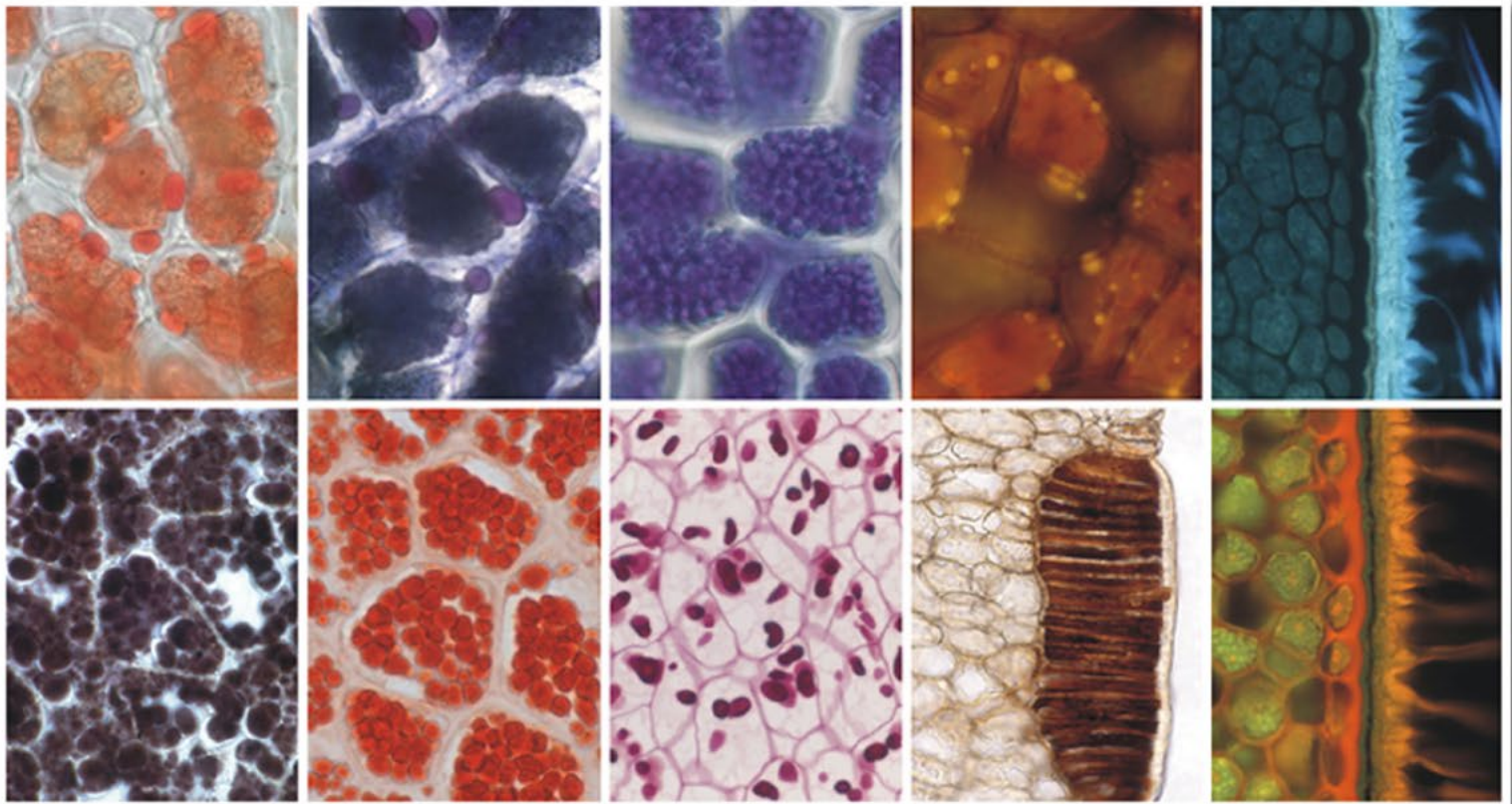


Métodos Histoquímicos Aplicados às Sementes

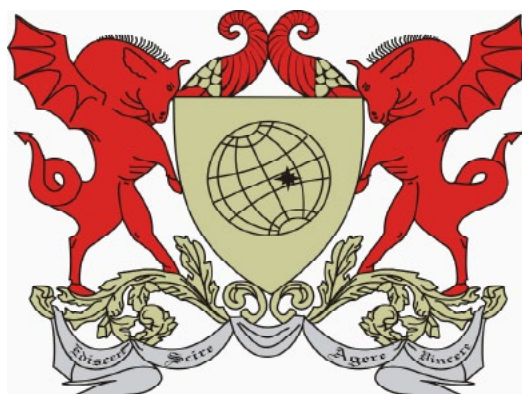


MARÍLIA CONTIN VENTRELLA

ANDREA LANNA ALMEIDA

LAYS ARAÚJO NERY

VICTOR PEÇANHA DE MIRANDA COELHO



Universidade Federal de Viçosa

Reitora

Nilda de Fátima Ferreira Soares

Vice-Reitor

Demetrius David da Silva

Conselho Editorial

Andréa Patrícia Gomes

João Batista Mota

José Benedito Pinho

José Luiz Braga

Tereza Angélica Bartolomeu



Coordenadoria de
Educação Aberta e a Distância

Diretor

Frederico Vieira Passos

Prédio CEE, Avenida PH Rolfs s/n

Campus Universitário, 36570-000, Viçosa/MG

Telefone: (31) 3899 2858 | Fax: (31) 3899 3352

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

M593	Métodos histoquímicos aplicados às sementes [recurso eletrônico] / Marília Contin Ventrella ... [et al.]. – Viçosa,
2013	MG : Ed. UFV, 2013. 10,6MB ; ePUB. – (Conhecimento, ISSN 2179-1732 ; n.18)
	1. Plantas - Anatomia. 2. Histoquímica. 3. Sementes. I. Ventrella, Marília Contin, 1968-. II. Almeida, Andrea Lanna, 1986-. III. Nery, Lays Araújo, 1988-. IV. Coelho, Victor Peçanha de Miranda, 1980-. V. Universidade Federal de Viçosa. Reitoria. Coordenadoria de Educação Aberta e a Distância.
	CDD 22. ed. 571.32

SUMÁRIO

I PRINCIPAIS COMPOSTOS PRESENTES EM SEMENTES	7
II MATERIAL EMPREGADO E SECCIONAMENTO	8
III MÉTODOS HISTOQUÍMICOS	9
1. LIPÍDIOS	10
1.1. LIPÍDIOS TOTAIS	10
1.1.1. SUDAN III, SUDAN IV, E SUDAN BLACK B	10
1.1.2. SUDAN RED B	12
1.1.3. VERMELHO NEUTRO	13
1.2. LIPÍDIOS NEUTROS	14
1.2.1. SULFATO AZUL DO NILO	14
1.3. LIPÍDIOS INSATURADOS	15
1.3.1. TETRÓXIDO DE ÓSMIO	15
1.4. ÓLEOS ESSENCIAIS E OLEORRESINAS	16
1.4.1. REAGENTE NADI	16
1.5. BORRACHA	17
1.5.1. OIL RED	17
2. PROTEÍNAS	18
2.1. XILIDINE PONCEAU (XP)	18
2.2. ANILINE BLUE BLACK	19
2.3. AZUL DE COOMASSIE	20
2.4. AZUL DE BROMOFENOL	21
3. CARBOIDRATOS	22
3.1. POLISSACARÍDEOS NEUTROS	22
3.1.1. REAGENTE DE SCHIFF/ ÁCIDO PERIÓDICO – PAS	22
3.2. AMIDO	24
3.2.1. REAGENTE DE LUGOL	24
3.2.2. LUZ POLARIZADA	25

3.3. PECTINAS	26
3.3.1. VERMELHO DE RUTÊNIO	26
3.3.2. CORIFOSFINA	27
3.4. β-1,3 E β-1,4 GLUCANOS	28
3.4.1. CALCOFLUOR WHITE	28
3.5. MUCILAGEM	29
3.5.1. AZUL DE TOLUIDINA	29
3.6. CALOSE	30
3.6.1. AZUL DE ANILINA	30
4. COMPOSTOS FENÓLICOS	31
4.1. COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO ESTRUTURAIS	31
4.1.1. CLORETO FÉRRICO	31
4.1.2. DICROMATO DE POTÁSSIO	32
4.1.3. VANILINA CLORÍDRICA	33
4.2. COMPOSTOS FENÓLICOS ESTRUTURAIS: LIGNINA	34
4.2.1. FLOROGLUCINA ÁCIDA	34
4.3. COMPOSTOS FENÓLICOS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS	35
4.3.1. AZUL DE TOLUIDINA	35
5. ALCALÓIDES	37
5.1. REAGENTE DE WAGNER	37
5.2. REAGENTE DE DITTMAR	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Métodos histoquímicos aplicados às sementes

Marília Contin **Ventrella**

Andrea Lanna **Almeida**

Lays Araújo **Nery**

Victor Peçanha de Miranda **Coelho**

APRESENTAÇÃO

Esta apostila é uma coletânea de métodos histoquímicos relacionados à detecção de compostos estruturais, de reserva e do metabolismo secundário presentes em sementes. Os métodos originais foram referenciados e os métodos propostos podem apresentar pequenas modificações em relação aos originais, além de algumas opções de uso e comentários. Para orientar a avaliação dos resultados, foram selecionadas fotomicrografias de materiais exibindo reação positiva para os diferentes testes histoquímicos apresentados.

I. PRINCIPAIS COMPOSTOS PRESENTES EM SEMENTES

De maneira geral, as sementes são constituídas pelo envoltório protetor (tegumento), material de reserva (endosperma ou, em alguns casos, perisperma) e embrião. O tegumento pode variar em número - de um a dois ou até estar ausente - e é constituído predominantemente por carboidratos, como celulose, hemiceluloses e pectinas, além de compostos fenólicos (por exemplo, lignina e lipídios, como cutina e ceras).

O endosperma pode estar presente ou não na semente madura e, assim como o embrião (eixo embrionário e cotilédones) e outros tecidos seminais, acumular substâncias orgânicas de reserva, como lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios de reserva são os triacilgliceróis, localizados em corpos lipídicos, e as proteínas mais abundantes são as globulinas e prolaminas, localizadas em corpos proteicos. Os carboidratos de reserva são o amido, localizado em amiloplastos, as hemiceluloses, constituintes da parede celular, além de sacarose e oligossacarídeos da série rafínósica - estes últimos localizados nos vacúolos. Metabólitos secundários como taninos, terpenoides e alcaloides também podem ocorrer nas células ordinárias ou em estruturas secretoras presentes em diferentes partes das sementes.



II. MATERIAL EMPREGADO E SECCIONAMENTO

A histoquímica é a associação de técnicas histológicas a métodos físicos e químicos que permite identificar, localizar e, algumas vezes, quantificar compostos ou grupos de compostos químicos em células e tecidos.

Os testes histoquímicos devem ser realizados, preferencialmente, em material fresco, mas também podem ser aplicados em material fixado, sem inclusão ou incluído em parafina ou metacrilato (resina), embora algumas limitações estejam associadas ao processamento do material empregado.

A consistência, o tamanho e o tipo de processamento do material determinam o modo de seccionamento. Material sem inclusão (fresco ou fixado) pode ser seccionado à mão livre, em micrótomo de mesa ou em criomicrotomo, e material incluído em parafina ou metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo ou micrótomo rotativo de avanço automático.

Os cortes obtidos a partir de material sem inclusão, geralmente, são mais espessos e a coloração tende a ser mais intensa, mas alguns compostos podem ser “arrastados” do local de origem durante o seccionamento. Já os cortes obtidos a partir de material incluído em metacrilato ou parafina são mais delgados e a coloração tende a ser mais tênue, mas há maior garantia da compartimentalização real dos compostos e melhor resolução da imagem.

O sucesso dos testes aplicados em material fixado e incluído depende também da manutenção do composto que se quer identificar após o processo de fixação e inclusão e/ou da interação do reagente com o meio de inclusão. Por exemplo, lipídios de reserva são parcialmente extraídos durante o processo de inclusão em metacrilato ou parafina, enquanto soluções alcoólicas como o sudan interagem com o metacrilato, podendo interferir negativamente no resultado final.

Os testes realizados em material fresco devem servir como referência para a análise dos resultados, pois não estão sujeitos à interação com fixadores, solventes e meios de inclusão. Além da realização do controle, é recomendada a comparação dos resultados com o branco (material sem a aplicação de reagentes ou corantes), pois a coloração natural de algumas células pode ser semelhante ao resultado positivo esperado para um dado teste histoquímico ou interferir na coloração final. Recomenda-se, também, o uso de material referência para assegurar a eficácia do reagente e do procedimento realizado. Pode-se considerar como material-referência aquele no qual há ocorrência comprovada de um dado composto: por exemplo, sementes de feijão para detecção de amido ou sementes de soja para detecção de lipídio e proteína.

III. MÉTODOS HISTOQUÍMICOS

LIPÍDIOS

1.1. Lipídios totais

1.1.1. Sudan III, sudan IV e sudan black B (Método original: Pearse, 1972)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato* ou parafina).

Reagente: Sudan III, sudan IV ou sudan black B 0,3% em etanol 70%.

Preparo: Sudan (III, IV ou *black B*).....3g
Etanol 70%100mL
Aqueça até a solução entrar em ebulição. Deixe esfriar.
Utilize o sobrenadante da solução.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de sudan recém-filtrada por 15 a 30 minutos, em recipiente fechado (evite a evaporação do solvente e a formação de precipitados)
- Lave rapidamente em etanol 70%
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

***Procedimento para material incluído em metacrilato** (Método original: O'Brien e McCully, 1981)

- Coloque a lâmina com os cortes em placa de petri, forrada com papel de filtro saturado com água
- Pingue algumas gotas de sudan recém-filtrado sobre os cortes
- Tampe a placa de petri (evitar a evaporação do solvente e a formação de precipitados)
- Aguarde de 30 a 60 minutos
- Lave delicadamente em uma placa de petri com água (o metacrilato "enruga" em contato com a solução alcoólica e os cortes podem descolar nesse momento)
- Seque em temperatura ambiente
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

Resultado: os lipídios coram de alaranjado com Sudan III (Figura 1), de vermelho com Sudan IV (Figura 2), e de azul a negro com sudan black B (Figuras 3-4).

Controle: extraia os lipídios com solventes orgânicos ou realize o teste em material-referência.

