

**MÉTODOS DE COLORAÇÃO DE ROESER (1972) -
MODIFICADO - E KROPP (1972)
VISANDO A SUBSTITUIÇÃO DO AZUL DE ASTRA
POR AZUL DE ALCIÃO 8GS OU 8GX**

Rebeca Luque¹
Hildeberto C. de Sousa²
Jane Elizabeth Kraus³

Recebido em 14/12/95. Aceito em 2/6/96.

RESUMO — (Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX). Em folhas de *Lychnophora ericoides*, *Coffea arabica* e *Nymphaea mexicana* foram testados métodos de coloração baseados em Roeser (1972) modificado e Kropp (1972), visando a substituição do corante azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX. As amostras foram fixadas em FAA, desidratadas em série butílica terciária e incluídas em parafina. Os cortes histológicos transversais foram corados segundo diferentes baterias de coloração, modificadas quanto ao tipo de corante usado, diferenciador e série de desidratação. As lâminas permanentes foram preparadas com bálsamo-do-canadá sintético. Os resultados obtidos evidenciaram que o método de Roeser (1972) modificado é melhor que o de Kropp (1972), nas condições deste experimento. O azul de astra pode ser substituído por azul de alciano 8GX e a desidratação pode ser em série isopropílica ou etílica, sem grande diferença entre elas. São discutidos os resultados provenientes das diferentes colorações.

Palavras-chave: método de coloração, azul de astra, azul de alciano, fucsina básica, safranina, histologia vegetal

ABSTRACT — (Staining methods of modified Roeser (1972) and Kropp (1972), aiming at substituting the astra blue by alcian blue 8GS or 8GX). Staining methods based on modified Roeser (1972) as well as that of Kropp (1972) were done with leaves of *Lychnophora ericoides*, *Coffea arabica* and *Nymphaea mexicana* aiming at substituting the astra blue stain by alcian blue 8GS or 8GX. Samples were fixed in FAA, dehydrated in tert-butyl alcohol series and embedded in paraffin. The histological transversal sections were stained in different staining batteries, modified

¹ Depart. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, La Hechicera, Mérida 5101, Venezuela

² Depart. de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus do Morro do Cruzeiro, CEP 35400-000 Ouro Preto, MG, Brasil

³ Depart. de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C.P. 11461, CEP 05422-970 São Paulo, SP, Brasil

according to the type of stains and differentiators, and the series of dehydration. Permanent slides were prepared with synthetic Canada balsam. The results obtained indicate that the modified Roeser method (1972) is better than that of Kropp (1972) under present experimental conditions. The astra blue can be substituted by alcian blue 8GX and dehydration can be isopropyllic or ethylic, with little difference between them. The results obtained with the different staining techniques used are discussed.

Key words: staining method, astra blue, alcian blue, basic fuchsin, safranin, plant histology

Introdução

Os trabalhos de anatomia vegetal freqüentemente empregam métodos de dupla coloração para evidenciar as paredes celulares, conteúdos citoplasmáticos etc. Diferentes corantes e reagentes são utilizados, dependendo das estruturas a serem observadas e analisadas. Dentre os corantes empregados, merecem destaque o azul de astra e o azul de alciano, os quais possibilitam um excelente contraste, quando usados em conjunto com a safranina ou a fucsina básica.

O corante azul de astra é um complexo cobre-ftalocianina e, segundo Malzacher (1972), foi pela primeira vez utilizado para evidenciar mucopolissacarídeos ácidos na histologia humana por Pioch (1957). Malzacher (*l.c.*) também o utilizou para preparações totais de turbelários. Maác & Vágás (1961) introduziram este corante na microtécnica botânica em associação com a safranina e a auramina, visando a coloração diferenciada das paredes celulares celulósicas e lignificadas.

O azul de astra associado com a safranina foi empregado por Woessner (1970), Lindauer (1971), Bukatsch (1972), Kropp (1972) e Gerlach (1984), entre outros. Roeser (1972) foi pioneiro a utilizá-lo associado com a fucsina básica. Esse autor, entretanto, não definiu a concentração do corante, nem seu preparo.

O corante azul de alciano também é um complexo cobre-ftalocianina, que por sua vez tem sido amplamente empregado em microbiologia e histologia animal, e com especial ênfase na histopatologia humana. O seu uso foi introduzido por Steedeman (1950), seguido por Lison (1954), Adams (1956 *apud* Clark 1981), Adams & Sloper (1956), Mowry (1956, 1960) e McManus & Mowry (1960), para detecção citoquímica de glicosaminoglicanos livres e ligados a proteína nos tecidos animais. Também são importantes os trabalhos de Anderson & Greiff (1964 *apud* Clark 1981), Wismar (1966), Mowry (1975 *apud* Clark 1981) e Tas (1977a, b). Nestes trabalhos, o corante foi empregado isoladamente ou associado com outros corantes ou reagentes, em especial com o ácido periódico e o reagente de Schiff (PAS).

Até hoje, o azul de alciano é amplamente usado em trabalhos de histologia animal, citando-se os de Gilloteaux *et al.* (1990), Decker & Reale (1991), Niimura *et al.* (1991), Tanigawa *et al.* (1991), Rubio *et al.* (1991) e Jenkins *et al.* (1992).

