

Pesquisa e desenvolvimento de corantes histológicos naturais alternativos a partir de espécies vegetais da Mata Atlântica

Research and development of alternative natural histological dyes from plant species from the Atlantic Forest

Investigación y desarrollo de colorantes histológicos naturales alternativos a partir de especies vegetales de la Mata Atlántica

Recebido: 31/10/2023 | Revisado: 21/11/2023 | Aceitado: 22/11/2023 | Publicado: 24/11/2023

William José Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1656-4516>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: williamprofbio@gmail.com

Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0526-6636>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: drijar@hotmail.com

Fiorita Gonzales Lopes Mundim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7375-4108>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: hjmundim@univas.edu.br

Eliakim José Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2218-8137>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: eliakim.lopes.bio.2014@gmail.com

Rodrigo Machado Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-043X>
Universidade do Vale do Sapucaí, Brasil
E-mail: rodrigomachadopereira@yahoo.com.br

Resumo

A coloração histológica é uma técnica indispensável para o estudo celular e tecidual de órgãos, que possibilita identificar componentes estruturais com auxílio de corantes. Algumas técnicas de coloração têm ganhado domínio na rotina laboratorial, embora muitos corantes sintéticos empregados contêm alta toxicidade, que leva à crescente busca por corantes histológicos naturais alternativos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é a avaliação do potencial de coloração de pigmentos obtidos de nove espécies vegetais derivadas e remanescentes da Mata Atlântica em secções de tecido animal e vegetal. Os resultados apontaram que seis extratos promoveram coloração de componentes teciduais do intestino, coração, encéfalo e pele de ratos. Fibras colágenas foram evidenciadas por *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, *Ocotea odorifera*, *Xylopia brasiliensis*, e mucopolissacarídeos por *Croton floribundus* e *Croton urucurana*. Estruturas vasculares e parede celular em secções de tecido vegetal foram destacadas nas colorações por *Solidago microglossa*. E por fim provou-se o possível potencial de algumas espécies derivadas da Mata Atlântica e podem conter valor tintorial importante e contribuir para o desenvolvimento de meios alternativos de coloração histológica.

Palavras-chave: Histologia; Corantes; Mata Atlântica; Croton.

Abstract

Histological staining is an essential technique for the cellular and tissue study of organs, which makes it possible to identify structural components with the help of dyes. Some staining techniques have gained dominance in laboratory routine, although many synthetic dyes used contain high toxicity, which leads to the growing search for alternative natural histological dyes. In this sense, the objective of this work is to evaluate the coloring potential of pigments obtained from nine plant species derived from and remaining from the Atlantic Forest in sections of animal and plant tissue. The results showed that six extracts promoted coloring of tissue components of the intestine, heart, brain and skin of rats. Collagen fibers were evidenced by *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, *Ocotea odorifera*, *Xylopia brasiliensis*, and mucopolysaccharides by *Croton floribundus* and *Croton urucurana*. Vascular structures and cell walls in plant tissue sections were highlighted in *Solidago microglossa* staining. And finally, the possible potential of

some species derived from the Atlantic Forest was proven and may contain important staining value and contribute to the development of alternative means of histological staining.

Keywords: Histology; Dyes; Atlantic forest; Croton.

Resumen

La tinción histológica es una técnica imprescindible para el estudio celular y tisular de los órganos, que permite identificar componentes estructurales con la ayuda de colorantes. Algunas técnicas de tinción han ganado predominio en la rutina del laboratorio, aunque muchos tintes sintéticos utilizados contienen una alta toxicidad, lo que lleva a la creciente búsqueda de tintes histológicos naturales alternativos. En este sentido, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial colorante de pigmentos obtenidos de nueve especies vegetales derivadas y remanentes de la Mata Atlántica en secciones de tejido animal y vegetal. Los resultados mostraron que seis extractos promovieron la coloración de los componentes de los tejidos del intestino, el corazón, el cerebro y la piel de las ratas. Las fibras de colágeno fueron evidenciadas por *Croton floribundus*, *Croton urucurana*, *Ocotea odorífera*, *Xylopia brasiliensis*, y mucopolisacáridos por *Croton floribundus* y *Croton urucurana*. Las estructuras vasculares y las paredes celulares en secciones de tejido vegetal se resaltaron en la tinción con *Solidago microglossa*. Y finalmente, se demostró el posible potencial de algunas especies derivadas de la Mata Atlántica que pueden contener importante valor de tinción y contribuir al desarrollo de medios alternativos de tinción histológica.