Observação: em sementes oleaginosas, os reagentes específicos para identificação de lipídios coram parte do citoplasma onde se localizam os corpos lipídicos (não visíveis em microscopia de luz) e gotículas lipídicas, formadas durante o seccionamento do material. A inclusão em metacrilato ou parafina pode extrair parcialmente lipídios de reserva (triacilgliceróis), mas preserva lipídios estruturais (cutina e ceras).



Fig. 1-2. Cotilédones de sementes de *Bauhinia variegata* (Caesalpinaceae) fixados em FAA₅₀ e seccionados em micrótomo de mesa. 1. Corado com sudan III. 2. Corado com sudan IV. Go, gotícula lipídica.

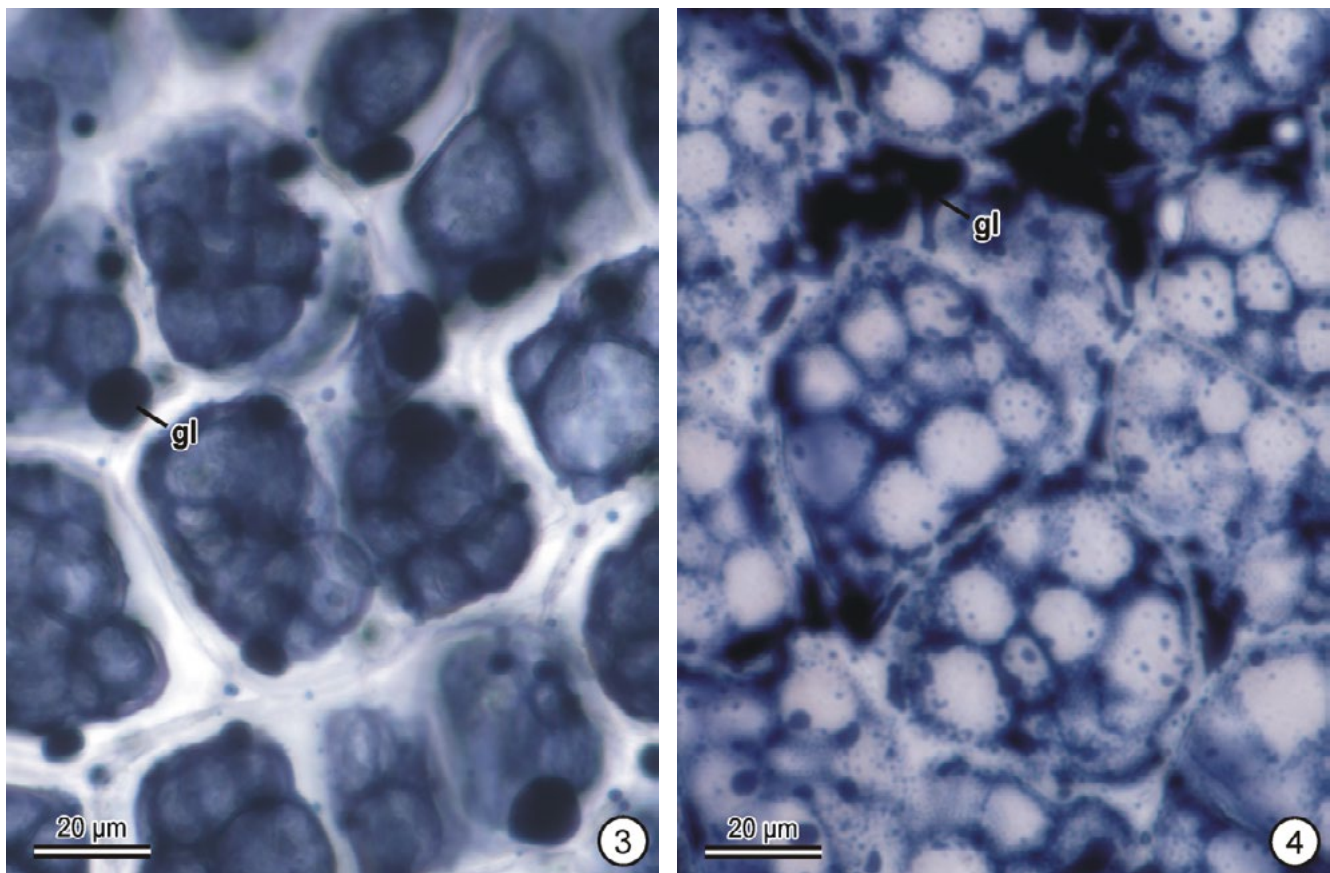


Fig. 3-4. Cotilédone de semente de *Bauhinia variegata* (Caesalpinaceae) fixado em FAA₅₀ e corado com sudan black B. 3. Seccionado em micrótomo de mesa. 4. Incluído em metacrilato e seccionado em micrótomo rotativo. Go, gotícula lipídica.

1.1.2. Sudan red B (Método original: Brundrett et al., 1991)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato* ou parafina).

Reagente: Sudan red B 1% em etanol 95% e glicerina (1:1; v:v).

Preparo: Sudan red B1g

Etanol 95%.....100mL

Aqueça até a solução entrar em ebulição. Deixe esfriar.

Glicerina.....100 mL

Utilize o sobrenadante da solução.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de sudan recém-filtrada por 15 a 30 minutos, em recipiente fechado (evite a evaporação do solvente e a formação de precipitados)
- Lave rapidamente em etanol 70%
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

* **Procedimento para material incluído em metacrilato:** ver item 1.1.1.

Resultado: os lipídios coram de vermelho com sudan red B (Fig. 5-6).

Controle: extrair os lipídios com solventes orgânicos ou realizar o teste em material-referência.

Observação: sudan red B também pode ser preparado em solução alcóolica, como descrito no item 1.1.1, desde que solubilizado em etanol 95%.

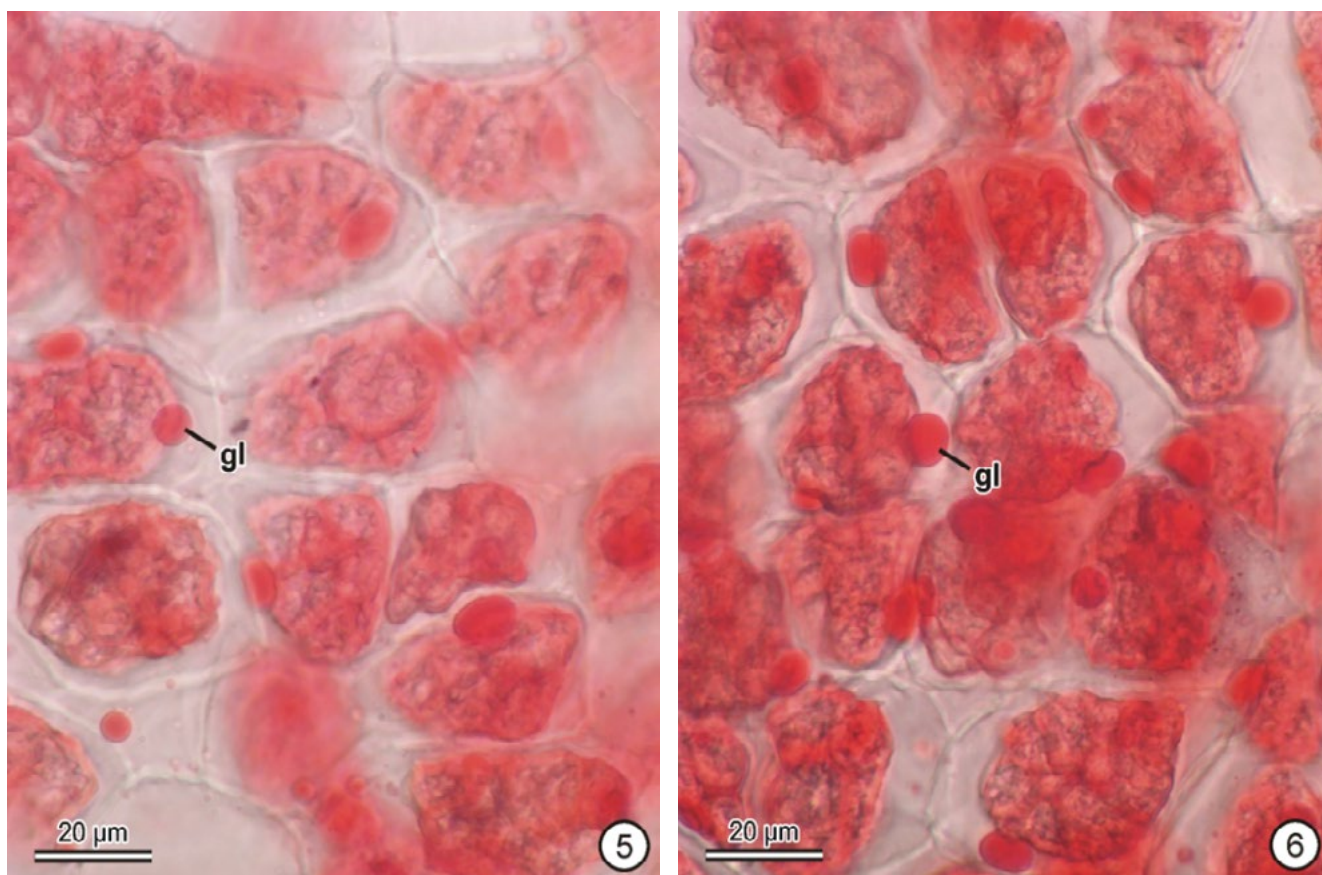


Fig. 5-6. Cotilédones de sementes de *Bauhinia variegata* (Caesalpiniaceae) fixados em FAA₅₀ e seccionados em micrótomo de mesa. 5. Corado com sudan red B glicerinado. 6. Corado com sudan red B alcóolico. Go, gotícula lipídica.

1.1.3. Vermelho neutro (Método original: Kirk, 1970)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagente: Vermelho neutro 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5.

Preparo: Vermelho neutro 1%.....1 g
Tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5.....100mL
Aqueça até a solução entrar em ebulição.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de vermelho neutro por 20 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

Resultado: os lipídios emitem fluorescência secundária amarela sob luz ultravioleta (UV) (Fig. 7-8).

Controle: extraia os lipídios com solventes orgânicos ou realize o teste em material-referência ou compare com a autofluorescência do mesmo material sob luz UV.

Observação: como o vermelho neutro é preparado em solução aquosa, não há restrições de uso em material incluído em metacrilato, principalmente na detecção de lipídios estruturais (Fig. 8).

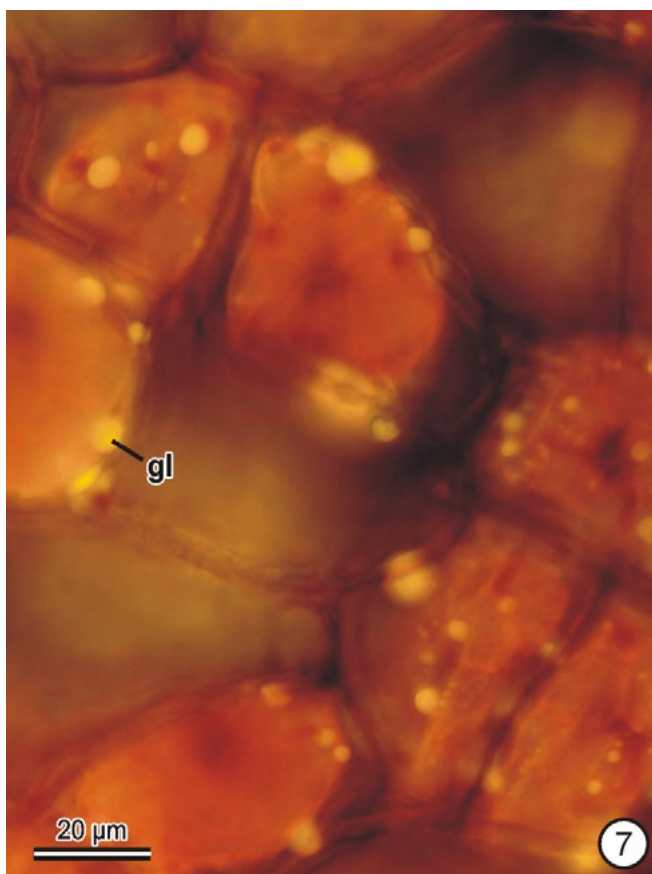


Fig. 7. Cotilédone de semente de *Bauhinia variegata* (Caesalpiniaceae) fixado em FAA_{50'}, seccionado em micrótomo de mesa e corado com vermelho neutro, sob luz UV. Go, gotícula lipídica.

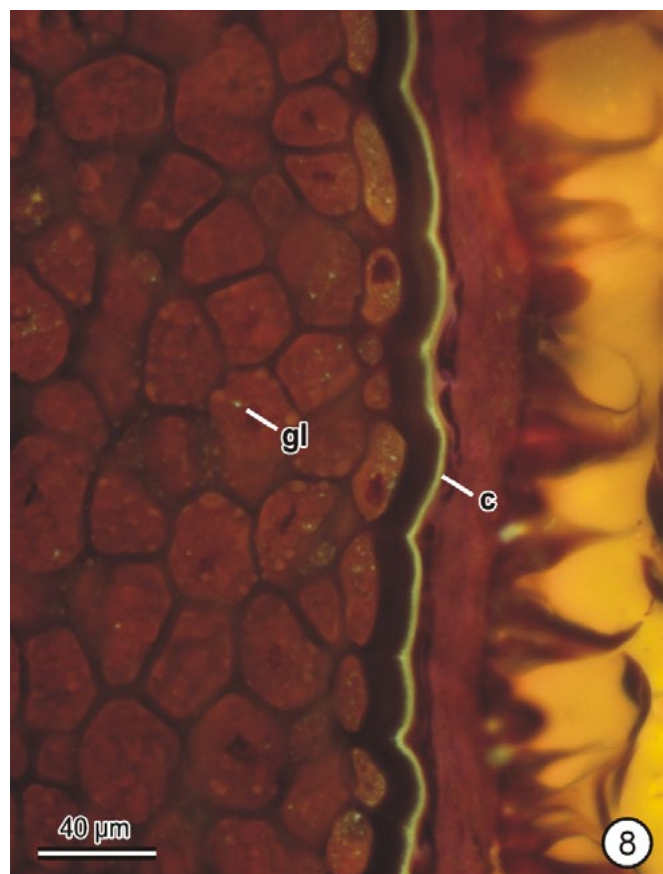


Fig. 8. Semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) fixada em FAA_{50'}, incluída em metacrilato, seccionada em micrótomo rotativo e corada com vermelho neutro, sob luz UV. C, cutícula; go, gotícula lipídica.