Segundo Gahan (1984), embora usado por muitos anos nos estudos de mucopolissacarídeos nos tecidos animais, o azul de alciano tem sido relativamente pouco empregado para tecidos vegetais. Nesses materiais, os trabalhos de Beneš & Uhlířová (1966 *apud* Gahan 1984) e Beneš (1968) são importantes, pois estudaram o sítio e o modo de

coloração deste corante na parede celular. Mais recentemente, citam-se os trabalhos de Serrato-Valenti *et al.* (1992), Achar *et al.* (1993) e Srebotnik & Messner (1994).

Em diversos trabalhos de anatomia vegetal, os métodos de coloração usados não são acompanhados das referências bibliográficas correspondentes, inviabilizando a obtenção das informações necessárias para a realização destes, bem como para a interpretação dos resultados obtidos. Além disso, vários dos métodos descritos para distinguir os tecidos vegetais não indicam corretamente o tipo e a concentração do corante usado e o preparo das soluções envolvidas, faltando, em outros, até a seqüência a ser seguida.

No Brasil, o método de coloração com azul de astra e fucsina básica (Roeser 1972, modificado) parece ter sido introduzido pelo Pe. Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG) (Braga 1977) e tem sido muito usado desde Braga (1977 e 1982). Vários trabalhos utilizando esse método de coloração, com modificações ou não, têm deixado de citar a referência bibliográfica correspondente ou têm citado apenas o trabalho de Roeser (1972), o que inviabiliza a metodologia. Outros trabalhos têm empregado o azul de astra juntamente com a safranina e, por sua vez, não se referem aos trabalhos originais.

Após o levantamento bibliográfico, verificou-se que a solução do corante azul de astra usada no método de Roeser (1972) modificado tem sido preparada da mesma maneira que é indicada na metodologia de Maáčz & Vágás (1961), porém este autor não é citado.

Por outro lado, devido à dificuldade de se obter o corante azul de astra cujos índice de coloração ("Color Index" - CI) e fórmula estrutural são desconhecidos até o presente momento, este corante, muitas vezes, foi substituído pelo azul de alciano, porém de forma aleatória.

O objetivo do presente trabalho é analisar os resultados obtidos com os métodos de dupla coloração de Roeser (1972) modificado e Kropp (1972), que empregam azul de astra em associação com fucsina básica e safranina, respectivamente. Tal estudo visa também encontrar o melhor substituto do corante azul de astra empregando-se azul de alciano 8GS ou 8GX.

Material e métodos

Para os testes de coloração foram selecionadas folhas das seguintes plantas: *Lychnophora ericoides* Mart. (xerófita), *Coffea arabica* L. (mesófito) e *Nymphaea mexicana* A. Gray (hidrófito).

Os corantes usados foram azul de astra ("astra blue" marca Merck, C.I. não indicado), azul de alciano ("alcian blue" 8GS marca Serva, C.I. 74240 e "alcian blue" 8GX marca BDH, C.I. 74240), safranina ("safranin O" marca Aldrich, C.I. 50240) e fucsina básica ("basic fuchsin" marca BDH, C.I. 42510). O preparo dos corantes e diferenciadores está indicado no quadro 1.

As diferentes amostras foram fixadas em FAA (formaldeído 37-40%, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18, v/v) segundo Johansen (1940). Foram desidratadas

Quadro 1. Preparo dos corantes e diferenciadores.

Preparo dos corantes**Azul de astra**

2,0 g de ácido tartárico

0,5 g do azul de astra

Dissolver o ácido tartárico em 80 ml de água destilada, adicionar o azul de astra e completar com água destilada até 100ml

Azul de alcião 8GS

Substituir o azul de astra por azul de alcião 8GS

Azul de alcião 8GX

Substituir o azul de astra por azul de alcião 8GX

Fucsina básica

Dissolver 0,5 g de fucsina básica em 80 ml de etanol 50% e completar até 100 ml com etanol 50%

Safranina

Dissolver 1 g de safranina em 80 ml de água destilada e completar até 100 ml

Preparo dos diferenciadores**Etanol 80% acidificado**

Solução-mãe: 100 ml de etanol 70% + 0,5 ml de HCl concentrado

Diluir a solução-mãe em etanol 80%, ou seja, etanol 70% acidificado:etanol 80%, 1:20 (v/v)

Solução saturada de ácido pícrico

Colocar o ácido pícrico em 100 ml de água destilada até começar a aparecer um depósito do mesmo, que não desaparece após agitação

em série butílica terciária (Johansen 1940) e incluídas em parafina (marca Reagen, P.F. 54-56°C) com 8% de cera de abelha. Secções transversais com espessura entre 10-12µm foram realizadas em micrótomo rotativo (marca American Optical, modelo 820). Os cortes foram desparafinados com xilol (marca Merck) e hidratados em série etanólica segundo a carta de coloração descrita no quadro 2. Após os diferentes métodos de coloração empregados (vide quadro 2), foram preparadas lâminas histológicas permanentes com bálsamo-do-canadá sintético (Caedax, marca Merck) diluído em xilol (1:1, v/v).

Em várias atividades, como fixação, desidratação e hidratação, além da relação com a coloração, o tempo foi padronizado, visando uma análise comparativa entre os diferentes métodos testados.