Palabras clave: Histología; Tintes; Mata Atlántica; Crotona.

1. Introdução

A coloração histológica é uma técnica indispensável para o estudo celular de órgãos e tecidos, pois possibilita a identificação de componentes estruturais diferentes. Algumas das substâncias mais utilizadas nas práticas rotineiras em histologia e patologia são os corantes, principalmente os de combinação H&E - Hematoxilina e Eosina. A hematoxilina, um composto básico que reage com estruturas ácidas como núcleo celular contendo DNA, RNA, e a eosina, é um corante ácido que evidencia estruturas básicas como citoplasma, e também tecido conjuntivo. Entretanto corantes histológicos são peculiares e encarregados de evidenciar componentes celulares específicos. Corantes especiais evidenciam estruturas como fibras colágenas, matriz cartilaginosa entre outras (Gartner & Hiatt, 2007; Oliveira et al 2018; Lopes et al. 2019; Timm, 2005).

Estudos sobre os corantes sintéticos revelaram sua toxicidade, como o azul de tripano, que proporciona efeitos tóxicos sobre a retina. A eosina amarela, amplamente empregada na rotina laboratorial, é altamente tóxica e possui vários efeitos adversos (Mittal et al 2013). Outros compostos sintéticos podem apresentar potencial carcinogênico, que levou a alguns corantes serem retirados do mercado (Kodjikian et al 2015; Anterino et al, 2014; Bassey et al., 2012; Avwioro et al 2007).

Alguns corantes são corantes importados, e de baixo acesso, que dificultam seu uso em laboratórios de pesquisa. Neste caso, o custo de importação encarece o processo. Países em desenvolvimento têm encontrado dificuldade em arcar com os custos crescentes de corantes sintéticos, e como solução para os gastos elevados e até mesmo a toxicidade prejudicial é a busca de corantes naturais nacionais (Avwioro et al 2007; Faoro & Souto 2011; Rohde et al., 2006).

A hematoxilina é um corante natural amplamente utilizado na rotina laboratorial obtido do cerne de Pau Campeche (*Haematoxylon campechianum*) (Bassey et al., 2012). Algumas outras plantas possuem pigmentos com propriedades similares a corantes já existentes e podem ser empregadas em uso alternativo na histologia, como o de *Curcuma Longa* (Bassey et al., 2012, Avwioro et al. 2007), *Hibiscus Sabdariffa* (Egbujo et al., 2008), *Rubus fruticosus* (Al-Tikriti e Walker 1977), *Lawsonia inermis*, (Wian et al, 2006), *Bixa ollerana* (Rohde et al. 2006 reestudado por Lopes 2019) *Morus nigra* também junto a *Bixa ollerana* (Oliveira et al. 2018), *Arrabidaea chica* que com APG IV (Souza Lorenzi 2019) sua nova classificação é *Fridericia chica* (Souza, Hidalgo e Chaves 2007), *Akanna tinctoria* (Kusculu et al. 2022) *Rubia tinctorum*, *Crocus sativus*, *Isatis tinctoria*, entre outros (Barcat 2003, Marhaba & Haniloo 2018).

Outros estudos comprovaram que algumas plantas apresentam pigmentos que podem ser empregados para a coloração parasitológica, como *Hibiscus sabdariffa* e a *Azadirachta indica* (Okolie 2008), *Hibiscus rosa sinesis*, *Betta vulgaris* (Cheng et al., 2014), *Lawsonia inermis* (Chukwu et al 2011), *Curcuma longa* e *Lawsonia inermis* (Daryani et al., 2011), *Junglas regia*, *Allium cepa* e *Rubia tinctorum* (Marhaba & Haniloo 2018) entre outros.

Este estudo prevê análises qualitativas com base em resultados entre potencial: Sendo características de coloração positiva, e aos que não contém potencial: Como características de coloração negativas, usando de métodos que contribuem para uma coloração tecidual efetiva, sendo uma forma de investigação para uso de espécimes que não possuem estudos voltados para tal desenvolvimento, além de inovar formas de atribuição e valor elevado às espécies vegetais abordadas.