1.2. Lipídios neutros

1.2.1. Sulfato azul do Nilo (Método original: Cain, 1947)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado).

Reagente: Solução de sulfato azul do Nilo 1% em ácido sulfúrico 1%.

Preparo: Sulfato azul do Nilo.....1 g
Água destilada95 mL
Ácido sulfúrico 1%.....5 mL
Ferva a solução por 4 horas, esfrie, filtre e guarde. Mantenha a solução com pH 2.0.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de azul do Nilo 1% em ácido sulfúrico 1% por 5 a 10 minutos a 60 °C, em recipiente fechado (evitar a evaporação do solvente e a formação de precipitados)
- Lave em ácido acético por 30 a 60 segundos a 60 °C
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

Resultado: os lipídios neutros coram de rosa e lipídios ácidos coram de azul (Fig. 9).

Controle: extraia os lipídios com solventes orgânicos ou realize o teste em de material referência.

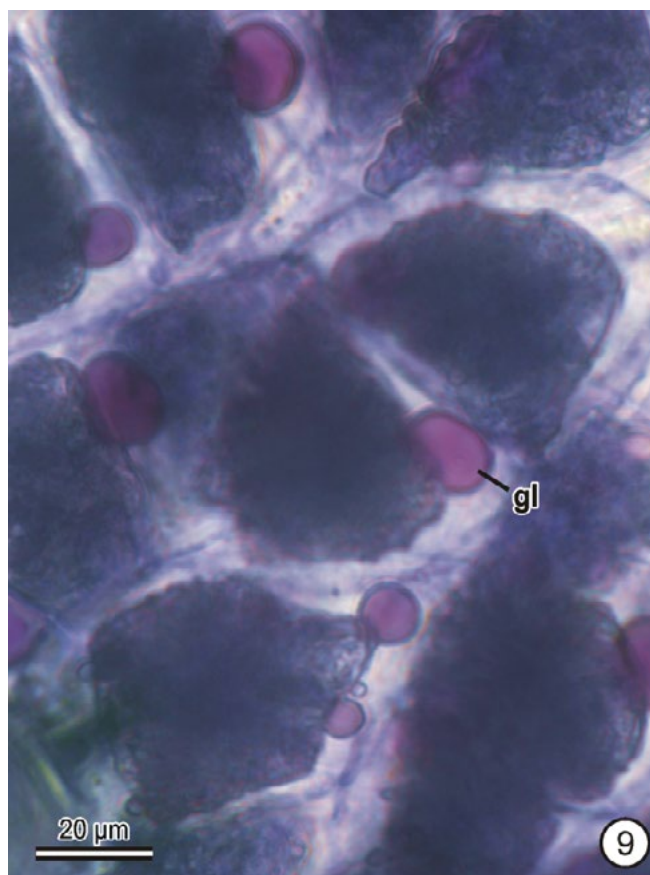


Fig. 9. Cotilédone de semente de *Bauhinia variegata* (Caesalpiniaceae) fixado em FAA_{50'}, seccionado em micrótomo de mesa e corado com azul do Nilo. Go, gotícula lipídica.

1.3. Lipídios insaturados

1.3.1. Tetróxido de ósmio (Método original: Ganter e Jollés, 1969/1970)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado).

Reagente: Solução aquosa de tetróxido de ósmio 1%.

Preparo: Tetróxido de ósmio.....1g
Água destilada.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 1 hora (devido à toxicidade do reagente, realize o procedimento em capela de exaustão, com luvas)
- Lave em água destilada
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

Resultado: os lipídios insaturados coram de negro (Fig. 10).

Controle: extraia os lipídios com solventes orgânicos ou realize o teste em material-referência.

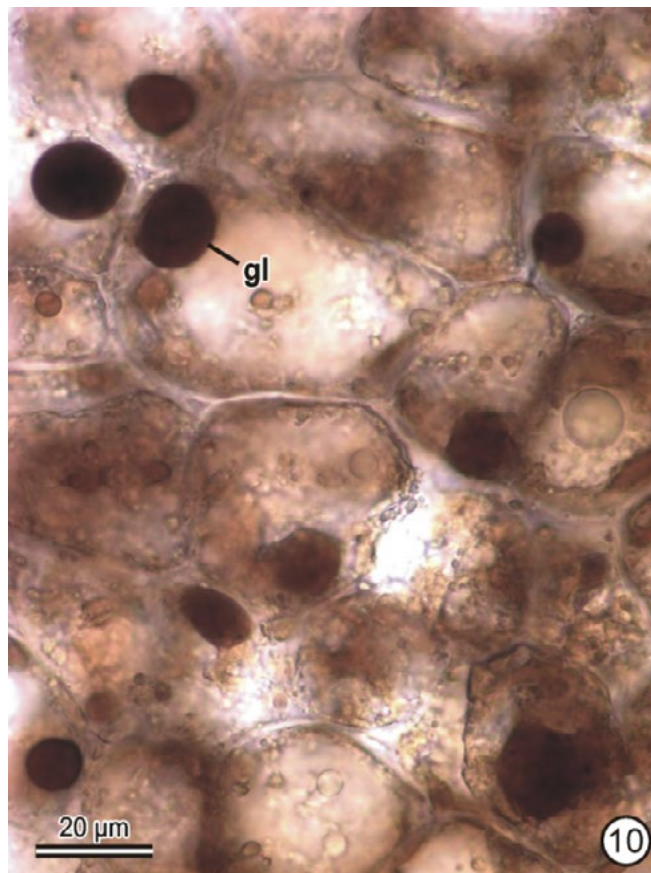


Fig. 10. Embrião de semente de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) fixado em FAA_{50'}, seccionado em micrótomo de mesa e corado com tetróxido de ósmio. Go, gotícula lipídica.

1.4. Óleos essenciais e oleorresinas

1.4.1. Reagente NADI (Método original: David & Carde, 1964)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado).

Reagentes: NADI (α -naftol e cloridrato de dimetilparafenileno diamina) e tampão fosfato de sódio 0,05M.

Preparo: Solução A: α -naftol 0,1% em etanol 40%

α -naftol0,01g

Etanol 40% 1mL

Solução B: cloridrato de dimetilparafenileno diamina 1%

Cloridrato de dimetilparafenileno diamina.....0,01g

Água..... 1mL

Solução C: tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,2

Solução D: tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2

Solução A (0,5 mL) + solução B (0,5 mL) + solução C (49 mL)

Procedimento:

- Coloque os cortes no reagente recém-preparado por 1 hora, no escuro
- Lave rapidamente na solução D por aproximadamente 2 minutos
- Observe imediatamente, pois a reação é efêmera

Resultado: terpenos coram de azul (óleos essenciais) a vermelho (oleorresinas) e adquirem coloração violeta a púrpura quando ocorrem misturas de óleos essenciais e oleorresinas (Fig. 11-12).

Controle: extraia os terpenos com solventes orgânicos ou realize o teste em de material referência.

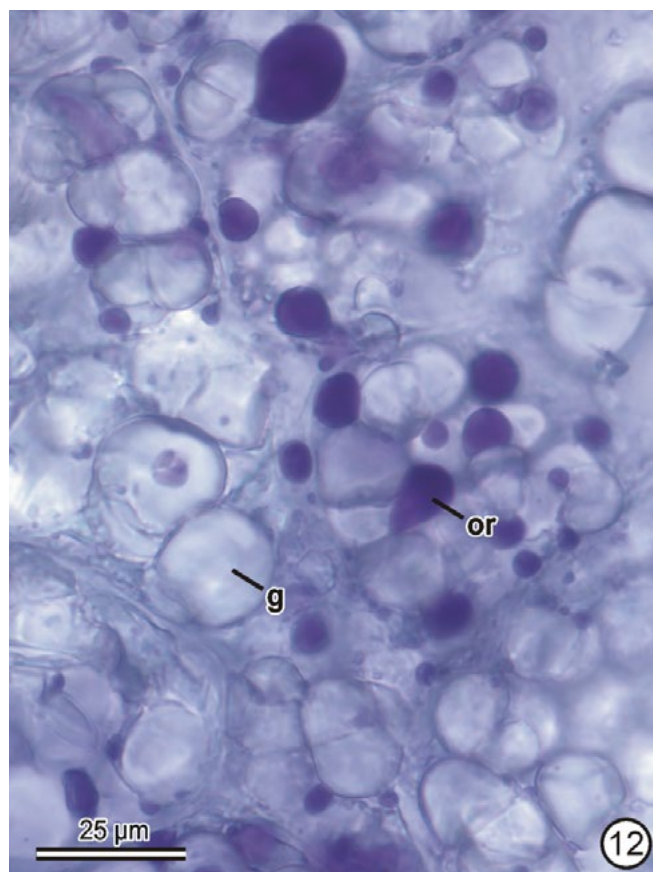
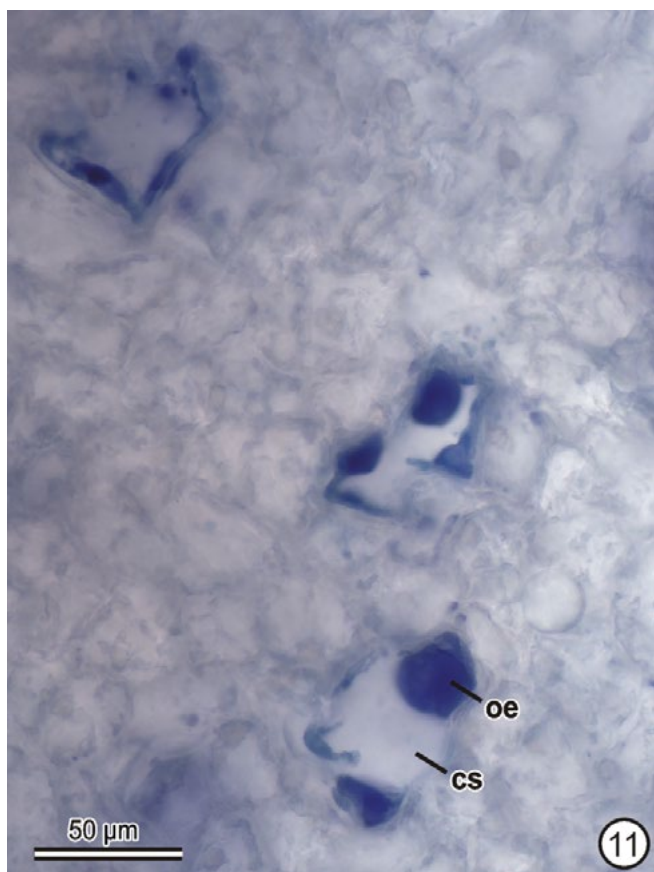


Fig. 11-12. Semente de *Myristica fragans* (Myristicaceae) reidratada, seccionada em micrótomo de mesa e corada com reagente NADI. 11. Embrião. 12. Endosperma. Cs, célula secretora; g, grão de amido; ol, óleo essencial; or, óleo-resina.

1.5. Borracha

1.5.1. Oil red (Método original: Pearse, 1968 modificado por Jayabalan & Shah, 1968)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado).

Reagente: Solução saturada de oil red O em ácido fórmico 90%.

Preparo: Oil red O x g
Ácido fórmico 90%.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes no reagente por 5 minutos
- Lave em água
- Monte em água ou glicerina 50%

Resultado: partículas de borracha coram de vermelho (Fig. 13)

Controle: realize o teste em material-referência.

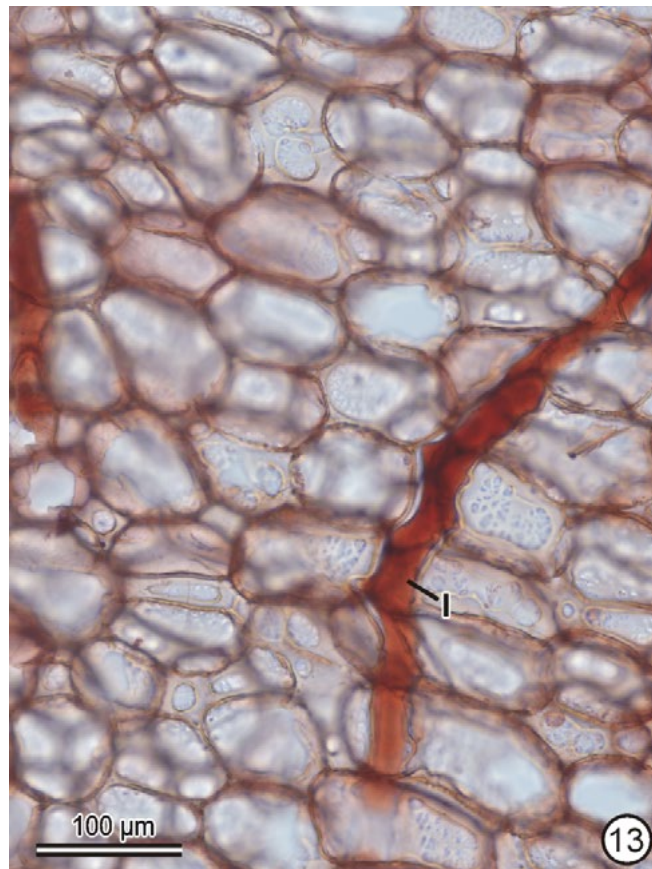


Fig. 13. Tegumento da semente de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) fixado em FAA₅₀, seccionado em criomicrotomo e corado com oil red. L, laticífero.

2.1. Xilidine Ponceau (Método original: Vidal, 1970)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagente: Xilidine Ponceau 0,1% em ácido acético 3%.

Preparo: Xilidine Ponceau.....0,1 g
 Ácido acético 3%..... 100 mL
 Acertar pH da solução de xilidine Ponceau em 2,5 com ácido clorídrico.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de xilidine Ponceau por 15 a 30 minutos
- Lave em ácido acético 3% por 5 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permount, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: os corpos proteicos coram de vermelho (Fig. 14-15).

Controle: utilize secções tratadas com solução de anidrido acético 10% em piridina por 2 a 4 horas; uso de material-referência.