Os aspectos anatômicos mais relevantes foram registrados em microscópio óptico (marca Olympus-Vanox, modelo AHB-LB-1) acoplado a um sistema fotográfico (marca Olympus, modelo PM 10-35 AD-1), usando filtro azul LKB e filme Ektachrome 64 ASA (marca Kodak). Dos diapositivos foram feitas cópias de contacto.

Resultados

O método de R I (Fig. 1-3) mostrou-se muito semelhante ao de R II (Fig. 4-6). O emprego da desidratação etílica (R II) levou, entretanto, a uma tênue coloração azul arroxeadada, menos contrastante, quando comparado à desidratação isopropílica (R I). No caso de R III (Fig. 7-9), em que não foi empregada a solução saturada de ácido pícrico, observou-se um excesso de coloração por fucsina básica para quase todas as estruturas de *Lychnophora*, *Coffea* e *Nymphaea*.

Quando comparados os resultados obtidos em K I (Fig. 10-12) e II (Fig. 13-15) não foi verificada diferença entre eles, mostrando que os materiais podem ser desidratados em série isopropílica ou etílica. A ausência da passagem em etanol acidificado (K III) (Fig. 16-18) levou a um excesso da safranina em todos os materiais testados, mormente nas estruturas que contêm substâncias fenólicas.

Comparando-se o efeito da fucsina básica (R I e II) com o da safranina (K I e II), verificou-se que a primeira levou a uma coloração mais intensa.

O emprego do azul de alcião 8GS em R IV e V (Fig. 19 e 20, respectivamente) mostrou que esse corante não substituiu adequadamente o azul de astra, quando usado em mesma concentração e igual tempo de coloração. Verificou-se pouco contraste do corante, ou seja, ocorreu uma predominância da coloração por fucsina básica, levando inclusive a um resultado inferior ao obtido em R III, em que não ocorreu a diferenciação pela solução saturada de ácido pícrico. A pequena diferença entre estes resultados deve-se, possivelmente, à diferenciação dos corantes. Em K IV (Fig. 21) evidenciou-se que a associação deste corante com safranina foi pior, quando comparado com as baterias de Roeser, que empregaram a fucsina básica.

A análise das baterias de coloração empregando o azul de alcião 8GX em R VI e VII (Fig. 22 e 23, respectivamente) mostrou que esse corante pode substituir o azul de astra, dando um bom contraste de coloração em conjunto com a fucsina básica. A diferença na desidratação é a mesma observada em R I e II. O azul de alcião 8GX mostrou-se também muito eficiente nas colorações dos métodos de K V, VI e VII (Fig. 24, 25 e 26, respectivamente). O emprego da solução saturada de ácido pícrico (K V) leva a um resultado melhor quando comparado ao obtido com etanol 80% acidificado (K VI e VII). A desidratação etílica (K VII) foi superior à isopropílica (K VI).

No método K VIII (Fig. 27), em que ocorreu o emprego do azul de astra e a solução de ácido pícrico, evidenciou-se um contraste relativamente melhor, quando comparado ao efeito do etanol acidificado (K I).

Nas observações histológicas em *Lychnophora*, onde a cutícula é bastante espessada, verificou-se que esta é mais evidenciada pelos métodos que empregaram a fucsina básica, do que quando se usou safranina. Neste material, quando do emprego da safranina, a coloração da cutícula só ficou bem evidenciada em K III (Fig. 16) na presença de excesso de corante. De um modo geral, os cloroplastos de todas as folhas também se mostram mais nítidos com fucsina básica, como pode ser visto em R I (Fig. 1-3), R II (Fig. 4-6) etc. Estas organelas também parecem ter ficado evidenciadas

Quadro 2. Carta de coloração para o estudo comparativo dos métodos de Roeser (1972) modificado - R - e Kropp (1972) - K - visando a substituição do azul de astra por azul de alcão 8GS ou 8GX.

Carta de hidratação para coloração

1. desparafinar em xilol (2x) 5 min
2. passagem em xilol:etanol 100%, 1:1 (v/v) 1min
3. passagem em etanol 100% 1min
4. passagem em etanol 95% 1min
5. passagem em etanol 70% 1min
6. passagem em etanol 50% 1min
7. passagem em etanol 30% 1min
8. passagem em água destilada
9. corar segundo a metodologia descrita abaixo

R I (modificado)

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em isopropanol 70, 80 e 100%

R III

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem em isopropanol 50, 70, 90 e 100%

R V

1. azul de alcão 8GS 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em isopropanol 70, 80 e 100%

R VII

1. azul de alcão 8GX 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em etanol 50, 70, 90 e 100%

R II

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em etanol 50, 70, 90 e 100%

R IV

1. azul de alcão 8GS 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em isopropanol 70, 80 e 100%

R VI

1. azul de alcão 8GX 5 min
2. lavagem em água destilada
3. fucsina básica 15 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em isopropanol 70, 80 e 100%

K I (original)

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em isopropanol 100%

K III

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem em isopropanol 70, 80 e 100%

K V

1. azul de alcão 8 GX 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em etanol 50, 70, 90 e 100%

K VII

1. azul de alcão 8GX 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em etanol 100%

K II

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em etanol 100%

K IV

1. azul de alcão 8GS 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em isopropanol 100%

K VI

1. azul de alcão 8GX 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em etanol 80% acidificado
6. passagem em isopropanol 100%

K VIII

1. azul de astra 5 min
2. lavagem em água destilada
3. safranina 5 min
4. passagem em água destilada
5. passagem rápida em solução saturada de ácido pícrico
6. passagem em isopropanol 50, 70, 90 e 100%

melhor nos métodos de K V (Fig. 24) e VIII (Fig. 27), baterias em que ocorreu a diferenciação com a solução de ácido pícrico.

