tampão Tris- Maleato.....	61
Peróxido de Hidrogénio.....	56, 57, 63	Tampão Tris-Maleato.....	54, 55
Polietilenoglicol	43	Tampão Veronal	47, 61
Polissacáridos.....	4, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 29, 32, 34, 35, 39, 40, 41, 51	Taninos.....	17, 24, 26, 48, 51
Polissacáridos ácidos.....	11, 35	Temperatura.....	5, 14, 18, 19, 30, 31, 37, 38, 42, 44, 53, 54, 55, 56
Pré-fixação.....	30, 31	Terpenóides.....	22, 44, 45
Pré-tratamentos	1	Tetrahidreto Boreto de Sódio...12, 15, 39, 40, 44, 45, 51, 57	
Pronase	V, 56, 65	Tetróxido de ósmio	34
Proteínas.....	3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 24, 29, 30, 32, 33, 34, 37, 38, 46, 52, 53	Tiocarbohidrazida	34
Proteínato de prata	34	Tiocianato Ferroso.....	45, 59
Pseudo Schiff.....	40, 58	Tiosemicarbazida.....	34
		Toluidina	4, 28, 29, 51
		Tricloreto de Antimónio	22, 44
		Tricloreto de Ferro	41, 47

Tricomas.....	7, 22
Triglicéridos	18
UV.....	1, 2, 5, 10, 16, 17, 21, 24, 26, 28, 38, 40, 44, 45, 46, 48, 49
Vacúolos.....	27
Vanilina Clorídrica	26, 48
Verde Iodo- Carmim Aluminado.....	28, 50
Vermelho de Ruténio.....	16, 18, 35, 40, 42, 58
Vermelho Neutro	21, 44
Vermelho Sudão.....	20, 42, 43
Visualização	1, 11, 15
Xilema.....	24