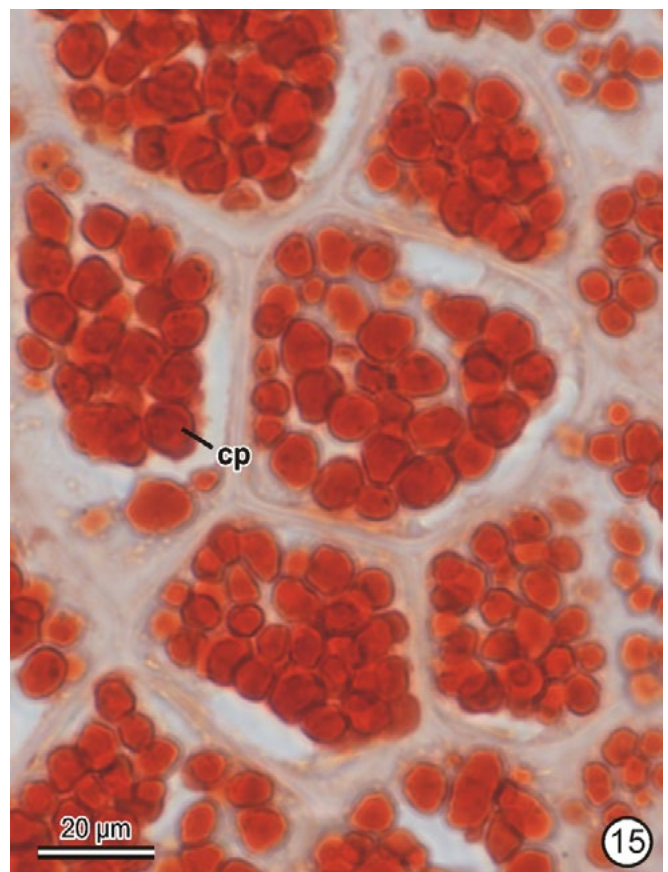
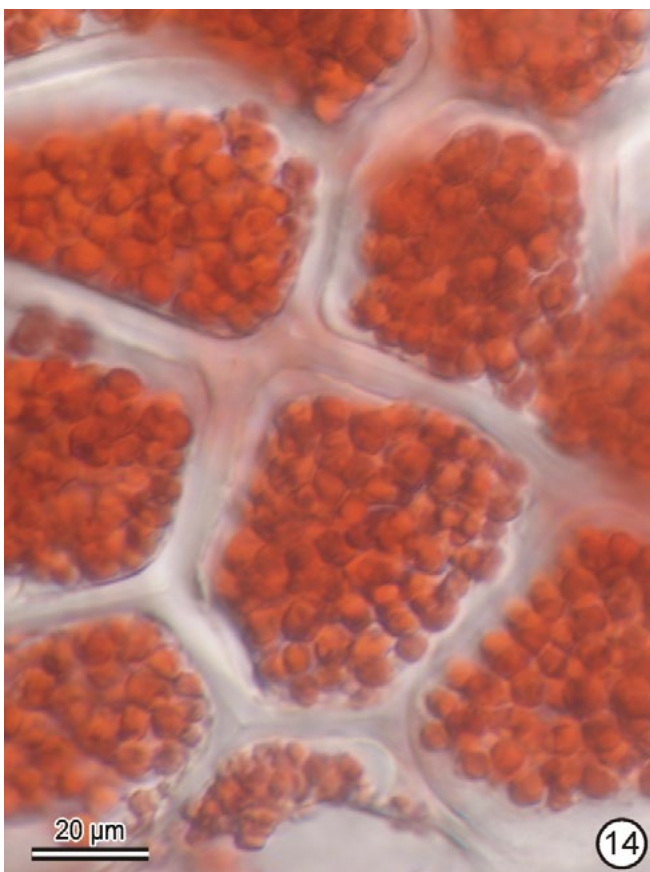


Fig. 14-15. Endosperma de semente de *Lycopersicum esculentum* (Solanaceae) fixado em FAA₅₀ e corado com XP. 14. Sem inclusão seccionado em criomicrotomo. 15. Incluído em metacrilato e seccionado em microtomo rotativo. Cp, corpo proteico.

2.2. Aniline blue black (Método original: Fisher, 1968)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagente: Aniline blue black 1% em ácido acético 7%.

Preparo: Aniline blue black.....1 g
Ácido acético 7%.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de aniline blue black por 10 minutos
- Lave em ácido acético 7% por 10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permount, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: os corpos proteicos coram de azul (Fig. 16-17).

Controle: utilize secções tratadas com solução de anidrido acético 10% em piridina por 2 a 4 horas; uso de material-referência.

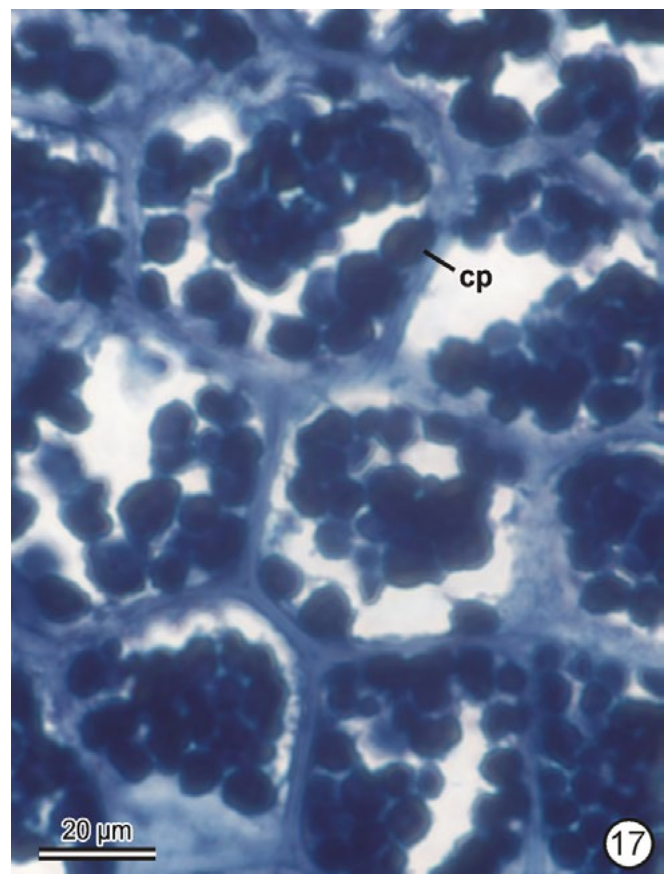
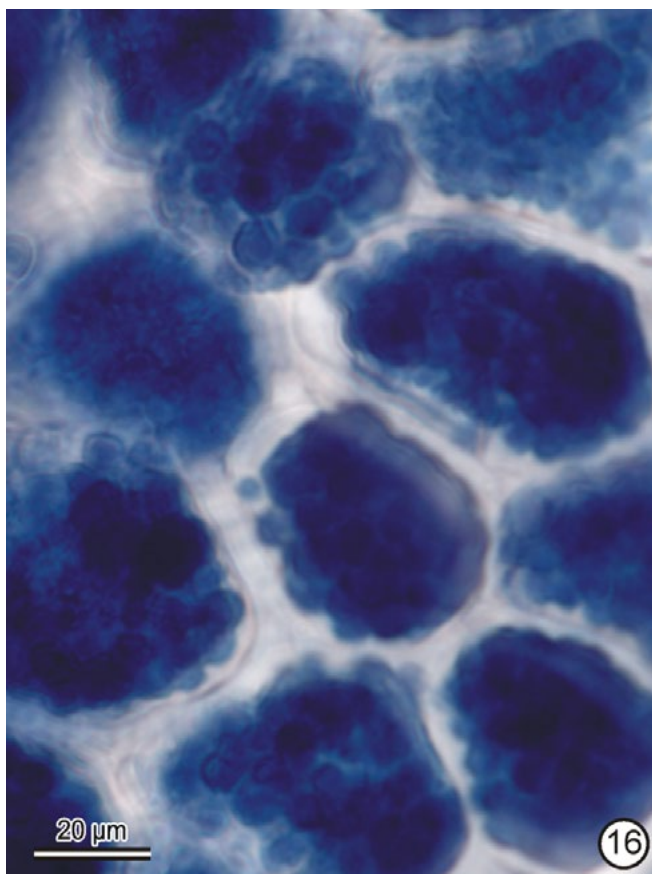


Fig. 16-17. Endosperma de semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) fixado em FAA₅₀ e corado com aniline blue black. 16. Sem inclusão seccionado em criomicrotomo. 17. Incluído em metacrilato e seccionado em microtomo rotativo. Cp, corpo protéico.

2.3. Azul brilhante de Coomassie (Método original: Fisher, 1968)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagente: Azul brilhante de Coomassie 0,25% em ácido acético 7%.

Preparo: Coomassie brilliant blue R250.....0,25 g
Ácido acético 7%..... 100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de azul brilhante de Coomassie por 3 minutos
- Lave em ácido acético 7% por 10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permout, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: os corpos proteicos coram de azul claro (Fig. 18-19).

Controle: utilize secções tratadas com solução de anidrido acético 10% em piridina por 2 a 4 horas; uso de material-referência.

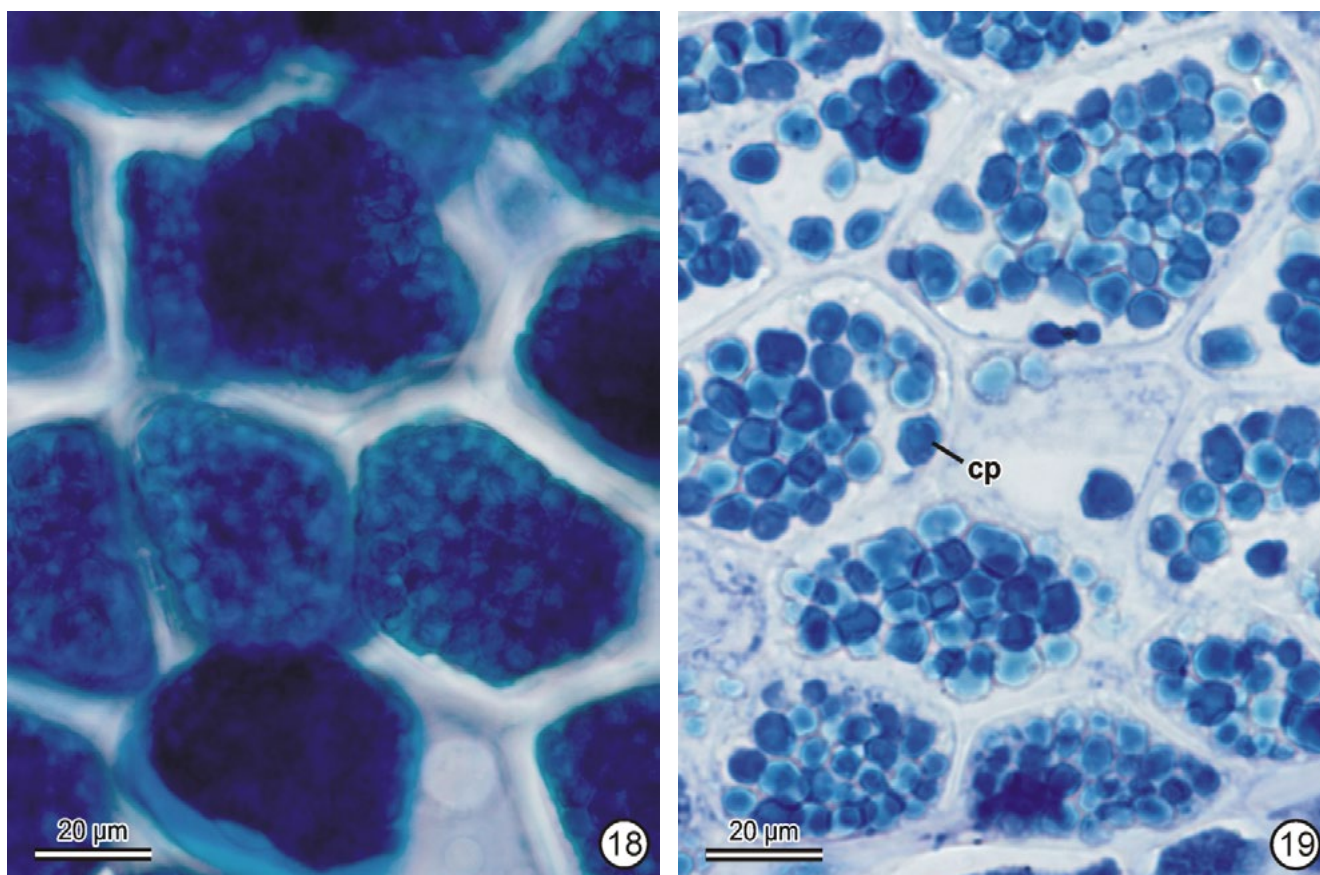


Fig.18-19. Endosperma de semente de *Lycopersicum esculentum* (Solanaceae) fixado em FAA₅₀ e corado com azul de Coomassie. 18. Sem inclusão e seccionado em criomicrotomo. 19. Incluído em metacrilato e seccionado em microtomo rotativo. Cp, corpo proteico.

2.4. Azul de bromofenol (Método original: Mazia et al., 1953)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagente: Solução alcoólica de azul de bromofenol 0,1% e cloreto de mercúrio 10%.

Preparo: Azul de bromofenol.....0,1 g
 Cloreto de mercúrio.....10 g
 Etanol 95%.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de azul de bromofenol até os cortes apresentarem coloração azul, em recipiente fechado (evitar a evaporação do solvente e a formação de precipitados)
- Lave em ácido acético 0,5% por 15 minutos
- Lave em água por 3 minutos
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permout, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: os corpos proteicos coram de azul escuro a roxo (Fig. 20-21).

Controle: utilize secções tratadas com solução de anidrido acético 10% em piridina por 2 a 4 horas; uso de material-referência.