Em resumo, nas condições deste experimento, notou-se que a passagem pela solução saturada de ácido pícrico ou pelo etanol 80% acidificado foi uma etapa importante para a diferenciação dos corantes, pois na ausência destes reagentes não se obteve um bom contraste. Como comentado anteriormente, a safranina empregada nos diversos métodos de Kropp mostrou uma resposta menos efetiva que a fucsina básica usada nos de Roeser, nas condições deste experimento. A desidratação isopropílica ou etílica não mostrou, de um modo geral, grandes diferenças.

Discussão

Os corantes azul de alcão e azul de astra são ftalocianinas, compostos cíclicos, que diferem das porfirinas metálicas pelo fato de grupos alquílicos nas posições 3 e 4 do anel pírrolico serem substituídos por grupos isoindólicos; os átomos que formam as

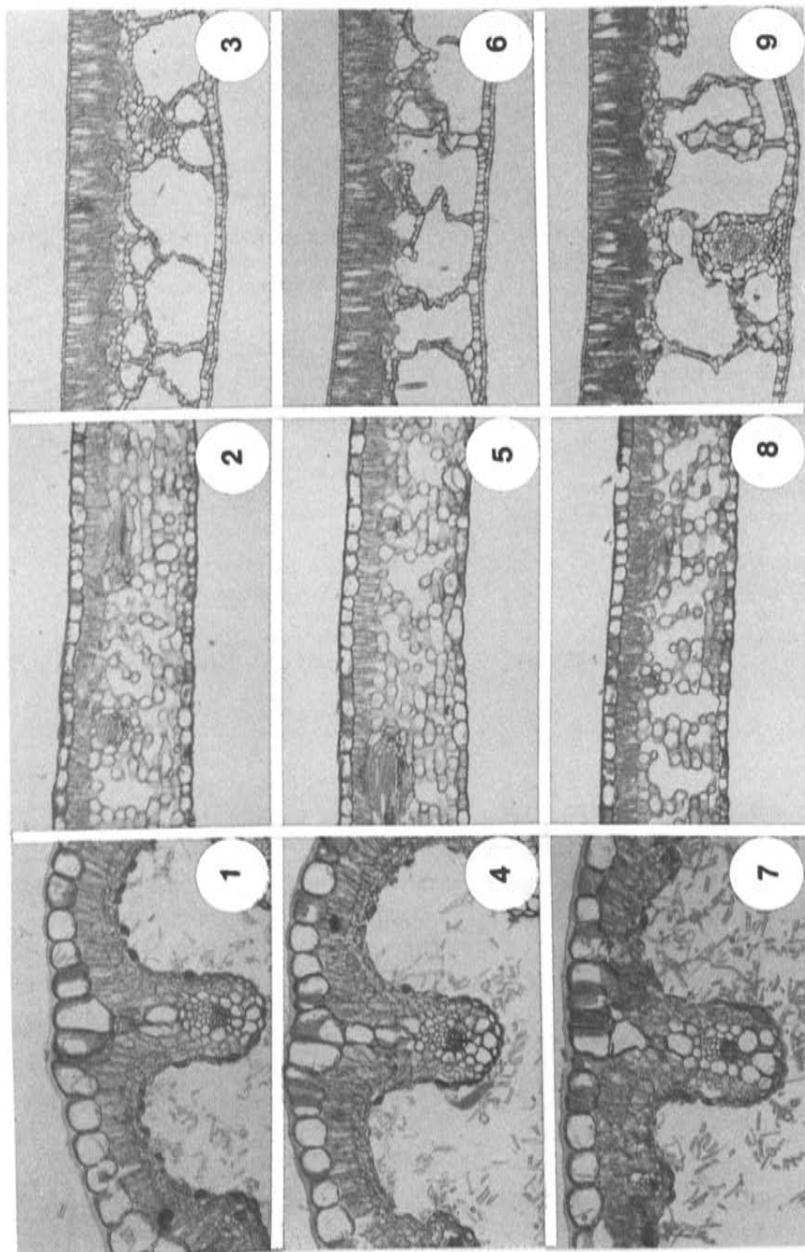


Figura 1-9. Métodos de coloração. Cortes transversais de folhas: *Lychanoplata ericooides* (Fig. 1, 4, 7), *Coffea arabica* (Fig. 2, 5, 8) e *Nymphophaea mexicana* (Fig. 3, 6, 9). Fig. 1-3, R I, azul de astra com indicação do preparo deste corante (quadro 1). Fig. 4-6, R II, azul de astra e desidratação etílica. Fig. 7-9, R III, azul de astra e eliminação da passagem em solução saturada de ácido pícrico. *L. ericooides* e *C. arabica*, aumento de 80x; *N. mexicana*, aumento de 40x.