Neste sentido, esse trabalho teve como finalidade ter como fonte de estudo as plantas que contivessem algum valor tintorial, para que possam ser exploradas na extração de pigmentos úteis nas práticas rotineiras de histologia. Com isso, seria possível substituir os corantes já existentes, evitar contaminação ou intoxicação dos profissionais da área, gerar menor impacto ambiental e reduzir a contaminação com o descarte indiscriminado de efluentes. Para tanto, foram selecionadas espécies vegetais ocorrentes na Mata Atlântica.

Dentre as plantas submetidas aos experimentos, destacam-se indivíduos do gênero *Croton*, pertencentes a família Euphorbiaceae. São plantas naturalmente comuns em ecossistemas brasileiros, matas ciliares, no qual em sua maioria, apresentam estruturas em cores vivas em sua maturidade estrutural. Todos os representantes contêm abrangência de estudos fitoquímicos voltados a finalidades fitoterápicas, como antifúngicos, antibióticos, analgésicos, anestésicos, entre outros efeitos e o estudo de Soldera et al. (2010), afirmam que existem propriedades atribuídas à saúde sendo antibacterianos dentre outras especificidades. Além de sua característica comportamental de sucessão ecológica na formação do bioma, desde daninha, pioneira e até climáxica, (Souza et al 2011, Lorenzi 2019, Candido et al, 2018, Fernandes et al 2010, Golunski et al 2015, Moreira et al 2002), entretanto não existem estudos de corantes extraído destas espécies para fins diferenciais clínico-laboratoriais, apenas para em outros fins de pigmentação, como na indústria têxtil, conferindo cores de castanho-avermelhado a bege, com auxílio de mordentes metais (Silva et al 2020).

2. Metodologia

2.1 Espécies vegetais

Foram selecionadas diversas espécies vegetais encontradas regionalmente, que continham em suas estruturas colorações que se destacavam em meio à vegetação (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de espécies vegetais pertencentes à Mata Atlântica para extração de pigmentos testados, apresentando nome usualmente conhecido na região de coleta, e dados do espécime, e estruturas utilizadas como matéria prima de extração de pigmentos.

Nome Usual	Família	Espécie	Órgão Veg. p/ Extração
Feijão-de-rola	Fabaceae	<i>Macroptilium lathyroides</i>	Flor
Capixinguim	Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>	Casca
Arnica	Asteraceae	<i>Solidago microglossa</i>	Folhas
Mamica de porca	Rutaceae	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Casca
Sassafrás	Lauraceae	<i>Ocotea dodrifera</i>	Casca
Pindaíba-vermelha	Annonaceae	<i>Xylopiá brasiliensis</i>	Casca
Sangra d'água	Euphorbiaceae	<i>Croton urucurana</i>	Casca
Vassourão negro	Asteraceae	<i>Piptocarpa macropoda</i>	Casca
Melão-de-São-Caetano	Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	Fruto

Fonte: Autores (2018).

2.2 Coleta

Espécimes de *Croton urucurana*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Ocotea odorifera*, *Xylopiá brasiliensis*, *Piptocarpa macropoda* e *Solidago microglossa* foram coletados em um fragmento florestal situado na zona rural da cidade de

Silvianópolis – MG no Bairro dos Vitorino. Frutos de *M. charantia* foram obtidos em um local próximo pertencente a mesma cidade, mas Bairro Sítio. E cascas de *Croton floribundus*, foram obtidas em um fragmento de mata na cidade de Santa Rita do Sapucaí. As flores de *M. lathyroides* foram coletadas na cidade de Pouso Alegre – MG, Bairro Pousada dos Campos III, uma vez que apresenta abundância em ambiente urbano.

2.3 Extração

A extração foi realizada utilizando-se duas metodologias.