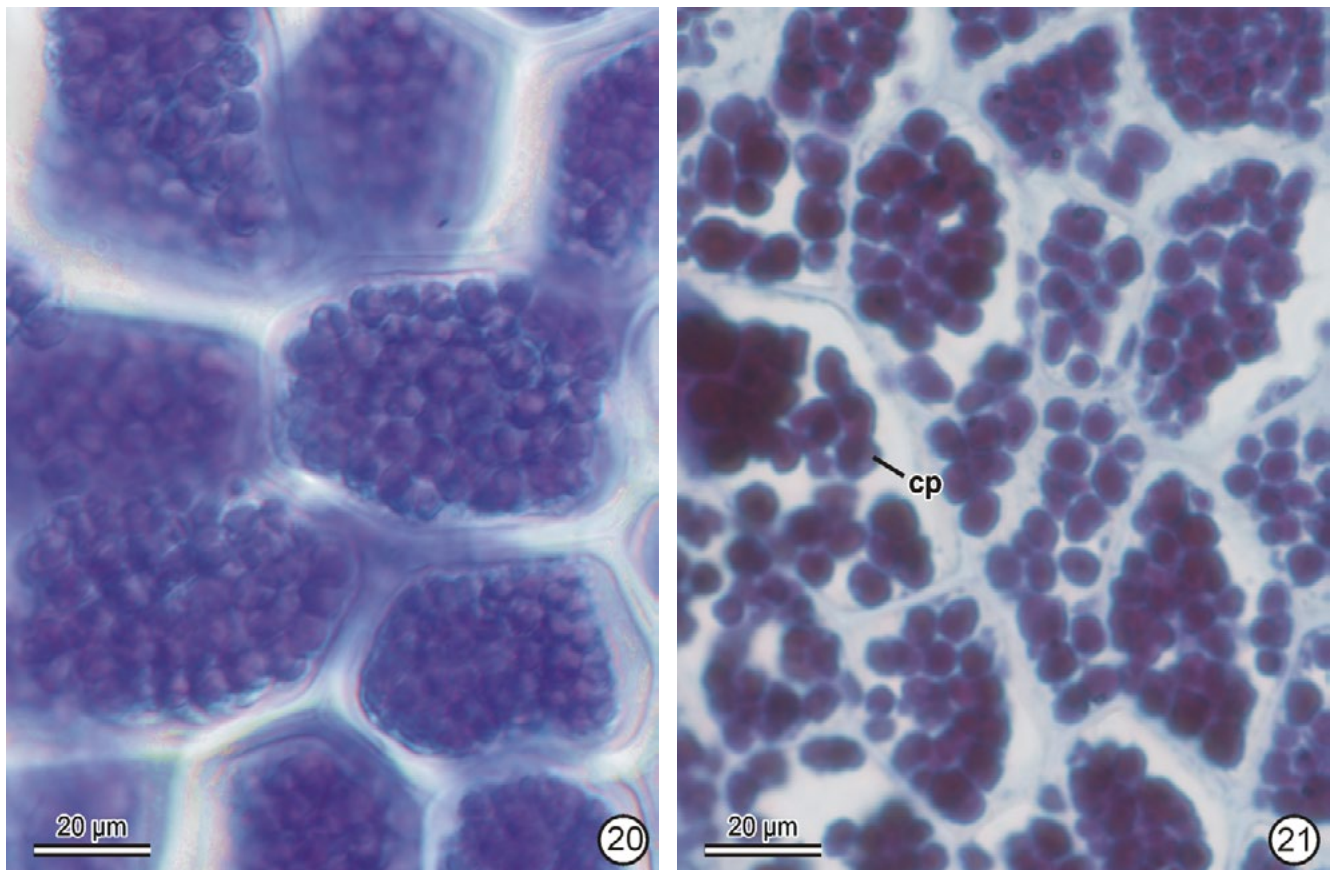


Fig. 20-21. Endosperma de semente de *Lycopodium esculentum* (Solanaceae) fixado em FAA₅₀ e corado com azul de bromofenol. 20. Sem inclusão e seccionado em criomicrotomo. 21. Incluído em metacrilato e seccionado em microtomo rotativo. Cp, corpo proteico.

3.1. Polissacarídeos neutros

3.1.1. Reagente de Schiff/ ácido periódico – PAS (Método original: O'Brien & McCully, 1981)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: ácido periódico 0,5%, reagente de Schiff e água sulfurosa.

Preparo:

Ácido periódico 0,5%

Ácido periódico0,5g

Água destilada.....100mL

Reagente de Schiff

Fucsina básica (fucsina diamante).....1g

Metabissulfito de sódio.....4g

Ácido clorídrico 1N.....2 mL

Água destilada.....100 mL

Carvão ativado em pó.....1g

Ferva a água, adicione a fucsina básica e deixe esfriar até 60° C. Adicione o metabissulfito de sódio e o ácido clorídrico. Filtre a solução com papel duplo e deixe em repouso absoluto por 24 horas, no escuro (cubra o frasco com papel laminado). Adicione o carvão ativado e agite vigorosamente. Filtre a solução em papel duplo. A coloração final deve ficar entre incolor e cor de palha (caso contrário, acrescente mais 1 g de carvão ativado e filtre novamente). Armazene o reagente de Schiff em frasco âmbar revestido com papel laminado, sob refrigeração.

Água sulfurosa

Metabissulfito de sódio.....0,5g

Ácido clorídrico 1N.....5 mL

Água destilada.....100 mL

Prepare a solução no momento do uso para as lavagens.

Procedimento:

- Oxide os cortes em solução aquosa de ácido periódico 0,5% (prepare a solução no momento do uso) por 9 minutos
- Lave 3 vezes em água destilada por 3 minutos cada. Recomenda-se realizar a oxidação dos cortes no dia anterior ao teste
- Trate os cortes com reagente de Schiff por 30 minutos, no escuro
- Lave 3 vezes em água sulfurosa por 3 minutos cada
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permout, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultados: polissacarídeos neutros coram de magenta (Fig. 22-23).

Controle: aplique o método sem a oxidação em ácido periódico. O controle é indispensável, pois a ocorrência de falso-positivo é usual.

Observação: materiais fixados em aldeídos (glutaraldeído, paraformaldeído, Karnovsky) devem ser previamente tratados com solução de glicina 0,15M em tampão fosfato 0,1M por 12 horas.

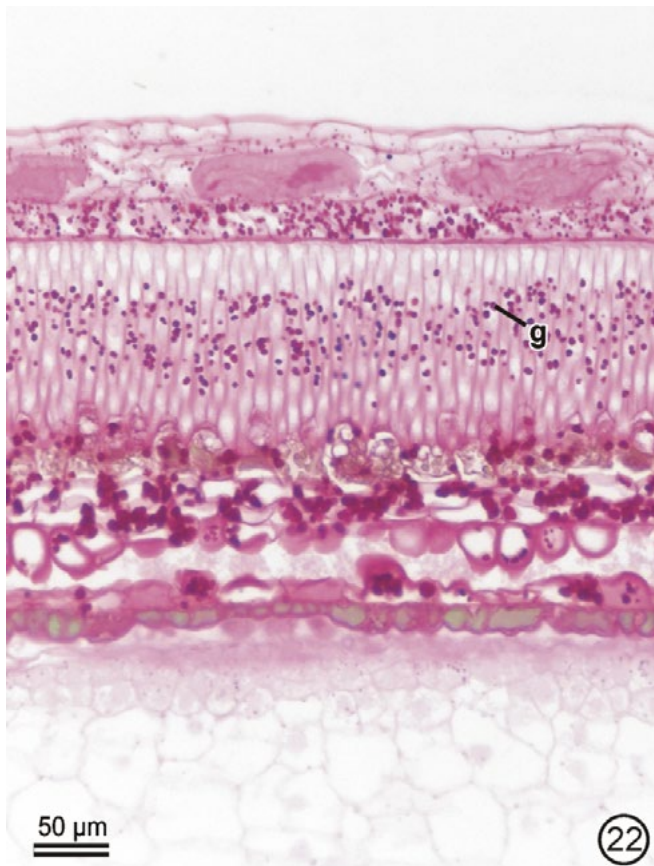


Fig. 22-23. Semente de *Bixa orellana* (Bixaceae) fixada em FAA_{50} , incluída em metacrilato, seccionada em micrótomo rotativo e corada com PAS. 22. Tegumento da semente com 90 dias após a antese. 23. Tegumento da semente com 120 dias após a antese. G, grão de amido.

3.2. Amido

3.2.1. Reagente de Lugol (Método original: Johansen, 1940)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Reagente de Lugol.

Preparo: Iodo..... 0,3 g
Iodeto de potássio.....1,5 g
Água destilada..... 100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes no reagente de Lugol por 5 a 10 minutos
- Lave em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permount, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultados: os grãos de amido coram de marrom, roxo ou negro (Fig. 24-25).

Controle: uso de material-referência.

Observação: o reagente de Lugol também pode ser utilizado após coloração com azul de toluidina (Fig. 22). Neste caso, o reagente de Lugol deve ser diluído em água (1:4), e os cortes corados por aproximadamente 30 segundos.

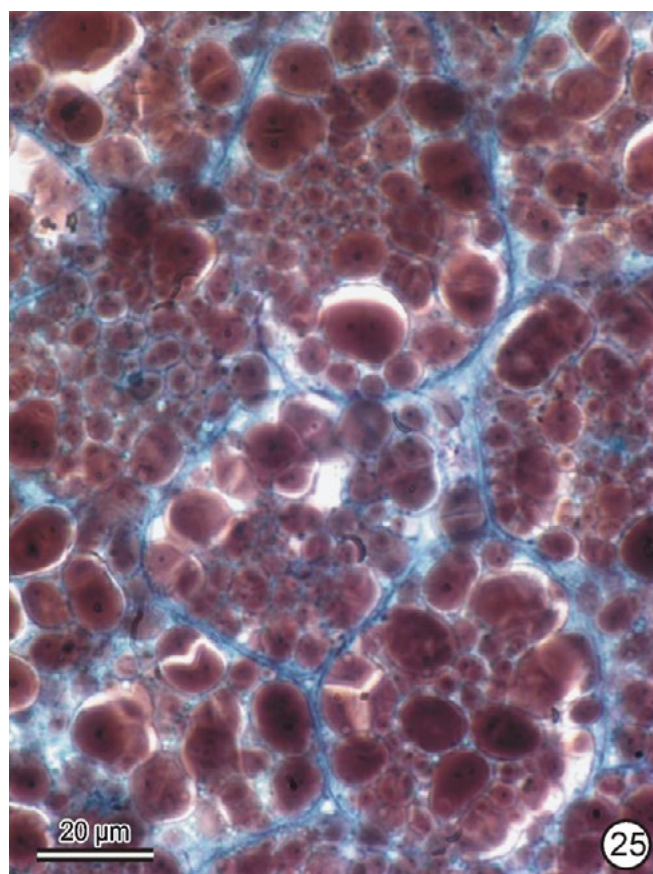
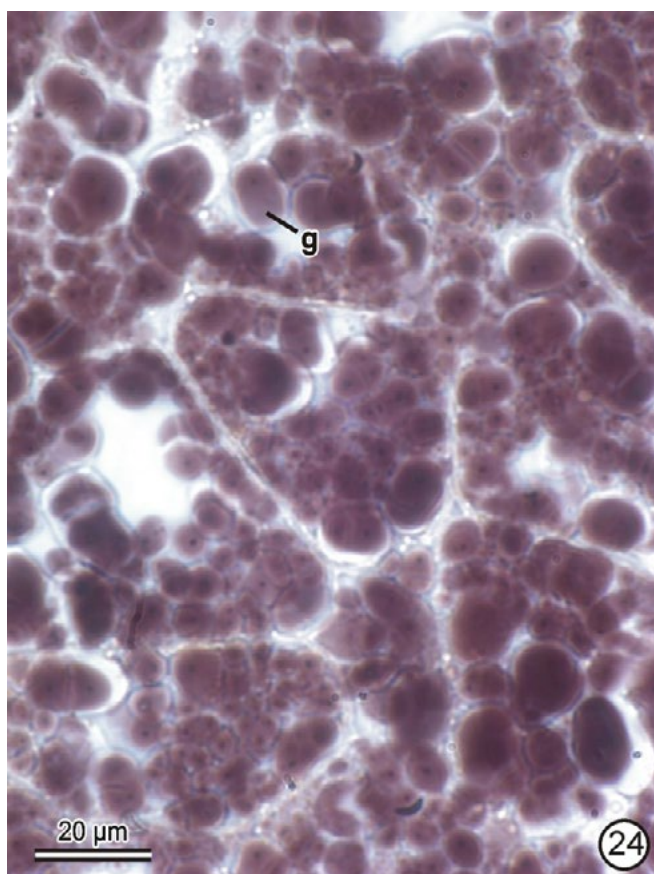


Fig. 24-25. Cotilédone de semente de *Myrciaria grandifolia* (Myrtaceae) fixado em FAA_{50'}, incluído em metacrilato e seccionado em micrótomo rotativo. 24. Corado com reagente de Lugol. 25. Corado com azul de toluidina e, em seguida, corado com reagente de Lugol. G, grão de amido.

3.2.2. Luz polarizada (Método original: Johansen, 1940)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Procedimento: observe os cortes sob luz polarizada.

Resultados: grãos de amido são visualizados como uma estrutura esférica brilhante com uma cruz escura no centro ("cruz de malta") (Fig. 27).

Controle: trate previamente as secções com ácido clorídrico diluído para assegurar a dissolução de cristais de oxalato de cálcio, que também são birrefringentes sob luz polarizada.

Observação: grãos de amido são polímeros com regiões cristalinas e, portanto, anisotrópicos e birrefringentes. Ao atravessar um material birrefringente, a luz polarizada é decomposta em dois feixes polarizados planos, que formam um ângulo reto entre si.