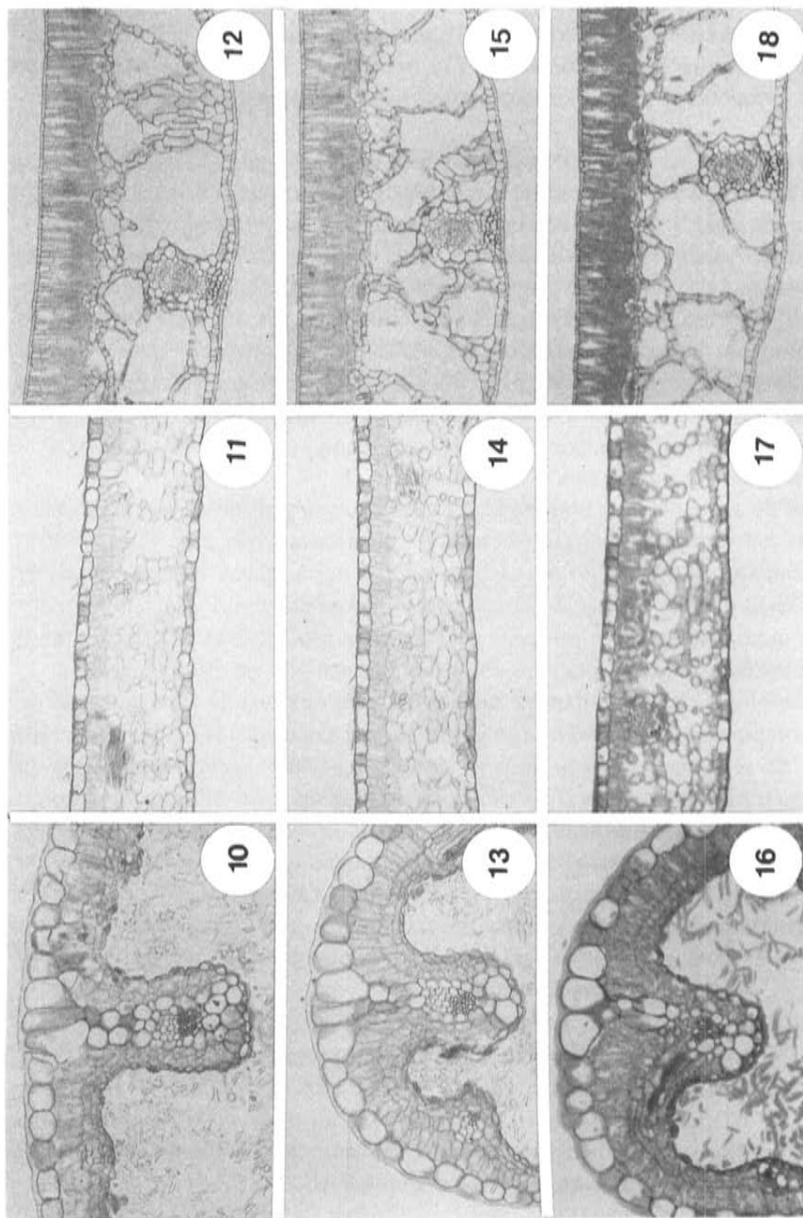


Figura 10-18. Métodos de coloração. Cortes transversais de folhas: *Lycimphora ericoides* (Fig. 10,13,16), *Coffea arabica* (Fig. 11,14,17) e *Nymphaea mexicana* (Fig. 12,15,18). Fig. 10-12. K I, azul de astrá (metodologia original). Fig. 13-15. K II, azul de astrá e desidratação etilica. Fig. 16-18. K III, azul de astrá e eliminação da passagem em etanol 80% acidificado. *L. ericoides* e *C. arabica*, aumento de 80x; *N. mexicana*, aumento de 40x.

pontes de ligação são -N= em lugar de -CH= e o átomo central metálico é usualmente Cu em lugar do Fe, no caso da estrutura heme ou Mg, no caso da clorofila (Lillie 1990). Desse modo, era esperado que os resultados obtidos com o emprego de azul de alcião fossem semelhantes aos do azul de astra, no que se refere à afinidade pelas estruturas. Ainda, de acordo Horobin & Goldstein (1972), todos os azuis de alcião e astra contêm os mesmos componentes azuis em cromatografia e em espectroscopia de infravermelho.

Entretanto, observou-se nítida diferença de coloração quando do emprego do azul de alcião 8GS ou 8GX, sendo que somente este último pode substituir adequadamente o azul de astra, quando usado em mesma concentração e tempo de coloração. Schumacher & Adam (1994) evidenciaram que ocorre variação nos resultados de coloração por azul de alcião, não somente pelas diferentes marcas empregadas, mas devido também a protocolos diferentes. No trabalho realizado, a grande diferença no efeito de coloração apresentada pelos corantes 8GS e 8GX é provavelmente devido a diferenças de códigos, marcas e/ou procedências, pois os protocolos seguidos nos experimentos foram os mesmos e os corantes apresentavam o mesmo C.I. No caso do azul de astra torna-se difícil propor algum esclarecimento, pois se desconhece o C.I. e a fórmula estrutural deste corante.