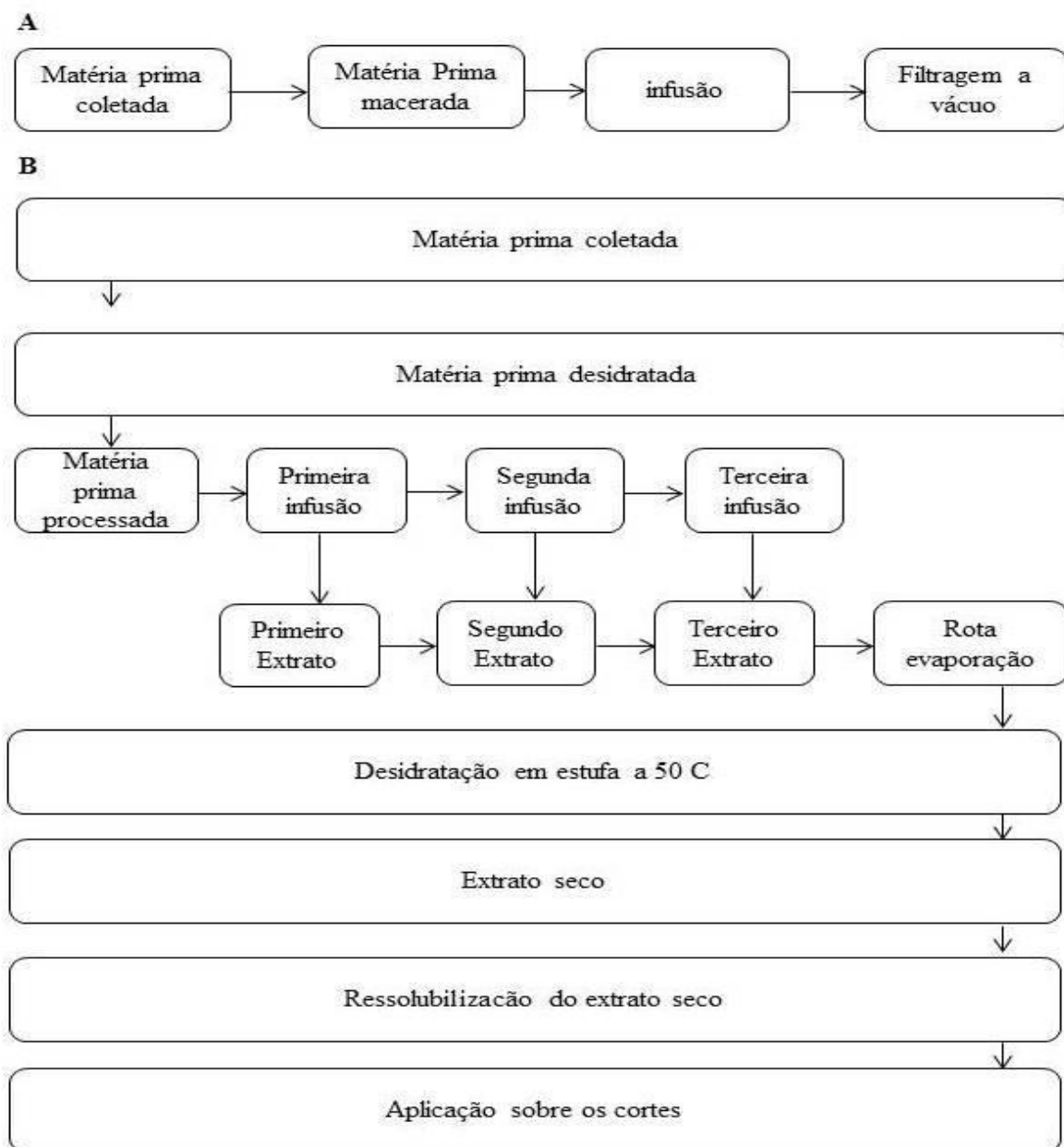
Na primeira, ocorreu de acordo com a melhor forma de se aproveitar os fragmentos vegetais utilizados para extração do pigmento. Foram considerados como pré-testes, os testes que não viabilizaram uma técnica padrão, mas apenas na extração compostos e aplicá-los sobre os cortes. Os pré-testes envolveram as seguintes plantas: flores de *M. lathyroides*, cascas de *C. floribundus*, folhas de *S. microglossa*, cascas de *Zantoxylum Ruifolium*, cascas de *O. odorifera*, cascas de *X. brasiliensis*, cascas de *P. macropoda*, fruto de *M. charantia*, cascas de *C. urucurana*. Cada planta foi utilizada com diferentes tecidos vegetais para obtenção de pigmentos. O solvente utilizado foi etanol 70% (Figura 1).

Foram analisadas a viabilidade de uso dos pigmentos obtidos, e triados entre a primeira etapa e a segunda etapa. Os que não apresentaram nenhum resultado não foram utilizados na segunda etapa.