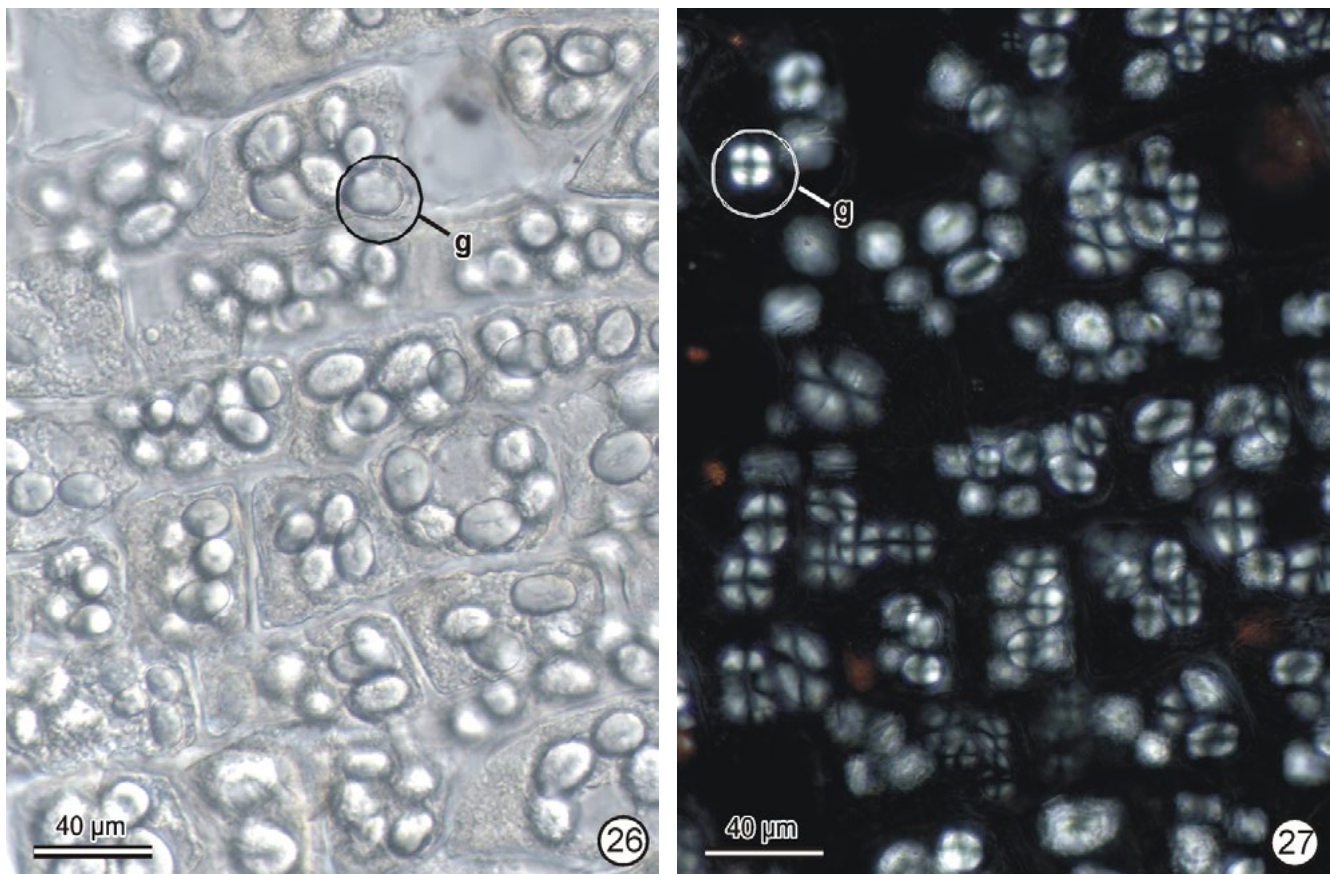


Fig. 26-27. Endosperma de semente de *Bixa orellana* (Bixaceae) fixado em FAA₅₀, incluído em metacrilato e seccionado em micrótomo rotativo. 26. Sem coloração, sob luz branca. 27. Sem coloração, sob luz polarizada. G, grão de amido.

3.3. Pectinas

3.3.1. Vermelho de rutênio (Método original: Johansen, 1940)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de vermelho de rutênio 0,002%.

Preparo: Vermelho de rutênio.....0,002 g

Água destilada.....10 mL

Agite a solução em agitador magnético, até a completa dissolução do reagente.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de vermelho de rutênio por 10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permunt, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: pectinas coram de rosa a vermelho (Fig. 29-30).

Controle: uso de material-referência.



Fig. 28-30. Semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) fixada em FAA₅₀. 28. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e sem coloração (branco). 29. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e corado com vermelho de rutênio. 30. Incluído em metacrilato e seccionado em microtomo rotativo, corado com vermelho de rutênio.

3.3.2. Corifosfina (Método original: Weis et al., 1988)

MÉTODOS PROPOSTOS

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de corifosfina 0,03%.

Preparo: Corifosfina.....0,03 g
Água destilada.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de corifosfina por 5 a 10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em água
- Observe em microscópio sob luz UV

Resultados: pectinas emitem fluorescência secundária alaranjada (Fig. 32-33).

Controle: comparar com a autofluorescência do mesmo material sob luz UV (Fig. 31).

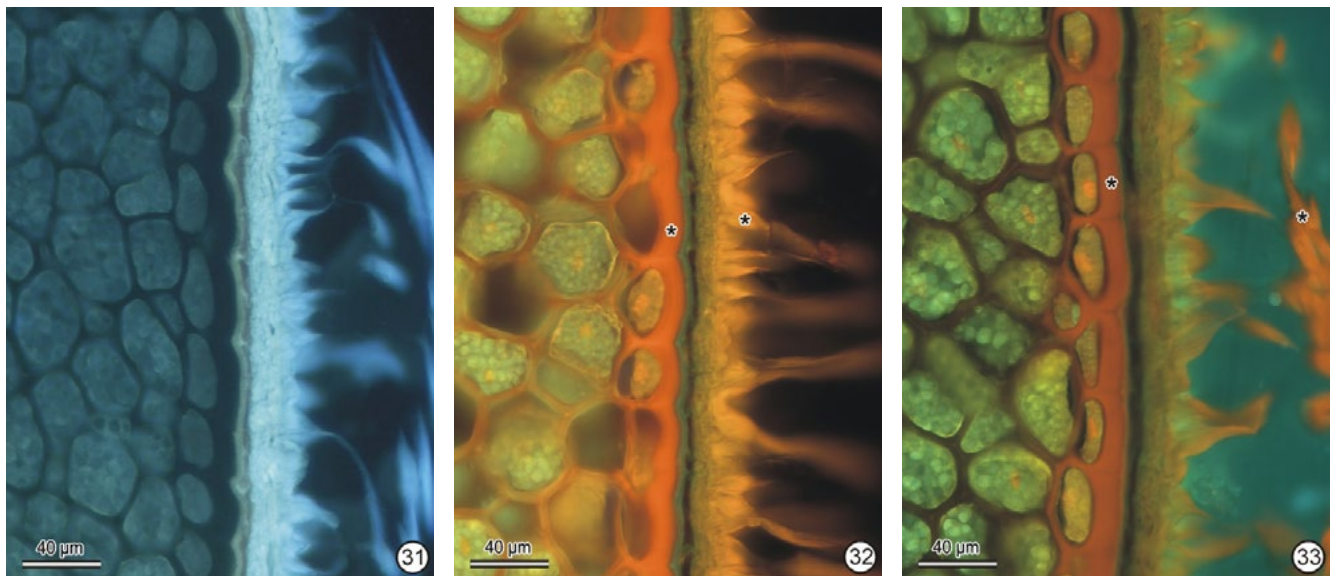


Fig. 31-33. Semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) fixada em FAA₅₀. 31. Incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo, sem coloração, sob luz UV (autofluorescência). 32. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e corado com corifosfina. 33. Incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo e corado com corifosfina. Pectinas emitem fluorescência secundária alaranjada (asteriscos).

3.4. β -1,3 e β -1,4 glucanos

3.4.1. Calcofluor white (Método original: Hughes & McCully, 1975)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de calcofluor white 0,01%.

Preparo: Calcofluor white.....0,01 g
Água destilada100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de calcofluor white por 5 a 10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em água
- Observe em microscópio sob luz UV

Resultado: β -1,3 e β -1,4 glucanos emitem fluorescência secundária azul clara (Fig. 34-35).

Controle: compare com a autofluorescência do mesmo material sob luz UV (Fig. 31).

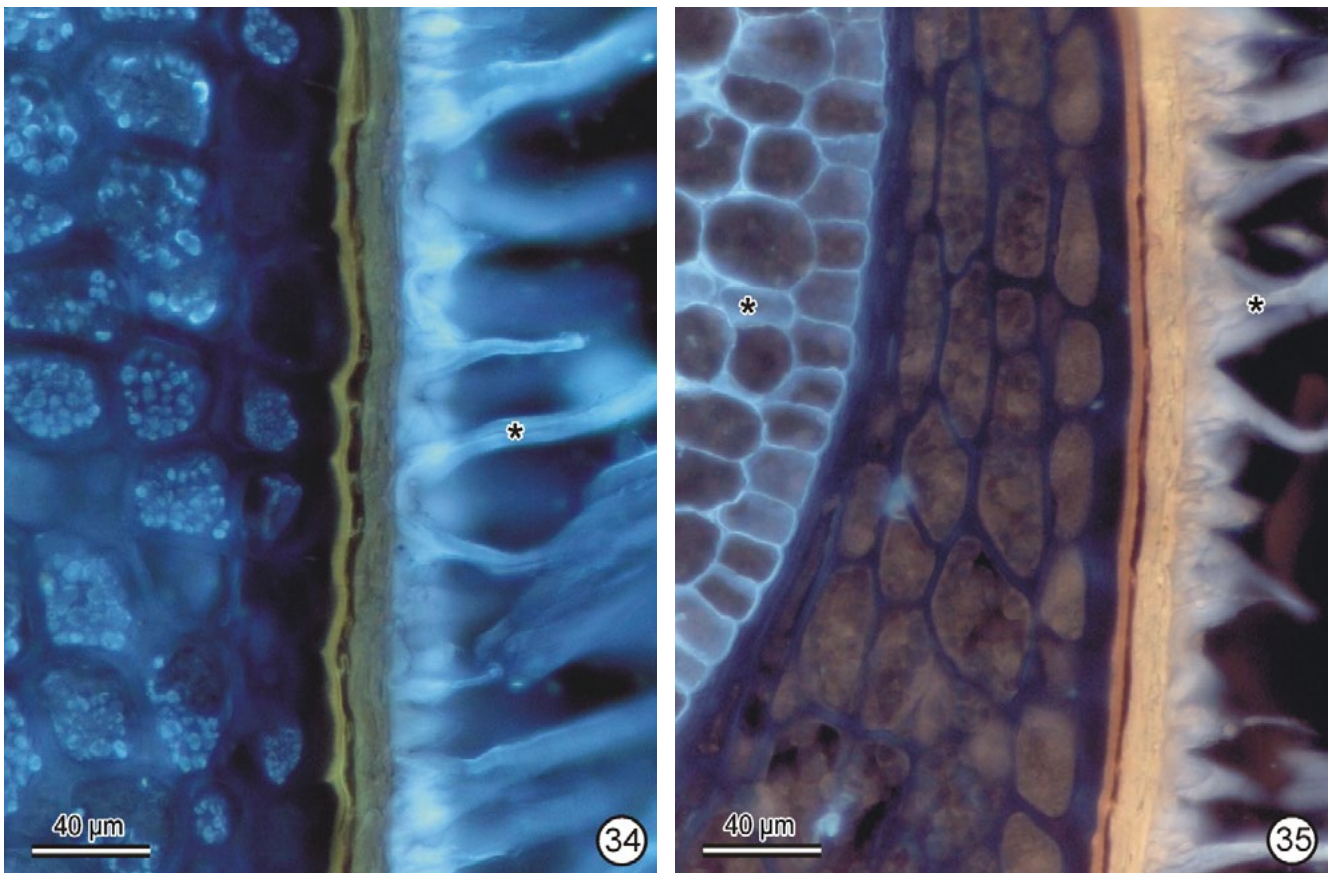


Fig. 34-35. Semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) fixada em FAA³⁰ e corada com calcofluor white, sob luz UV. 34. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo. 35. Incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo. β -1,3 e β -1,4 glucanos emitem fluorescência secundária branco-azulada (asteriscos).

3.5. Mucilagem

3.5.1. Azul de toluidina (Método original: O'Brien et al., 1964)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5.

Preparo: Azul de toluidina..... 0,05 g
Tampão fosfato de sódio 0,1M..... 100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de azul de toluidina por 15 a 30 minutos
- Lave em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina, gelatina glicerinada) para material sem inclusão (fresco ou fixado), ou em resina sintética (Permount, Entelan, verniz cristal) para material incluído (metacrilato ou parafina)

Resultado: mucilagens e pectinas coram de rosa a roxo (Fig. 36-37).

Controle: uso de material-referência.

Observação: o azul de toluidina é um corante metacromático, que exibe coloração diferente de acordo com o substrato que reage. Mucilagens e paredes ricas em pectinas coram de roxo; paredes celulósicas coram de azul, e paredes lignificadas e fenólicos não estruturais coram de verde.

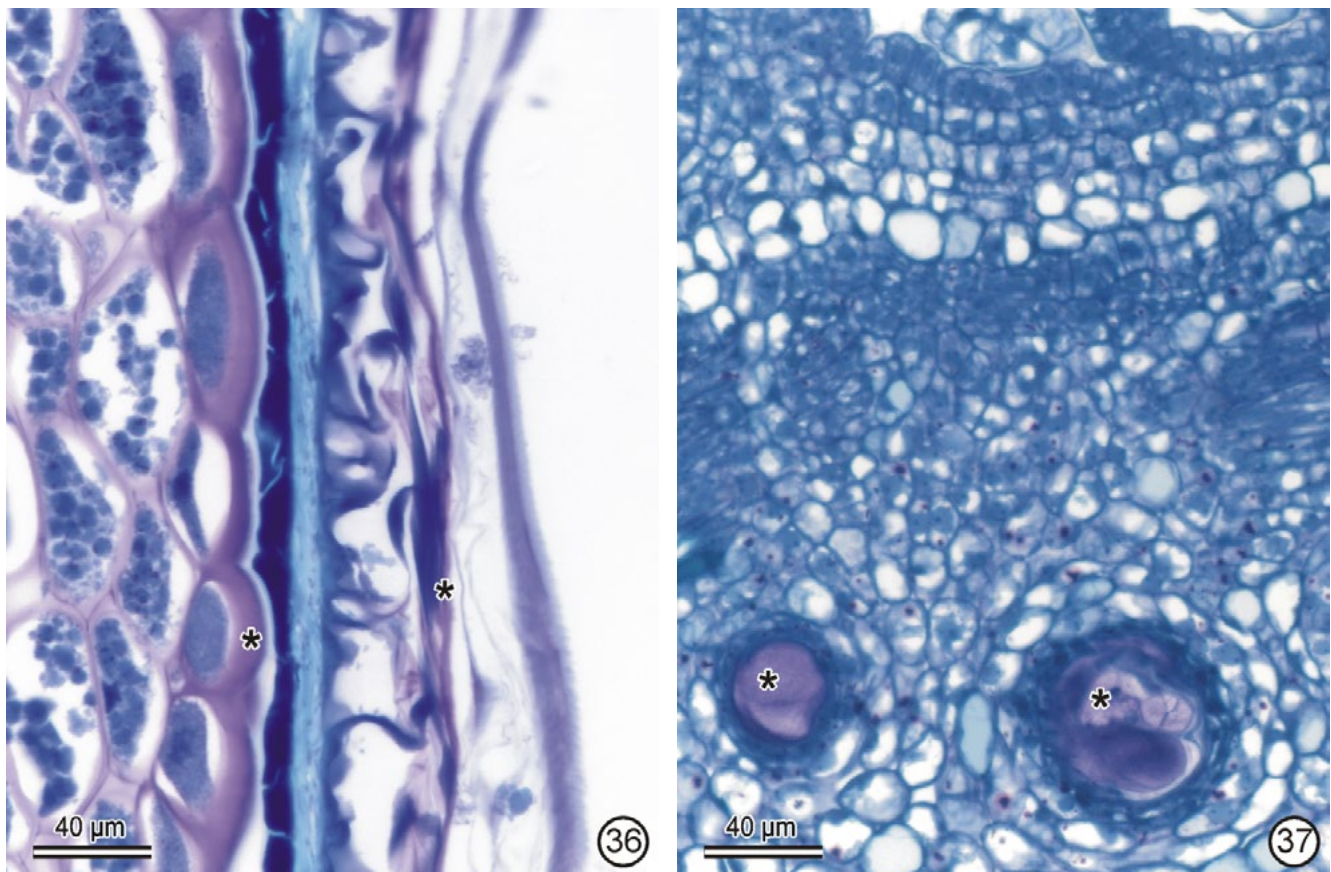


Fig. 36-37. Semente de *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) (36) e ovário de *Bixa orellana* (Bixaceae) (37) fixados em FAA₅₀, incluídos em metacrilato, seccionados em micrótomo rotativo e corados com azul de toluidina. Pectinas e mucilagens coram de roxo (asteriscos).