O azul de astra tem sido empregado em conjunto com diferentes corantes para distinguir as paredes celulares celulósicas das lignificadas. Maác & Vágás (1961) conjecturaram que a agregação do corante ocorre nos espaços intermicelares da celulose; obtiveram uma coloração azul para os componentes celulósicos das paredes celulares e uma coloração do amarelo ao vermelho tijolo (dada pela auramina e safranina) para as paredes lignificadas em diferentes estágios de diferenciação.

Em histologia vegetal o azul de alcião tem sido empregado para detecção de inúmeros compostos. Beneš & Uhlířová (1966 *apud* Gahan 1984) e Beneš (1968) concluíram de seus estudos com variação de pH, e usando diferentes métodos de digestão por pectinase, que o azul de alcião cora a pectina. Esta coloração provavelmente ocorre por ligações iônicas do corante com os grupos carboxílicos livres dos compostos pécticos. Este método, entretanto, poderia não corar pectinas metiladas ou esterificadas. Convém salientar que, para esses autores, a expressão azul de alcião foi usada no sentido amplo para os corantes ftalocianínicos solúveis em água. Nos seus experimentos empregaram tanto o azul de alcião ("alcian blue" marca Gurr) como o azul de astra ("astrablau" marca Chroma).

Chaubal *et al.* (1991) utilizaram esse corante para detectar a presença de glicoproteínas em tubos germinativos do fungo *Puccinia sorghi* e Pickett-Heaps *et al.* (1991) para a mucilagem de uma diatomácea (*Adissonia crystallina*).

Segundo Jeffree (1993), os polissacarídeos vegetais solúveis e ácidos (pectina, carboximetilcelulose etc.) são corados por corantes catiônicos como o azul de alcião (8GX) e os neutros (xiloglucanos, por exemplo) por PAS.

Schumacher & Adam (1994) confirmaram que os glicosaminoglicanos são identificados nos tecidos por várias técnicas histoquímicas, incluindo coloração com azul de alcião e seus análogos.

Assim, nos tecidos dos materiais estudados, pode-se inferir que o azul de astra ou o azul de alcião coraram os polissacarídeos, entre eles a celulose.

Segundo Berlyn & Miksche (1976), a safranina pode corar paredes lignificadas ou cutinizadas e cromossomos, confirmando nossas observações nos materiais estudados, pois a cutícula, os cloroplastos e outras estruturas que não contêm ligninas mostraram-se coradas por safranina. Resultados semelhantes foram observados com a fucsina básica. Desse modo, pode-se propor que corantes básicos como a safranina e a fucsina básica evidenciam as substâncias fenólicas, entre elas a lignina e também têm afinidade por estruturas com composição diferente.

A afinidade dos corantes aniônicos ou catiônicos pelas várias estruturas ou tecidos é grandemente influenciada pelas cargas das amostras, e conseqüentemente, pelo pH da solução corante (Lillie 1990), explicando em parte as respostas diferentes provenientes do emprego de solução saturada de ácido pícrico ou etanol 80% com ácido clorídrico como diferenciador.

A análise global das metodologias de Kropp e Roeser testadas evidenciou que Roeser I, II (com azul de astra), VI e VII (com azul de alcião 8GX) foram as mais adequadas nas condições do experimento realizado. Entretanto, sabe-se, pelas informações contidas em livros de texto usuais de microtécnicas (e observações pessoais), que o tempo de coloração varia conforme o material e que depois de definido esse tempo podem ser obtidos bons resultados. Tal sugestão é válida para a metodologia de Kropp (1972), a qual pode ser empregada com resultados bem melhores aos obtidos nos experimentos realizados, quando do controle do tempo de coloração por safranina ou do diferenciador.

Concluindo, o trabalho realizado mostrou que o azul de astra pode ser substituído pelo azul de alcião 8GX, o qual apresentou propriedades semelhantes nos processos de coloração avaliados.

Os resultados obtidos evidenciaram, ainda, que o azul de alcião 8GX, em associação com a fucsina básica, pode ser empregado para amostras vegetais oriundas de ambientes xérico, méxico e aquático.

Outra observação importante foi relativa ao uso do etanol, produto muito comum no Brasil, e, conseqüentemente, mais barato e mais fácil de ser adquirido, o qual pode substituir o isopropanol, sem grandes diferenças no processo de coloração.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa concedida (Proc. nº 301776/83). Aos Professores Doutores Berta Lange de Morretes, Liliana Forneris e Paulo Alberto Otto, pela tradução dos textos em alemão.

Referências bibliográficas

- Achar, B.N.; Bhandari, J.M. & Urs, H.G.V.G. 1993. A rapid safranin-metal phthalocyanine double staining technique for plants. *Biotech. & Histochem.* 68: 127-131.