Na segunda etapa, foram programadas extrações padrões aos quais os pigmentos foram extraídos de mesma forma e proporção a ponto de viabilizar uma técnica. As cascas de *C. floribundus*, *Z. Ruifolium*, *O. odorifera*, *X. brasiliensis*, *P. macropoda*, *C. urucurana*, e folhas de *S. microglossa* foram quebradas em pedaços menores e desidratadas, e pesadas periodicamente a cada 24 horas, a fim de avaliar a perda de água para o ambiente, foram consideradas secas aquelas que não tinham mais alteração de peso. Após a secagem, foram trituradas e pulverizadas até se obter material fino e uniforme. 10g de material vegetal foi infundido em 100 ml de etanol 70%. O extrato foi obtido por filtração a vácuo após sete dias. O procedimento foi repetido por três vezes, o qual se totalizou 21 dias. O fluido etanólico resultante da extração foi levado ao aparelho rotavaporizador para condensar as amostras, e o condensado inserido em placas de petri, posteriormente levadas à estufa a 50°C para obtenção do extrato seco, os extratos secos foram ressolubilizado na proporção de 1:10. (Figura 1). Padrões que foram estabelecidos pelos autores do trabalho que melhor demonstraram desprendimento de pigmentos.

Então foi feito o teste de coloração nos tecidos: coração, intestino, encéfalo e pele. Após a coloração com os extratos, os cortes foram desidratados, clarificados e selados com verniz entre lâmina e lamínula. Os extratos também foram avaliados sobre cortes transversais de pecíolo de abacateiro (*Persea americana*) para avaliar a coloração de componentes estruturais em vegetais.

Figura 1 - A. Método de extração de folhas flores e frutos vegetais, envolvendo os processos desde a coleta até o extrato seco produto final. **B.** Método de extração de cascas vegetais, envolvendo os processos desde a coleta até o extrato seco produto final.



Fonte: Autores (2018).

2.4 Histotécnica animal

As peças histológicas foram obtidas de ratos Wistar do biotério, da Faculdade de Ciências da Saúde “Dr. José Garcia Coutinho” da Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre (MG). Foram anestesiados e sacrificados para extração dos tecidos e fixação em solução de formalina tamponada. A utilização de animais nesta pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Sapucaí (162/12). Todo o procedimento executado manteve os parâmetros éticos, e a legislação disposta pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária.

O material foi fixado, desidratado em proporções alcoólicas crescentes, clarificados em xilol, e impregnados e incluídos em parafina a 60°C. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo rotativo de parafina a quatro micrômetros, pescados em banho histológico, em torno de 50°C, utilizando lâminas de microscopia. As seções foram submetidas à estufa a

60°C por 1 hora para adesão. A desparafinização foi feita com uso de xilol e em séries alcoólicas precederam a coloração.

2.5 Histotécnica vegetal

Pecíolos de folhas frescas de *Persea americana* foram seccionadas manualmente e distendidas em água destilada. Os cortes foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio, lavadas em água corrente e submetidas à coloração pelos extratos. Para a preparação histológica, as secções foram lavadas e montadas entre lâmina e lamínula com água destilada.