3.6. Calose

3.6.1. Azul de anilina (Método original: Smith e McCully, 1978)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de azul de anilina 0,05%.

Preparo: Azul de anilina.....0,05 g
 Água destilada.....100 mL
 A solução deve ser usada recém-preparada.

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução de azul de anilina por 30 minutos
- Monte em água ou glicerina
- Observe em microscópio sob luz UV

Resultado: a calose emite fluorescência secundária amarela pálida (Fig. 38-39).

Controle: compare com a autofluorescência do mesmo material sob luz UV.

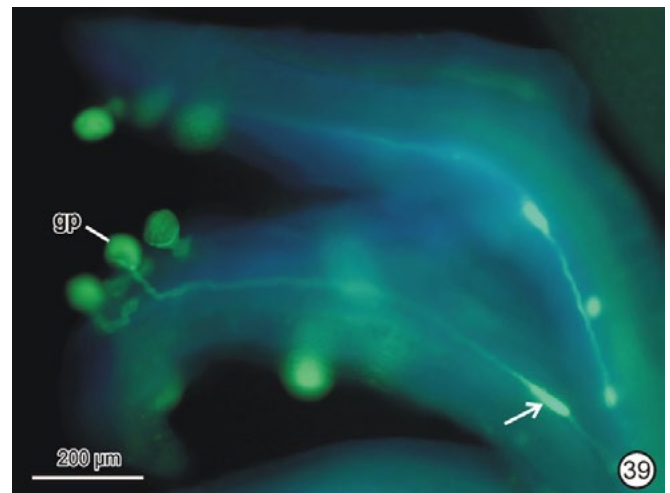
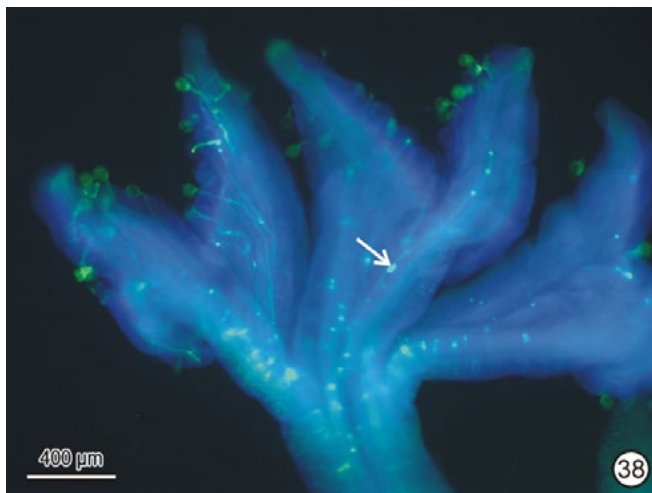


Fig. 38-39. Estigma da flor de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) fixado em FAA₅₀, clarificado em hipoclorito de sódio, corado com azul de anilina, e comprimido entre lâmina e lamínula, sob luz UV. Observar os depósitos de calose (setas) durante o desenvolvimento dos tubos polínicos. Gp, grão de pólen.

COMPOSTOS FENÓLICOS

4.1. Compostos fenólicos não estruturais

4.1.1. Cloreto férrico (Método original: Johansen, 1940)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de cloreto férrico 10%.

Preparo: Cloreto férrico III.....10 g
Água destilada.....100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução aquosa de cloreto férrico III por 15 a 30 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em meio hidratado (água, glicerina ou gelatina glicerinada)

Resultado: os compostos fenólicos totais coram de marrom a negro (Fig. 41).

Controle: uso de material referência.



Fig. 40-41. Tegumento da semente de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) fixado em FAA₅₀ e seccionado em criomicrotomo. 40. Sem coloração (branco). 41. Corado com cloreto férrico.

4.1.2. Dicromato de potássio (Método original: Gabe, 1968)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes: Solução aquosa de dicromato de potássio 10%.

Preparo: Dicromato de potássio.....10 g
Água destilada..... 100 mL

Procedimento:

- Coloque os cortes em solução aquosa de dicromato de potássio 10% por 15 a 30 minutos
- Lave rapidamente em água
- Monte em água ou glicerina

Resultado: compostos fenólicos totais coram de castanho avermelhado (Fig. 42).

Controle: uso de material-referência.

Observação: em materiais nos quais os compostos fenólicos já apresentam coloração castanha, há pouca diferença entre o branco e a reação positiva com dicromato de potássio. Nestes casos, o uso do cloreto férrico é mais adequado.



Fig. 42. Tegumento da semente de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) fixado em FAA_{50} , seccionado em criomicrotomo e corado com dicromato de potássio.

4.1.3. Vanilina clorídrica (Método original: Mace e Howell, 1974)

MÉTODO PROPOSTO**Possibilidades de uso:** apenas material fresco.**Reagentes:** Solução de vanilina 0,5% em ácido clorídrico 9%**Preparo:** Vanilina..... 0,5 g
Ácido clorídrico 9%..... 100 mL**Procedimento:**

- Coloque os cortes em solução de vanilina clorídrica por 15 a 30 minutos
- Monte em ácido clorídrico 9%

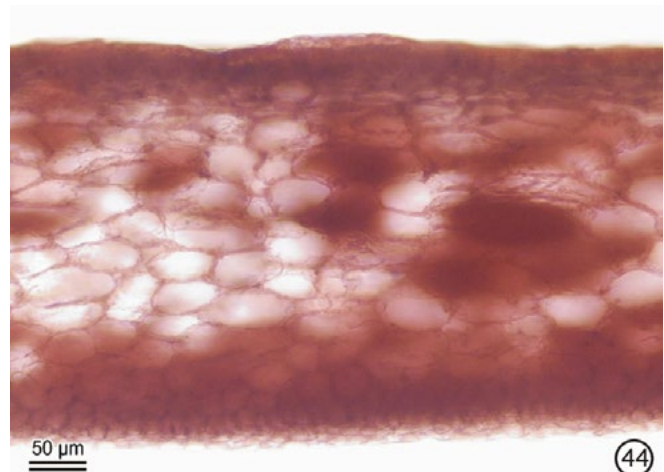
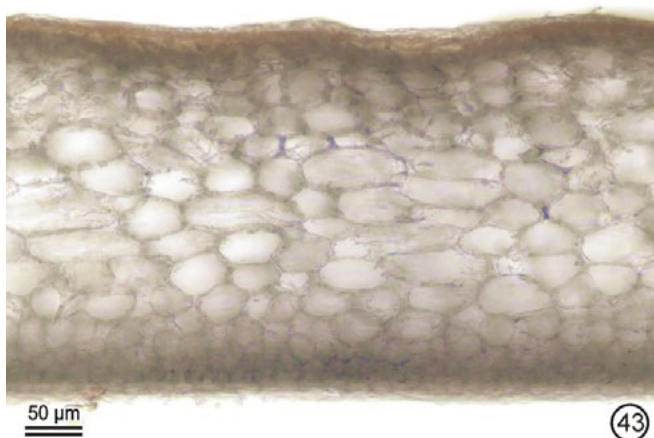
Resultado: os taninos condensados coram de vermelho (Fig. 44).**Controle:** uso de material-referência.

Fig. 43-44. Tegumento da semente de *Bauhinia sp.* (Caesalpiniaceae) fresca, seccionado em micrótomo de mesa. 43. Branco. 44. Corado com vanilina clorídrica.

4.2. Compostos fenólicos estruturais (ligninas)

4.2.1. Floroglucina ácida (Método original: Johansen, 1940)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado).

Reagentes: Floroglucina 2% em ácido clorídrico 25%.

Preparo:

Solução A: Floroglucina 2%

Floroglucina1,9g

Etanol 95%.....100mL

Solução B: Ácido clorídrico 25%

Ácido clorídrico..... 25mL

Água.....100mL

Procedimento:

- Misture as soluções A e B (1:2) apenas no momento da realização do teste
- Coloque os cortes no reagente (solução A +B) por 5 minutos
- Monte em água, glicerina ou no próprio reagente
- Observe imediatamente, pois a reação é efêmera

Resultado: as ligninas coram de rosa a vermelho (Fig. 46).

Controle: uso de material-referência.



Fig. 45-47. Tegumento da semente de *Ochroma lagopus* (Malvaceae) fixado em FAA₅₀. 45. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo, sem coloração (branco). 46. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e corado com floroglucina ácida. 47. Incluído em metacrilato, seccionado em microtomo rotativo e corado com azul de toluidina. Observe que a coloração esverdeada do azul de toluidina coincide com a região lignificada do tegumento, como indica a coloração rosada da floroglucina ácida.

4.3. Compostos fenólicos estruturais e não estruturais

4.3.1. Azul de toluidina (Método original: O'Brien et al., 1964)

Possibilidades de uso: material sem inclusão (fresco ou fixado) ou incluído (metacrilato ou parafina).

Reagentes, preparo e procedimento: ver item 4.5.1.

Resultado: os compostos fenólicos estruturais (ligninas) coram de verde claro (Fig. 48), e compostos fenólicos não estruturais coram de verde escuro (Fig. 48- 49, 52).

Controle: uso de material-referência.

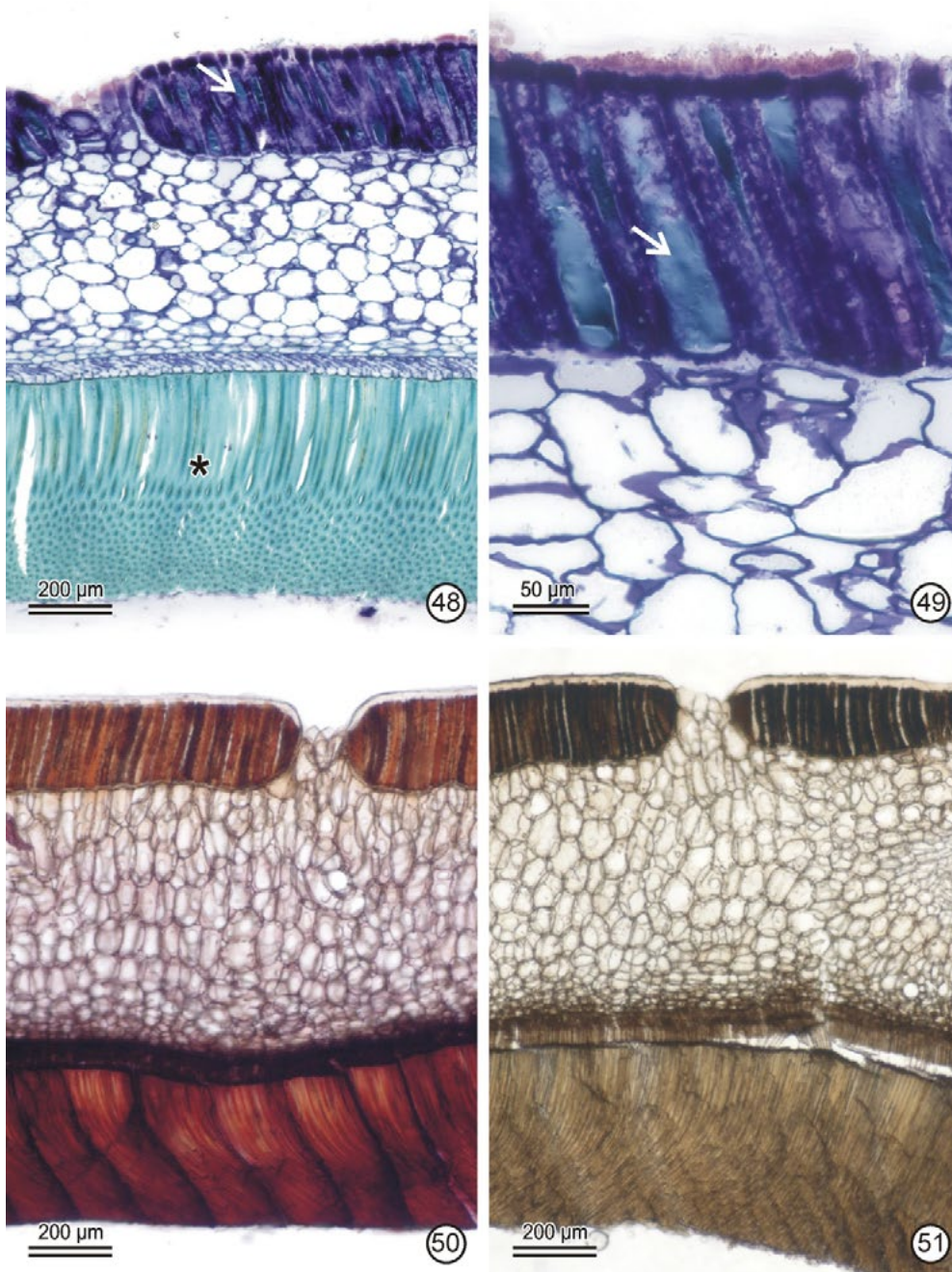


Fig. 48-51. Tegumento da semente de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) fixado em FAA₅₀. 48 e 49. Incluído em metacrilato, seccionado em micrótomo rotativo e corado com azul de toluidina. 50. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e corado com floroglucina ácida. 51. Sem inclusão, seccionado em criomicrotomo e corado com cloreto férrico. Observe que o azul de toluidina cora de verde tanto compostos fenólicos estruturais (asterisco) como compostos fenólicos não estruturais (setas), ao contrário da floroglucina, que só reage com lignina, e do cloreto férrico, que só reage com compostos fenólicos não estruturais.