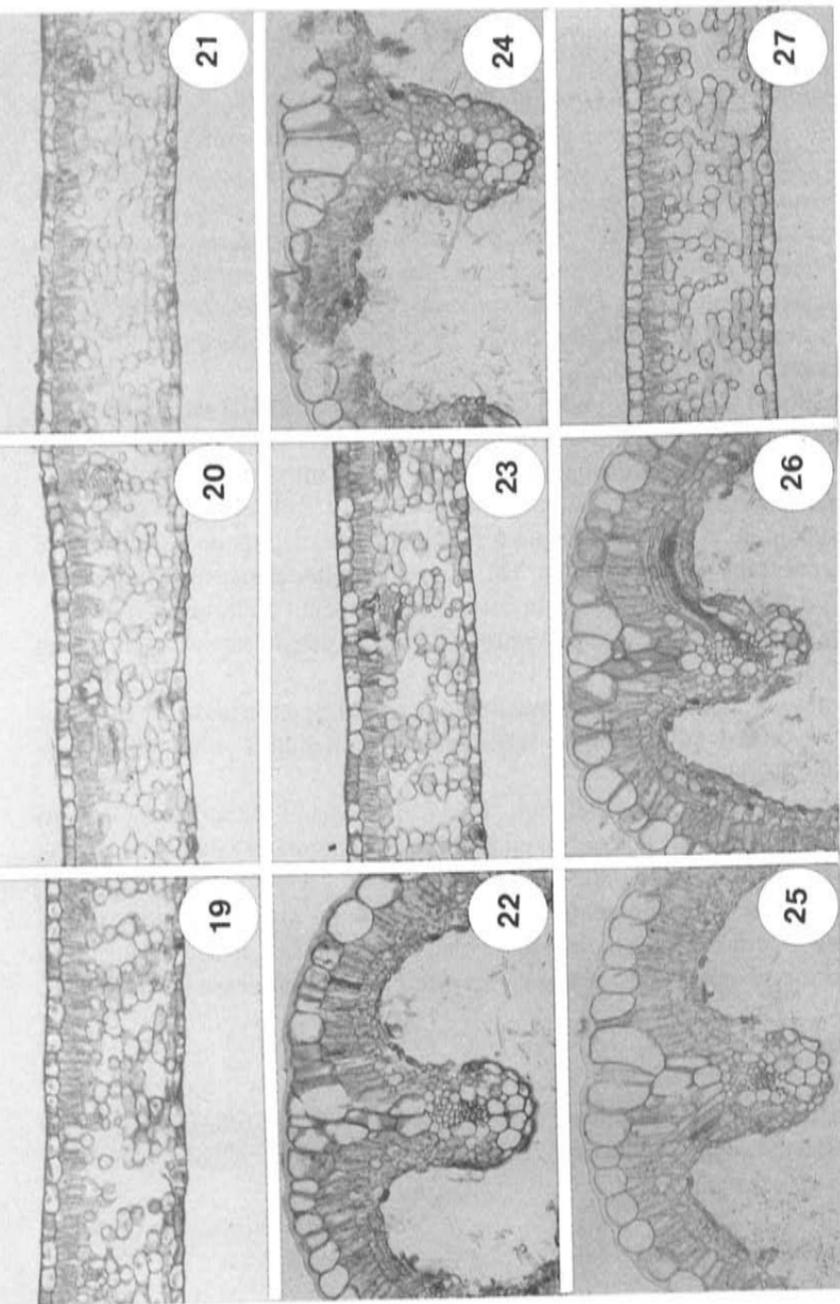


Figura 19-27. Métodos de coloração. Cortes transversais de folhas: *Coffea arabica* (Fig. 19, 20, 21, 23, 27), *Lychnoptora ericoides* (Fig. 22, 24, 25, 26). Fig. 19. R IV, azul de alciano 8GS. Fig. 20. R V, azul de alciano 8GS e passagem em etanol 80% acidificado. Fig. 21. K IV, azul de alciano 8GS. Fig. 22. R VI, azul de alciano 8GX. Fig. 23. R VII, azul de alciano 8GX e desidratação etílica. Fig. 24. K V, azul de alciano 8GX, passagem em solução saturada de ácido picrico e desidratação etílica. Fig. 25. K VI, azul de alciano 8GX. Fig. 26. K VII, azul de alciano 8GX e desidratação etílica. Fig. 27. K VIII, azul de astra e passagem em solução saturada de ácido picrico. *L. ericoides* e *C. arabica*, aumento de 80x; *N. mexicana*, aumento de 40x.