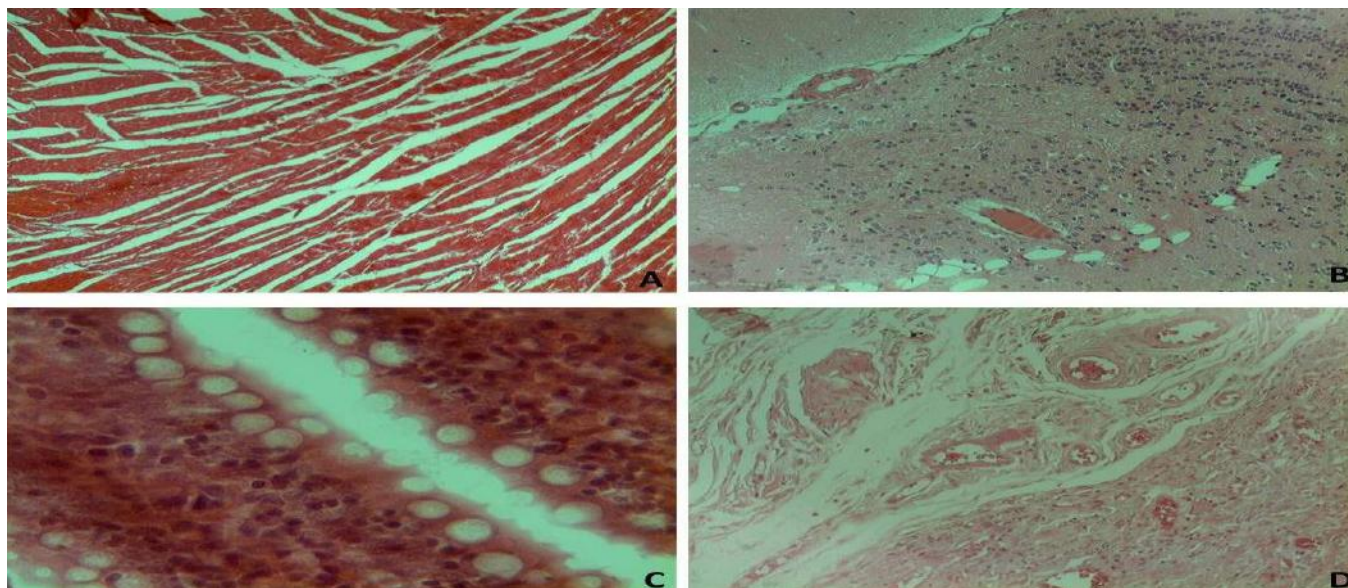
2.6 Análises da coloração

As lâminas de tecido animal e vegetal foram analisadas por microscopia óptica. Realizou-se foto micrografias no aumento de 100x (câmera Moticam M1000, software Moticam Image Plus).

3. Resultados e Discussão

As lâminas coradas pela técnica H&E (hematoxilina e eosina) demonstraram boas condições do tecido e certificaram a preservação de estruturas celulares e teciduais pela técnica empregada como controle positivo (Figura 2).

Figura 2 - **A** Corte histológico de coração corado em Hematoxilina e Eosina. **B** Corte histológico de encéfalo corado em Hematoxilina e Eosina. **C** Corte histológico de intestino corado em Hematoxilina e Eosina evidenciando as criptas de Lieberkuhn sem coloração nos mucopolissacarídeos. **D** Corte histológico de pele ao qual é possível observar o corte transversal de vasos sanguíneos, corados em Hematoxilina e Eosina.



Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

Com base nos padrões de coloração obtidos nas combinações H&E e PAS foram comparadas as lâminas coradas a partir dos extratos.

A técnica foi feita pelo autor Barbosa W. J. conforme as necessidades de melhor tempo de adesão do pigmento dos extratos ao tecido, não intervindo na técnica e nem no tempo da coloração de H&E, mas os quais mostraram melhor efeito de coloração nas lâminas foi uso de extratos pipetados sobre a lâmina com espera de duração de 40 minutos, após esse período as lâminas foram seladas em verniz incolor e levadas a microscopia óptica. No estudo de Nunes e Cinsa et al 2016 apresentam alguns fatores que interferem nos resultados de coloração de lâminas.

(...) A boa fixação de um tecido depende dos seguintes fatores: temperatura, espessura do tecido, penetração, tempo de fixação, escolha do fixador, relação do volume fixador/tamanho do espécime, estocagem apropriada, pH do fixador, osmolaridade da solução fixadora, adição de sais na mistura e concentração dos fixadores(...). (Nunes e Cinsa et al 2016).

Ou seja, o tempo de coloração das aplicações dos extratos pode interferir nos resultados de forma positiva, mas não significa que seja a única maneira, pois os estudos de diversos autores demonstram uso de sais, de mordentes, de alteração de PH dentre outras formas de manipulação de corantes naturais para melhores resultados de aplicação, como nos estudos de Lopes et al 2018 e de Oliveira et al 2018.

Como esse estudo realça a avaliação do potencial de coloração dos espécimes, o estudo do presente trabalho pretende investigar os estratos de forma a não conter interesse de manipulação com uso de substâncias diferentes tais como sais e ácidos, averiguando o potencial de coloração das nove espécimes supracitada.

3.1 *Macroptilium lathyroides*

O extrato desse espécime não conteve efeitos satisfatórios nos pré-testes, pois não conferiu coloração em nenhum componente celular ou tecidual. Deste modo, é notável que o método para confecção do extrato não é eficiente e necessita-se de maiores estudos. Pois nos estudos de Kusculu et al 2022 demonstram resultados diferentes de coloração com uso de substâncias denominadas mordentes e com PH específico, oque não é uma variável ainda testada no uso dos pigmentos desta planta em questão.