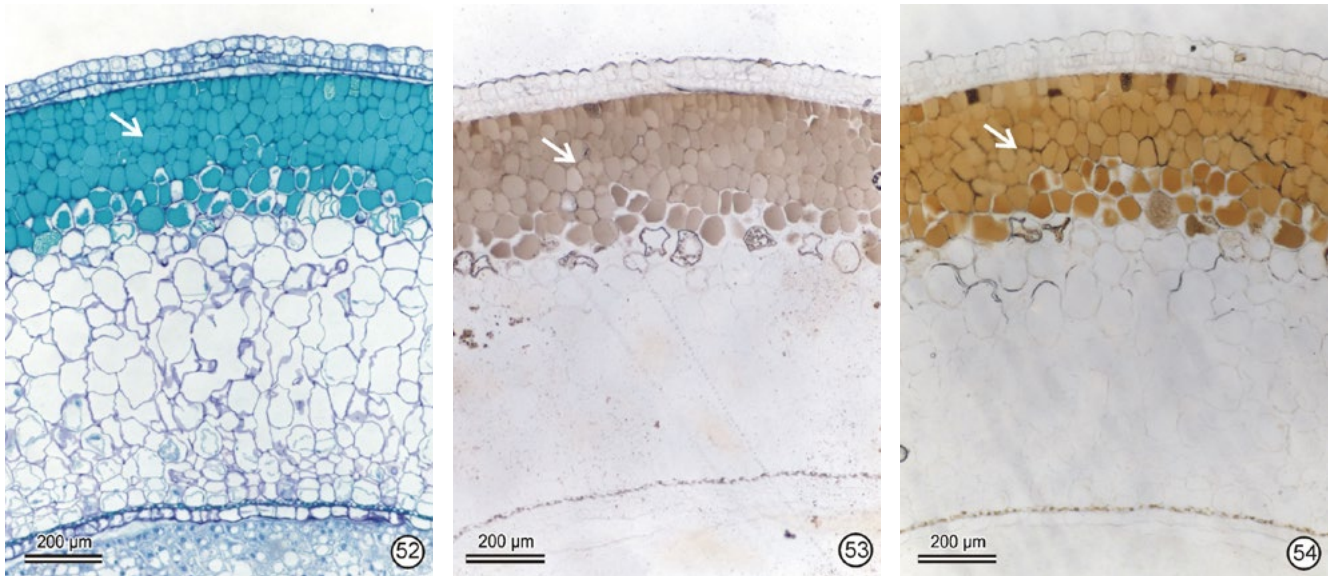


Fig. 52-54. Tegumento da semente de *Hibiscus esculentus* (Malvaceae) fixado em FAA_{50'} incluído em metacrilato e seccionado em micrótomo rotativo. 52. Corado com azul de toluidina. 53. Corado com cloreto férrico. 54. Corado com dicromato de potássio. Setas indicam região com presença de compostos fenólicos não estruturais.

ALCALOIDES

5.1. Reagente de Wagner (Método original: Furr & Mahlberg, 1981)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: apenas material fresco.

Reagentes: Reagente de Wagner.

Preparo:

Iodeto de potássio	2g
Iodo	1,27g
Água	100mL

Procedimento:

- Coloque os cortes no reagente 5-10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Observe imediatamente, pois a reação é efêmera

Resultado: alcaloides coram de castanho avermelhado (Fig. 56).

Controle: uso de material-referência.

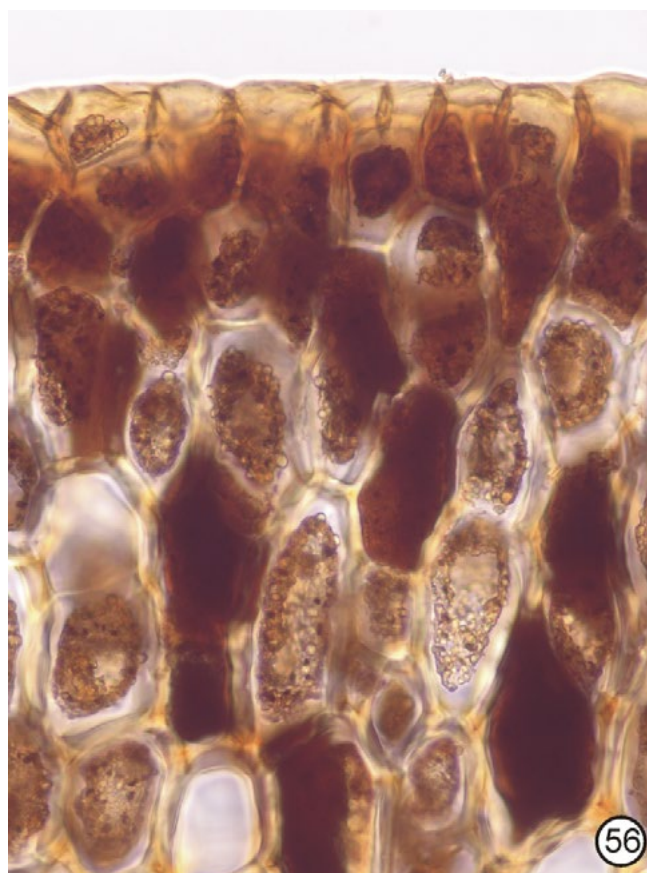
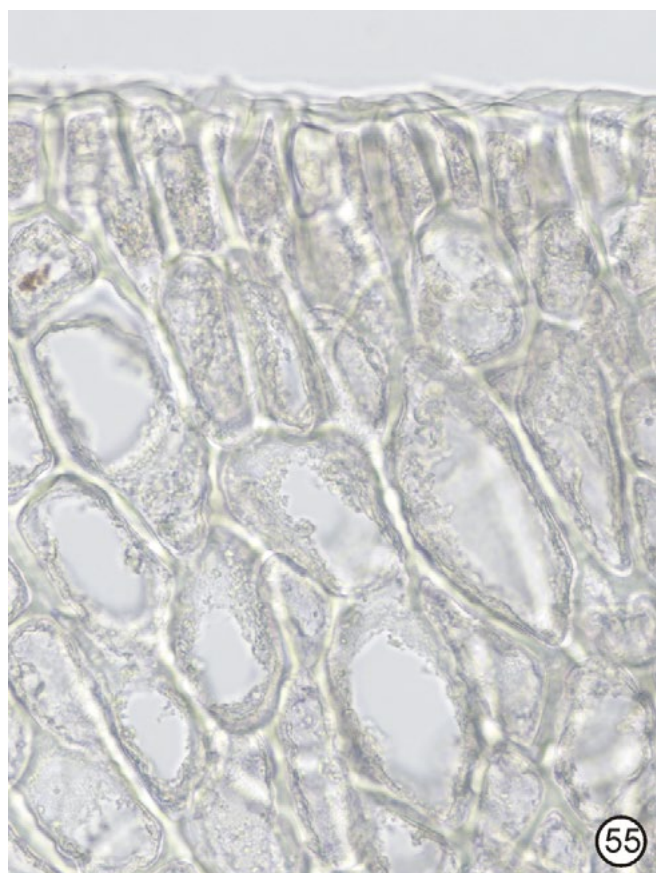


Fig. 55-56. Embrião de semente de *Coffea arabica* (Rubiaceae) fresca, seccionada em micrótomo de mesa. 55. Sem coloração (branco). 56. Corado com reagente de Wagner.

5.2. Reagente de Dittmar (Método original: Furr & Mahlberg, 1981)

MÉTODO PROPOSTO

Possibilidades de uso: apenas material fresco.

Reagentes: Reagente de Dittmar.

Preparo:

Iodeto de potássio	1g
Iodo	1g
Água	100mL

Procedimento:

- Coloque os cortes no reagente 5-10 minutos
- Lave rapidamente em água
- Observe imediatamente, pois a reação é efêmera

Resultado: alcaloides coram de castanho avermelhado (Fig. 58).

Controle: uso de material-referência.

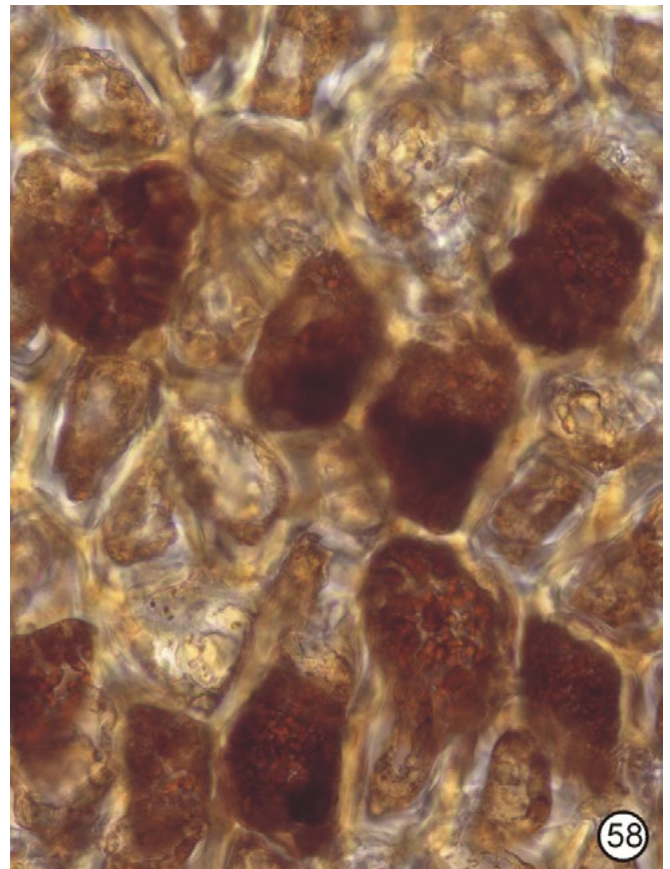
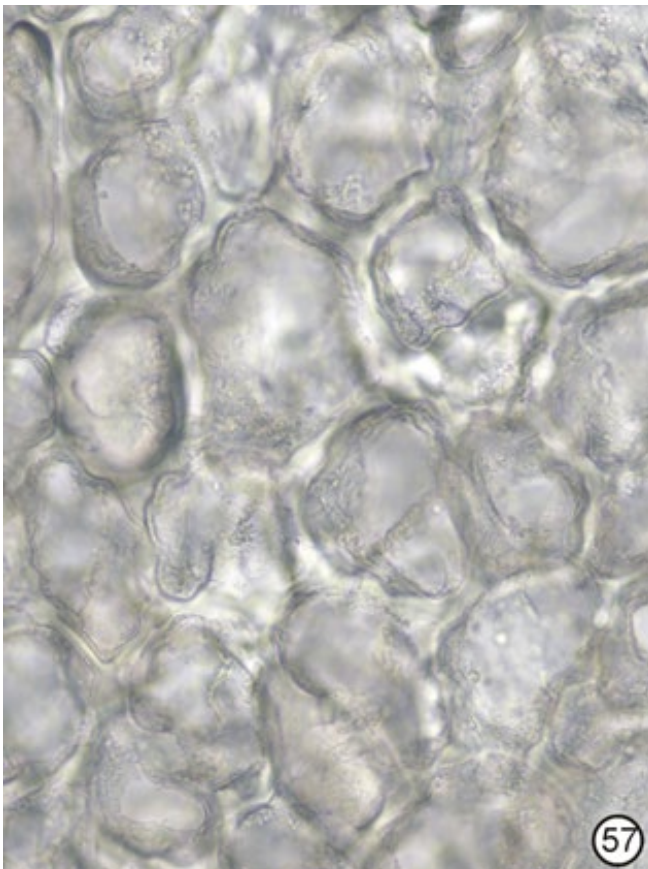


Fig. 57-58. Embrião de semente de *Coffea arabica* (Rubiaceae) fresca, seccionada em micrótomo de mesa. 57. Sem coloração (branco). 58. Corado com reagente de Dittmar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA (1991) Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* **66**, 111-116.
- Cain AJ (1947) The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly Journal of Microscopy Science* **88**, 383-392.
- Charrière-Ladreix Y (1976) Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* **129**, 167-174.
- David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris. Série D* **258**, 1338-1340.
- Fisher DB (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* **16**, 92-96.
- Furr M, Mahlberg PG (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **44**, 153-159.
- Gabe M (1968). 'Techniques histologiques.' (Masson et Cie: Paris)
- Ganter P, Jollés G (1969/1970) 'Histologie normale et pathologique. Vol.1-2.' (Gauthier-Villars: Paris)
- Hughes J, McCully ME (1975) The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* **50**, 1037-1041.
- Jayabalan M, Shah JJ (1986) Histochemical techniques to localize rubber in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Stain Technology* **61**, 303-308.
- Johansen DA (1940) 'Plant microtechnique.' (McGraw-Hill Books: New York)
- Kirk Jr PW (1970) Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**, 1-4.
- Mace ME, Howell CR (1974) Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* **52**, 2423-2426.
- Mazia D, Brewer PA, Alfert M (1953) The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. *The Biological Bulletin* **104**, 57-67.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**, 367-373.
- O'Brien TP, McCully ME (1981) 'The study of plant structure: principles and selected methods.' (Termarcaphi PTY. LTD: Melbourne)
- Pearse AGE (1968) 'Histochemistry: theoretical and applied. Vol. 2' 4^a.ed. (Churchill Livingstone, Edinburgh)
- Pearse AGE (1972) 'Histochemistry: theoretical and applied. Vol.2' 3^a ed. (The Williams & Wilkins Company: Baltimore)

Smith MM, McCully ME (1978) A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. *Protoplasma* **95**, 229-254.

Vidal BC (1970) Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. *Annales d'Histochemie*. **15**, 289-296.

Weis KG, Polito VS, Labavitch JM (1988) Microfluorometry of pectic materials in the dehiscence zone of almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb) fruits. *The Journal of Histochemistry and Histochemistry* **36**, 1037-1041.