- Adams, C.W.M. & Sloper, J.C. 1956. The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog: histochemical evidence derived from a performic acid-alcian blue reaction for cystine. *J. Endocr.* 13: 221-228.
- Beneš, K. 1968. On the stainability of plant cell walls with alcian blue. *Biol. Plant.* 10: 334-346.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.P. 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University.
- Braga, M.M.N. 1977. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. *Acta Amazonica* 7: 1-74, suplemento.
- Braga, M.M.N. 1982. Aspectos anatômicos das folhas de *Virola* Aubl. (Myristicaceae) como contribuição para sua Taxonomia. Manaus (AM): Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Fundação Universidade da Amazônia. Tese de Doutorado.
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung: Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.
- Chaubal, R.; Wilmot, V.A. & Wynn, W.K. 1991. Visualization, adhesiveness, and cytochemistry of the extracellular matrix produced by urediniospore germ tubes of *Puccinia sorghi*. *Can. J. Bot.* 69: 2044-2054.
- Clark, G. 1981. Staining procedures. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Decker, B. & Reale, E. 1991. The glomerular filtration barrier of the kidney in seven vertebrates classes: comparative morphological and histochemical observations. *Eur. J. Basic and Appl. Histochem.* 35: 15-36.
- Gahan, P.B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. London: Academic Press.
- Gerlach, D. 1984. Botanische Mikrotechnik: eine Einführung. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Gilloteaux, J.; Pomerants, B.J., Kelly, T.R., Menu, R., Pelletier, G. & Vanderhaeghen, J. J. 1990. Light and electron microscopical immunolocalization of neuropeptide Y-containing nerves in the hamster gallbladder. *Biol. Struct. Morphog.* 3: 89-96.
- Horobin, R.W. & Goldstein, D.J. 1972. Impurities and staining characteristics of alcian blue samples. *Histochem. J.* 4: 391-399.
- Jeffree, C.E. 1993. Immobilization of pectin, xyloglucan and other soluble plant polysaccharides on blotting membranes. *New Phytol.* 125: 695-706.
- Jenkins, P.G.; Pulsford, A.L. & Harris, J.E. 1992. Microscopy of the absorptive cells and gut-associated lymphoid tissue of the flounder *Platichthys flesus*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 72: 553-567.
- Johansen, D.A. 1940. Botanical microtechnique. New York: McGraw-Hill Book.
- Kropp, U. 1972. Leitbündel. *Mikrokosmos* 61: 342-345.
- Lillie, R.D. 1990. H. J. Conn's biological stains. 9th ed. St. Louis: Sigma Chemical.
- Lindauer, R. 1971. Die Pflanzen-Epidermis: Isolierung, Färbung, Einschluss. *Mikrokosmos* 60: 170-178.
- Lison, L. 1954. Alcian blue 8G with chlorantine fast red 5B. A technic for selective staining of mucopolysaccharides. *Stain Technol.* 29: 131-138.
- Maáčz, G.J. & Vágás, E. 1961. A new method for staining of cellulose and lignified cells-walls. *Mikroskopie* 16: 40-43.
- Malzacher, P. 1972. Eine neue Färbung für zoologische Totalpräparate: Astrablau-Boraxkarmin. *Mikrokosmos* 61: 181-182.
- McManus, J.F.A. & Mowry, R.W. 1960. Staining methods histological and histochemical. New York: Harper & Row.
- Mowry, R.W. 1956. Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. *Proc. Histochem. Soc.* 4: 407.
- Mowry, R.W. 1960. Revised method producing improved coloration of acidic polysaccharides with alcian blue 8GX supplied currently. *Proc. Histochem. Soc.* 8: 323-324.
- Niimura, S.; Fujisawa, N.; Sato, N.L. & Ishida, K. 1991. Histochemical observations of proteins, polysaccharides and lipids in the oocytes and embryos of mastomys (*Praomys natalensis*) during the folliculogenesis and early development. *Japan. J. Animal Reprod.* 37: 65-70.
- Pickett-Heaps, J.; Hill, D.R.A. & Blaze, K.L. 1991. Active gliding motility in an araphid marine diatom, *Ardissona* (formerly *Synedra*) *crystallina*. *J. Phycol.* 27: 718-725.
- Pioch, W. 1957. Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff

- Astrablau. *Virchows Arch.* 330: 337-346.
- Roeser, K.R. 1972. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos* 61: 33-36.
- Rubio, C.A.; Huang, C.B.; Porwit, A., Kock., Y. & Stenling, R. 1991. Quantification of the colonic mucous cell population during protracted stress in rats. *Stress Med.* 7: 145-152.
- Schumacher, U. & Adam, E. 1994. Standardization of staining in glycosaminoglycan histochemistry: alcian blue, its analogues and diamine methods. *Biotech. & Histochem.* 69: 18-24.
- Serrato-Valenti, G.; Cornara, L., Lotito, S. & Quagliotti, L. 1992. Seed coat structure and histochemistry of *Abelmoschus esculentus*: chalazal region and water entry. *Ann. Bot. (Lond.)* 69: 313-321.
- Steelman, H.F. 1950. Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. *Q.J. Microsc. Sci.* 91: 477-479.
- Srebotnik, E. & Messner, K. 1994. A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *App. Environ. Microbiol.* 60: 1383-1386.
- Tanigawa, K.; Kawaguchi, M., Tanaka, O. & Kato, Y. 1991. Skeletal malformations in rat offspring: long-term effect of maternal insulin-induced hypoglycemia during organogenesis. *Diabetes* 40: 1115-1121.
- Tas, J. 1977a. The alcian blue and combined alcian blue-safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem. J.* 9: 205-230.
- Tas, J. 1977b. Polyacrilamide films as a tool for investigating qualitative and quantitative aspects of the staining of glycosaminoglycans with basic dyes. *Histochem. J.* 9: 267-276.
- Wismar, B.I. 1966. Quad-type stain for the simultaneous demonstration of intracellular and extracellular tissue components. *Stain Technol.* 41: 309-313.
- Woessner, E. 1970. Astrablau-Safranin - noch einfacher. Botanische Mikropräparate mit geringstem Aufwand. *Mikrokosmos* 59: 31-32.