3.2 *Momordica charantia*

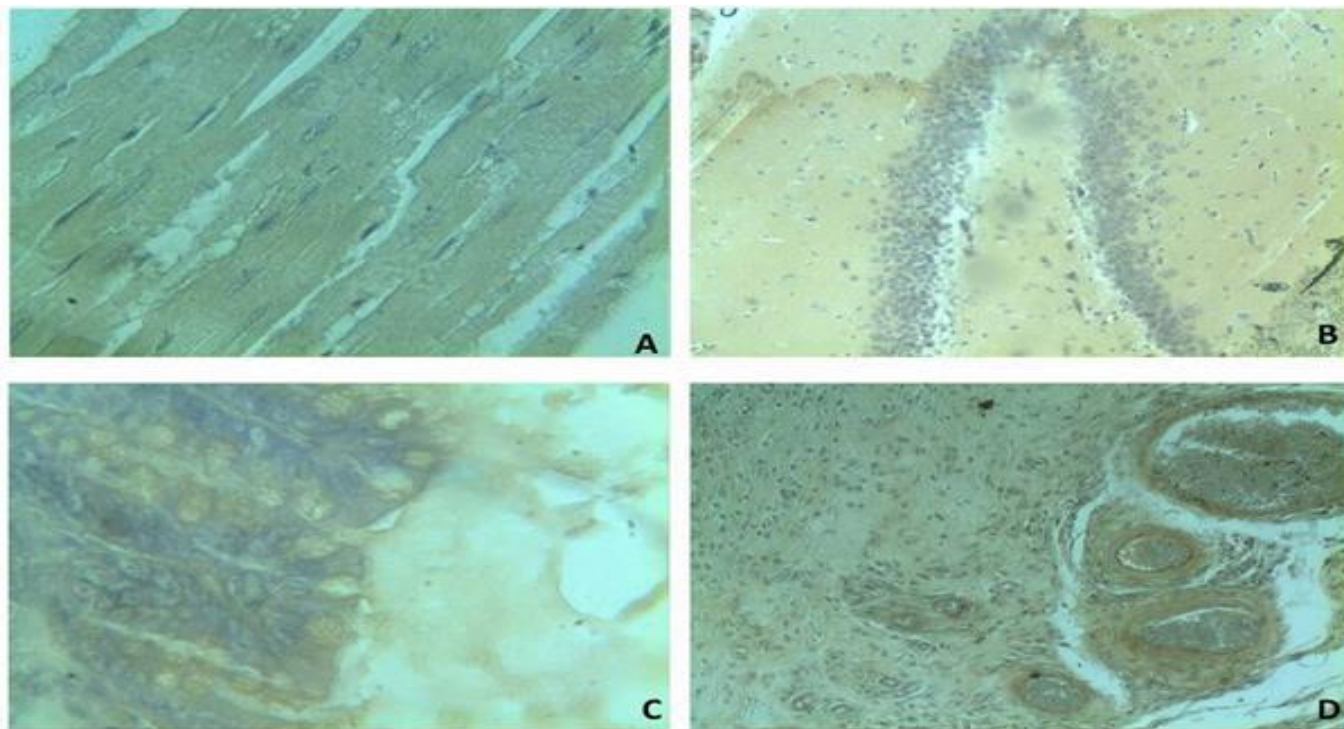
A técnica realizada não conferiu coloração a nenhum componente celular desde os pré-testes, não passaram para a segunda etapa mediante, portanto não conteve efeitos satisfatórios. Tal afirmação ainda não dispõe descarte total do espécime para estes fins, pois estudos como Pereira et al 2018 fizeram teste de mudança de PH nos estratos de madeira de *Eucalyptus spp*, para conferir diferença entre seus testes e pigmentação, mas também uso de mordentes é algo a futuros estudos.

Momordica charantia (Cucurbitaceae), *Macroptilium lathyroides* (Leguminosae) ambas foram extraídas de estruturas muito moles como frutos, folhas e flores, o que não trouxeram resultados muito conclusivos, pois não estabeleceram nenhuma ligação química forte o suficiente para conferir coloração a componentes celulares, animais e nem vegetais (Nunes & Cinsa 2016).

3.3 *Croton floribundus* e *Croton urucurana*.

Croton floribundus é uma espécie pioneira e de características de plantas secundarias nas florestas semidecíduas da Mata Atlântica. Na técnica aplicada a presente planta demonstrou efeitos satisfatórios, apresentou coloração em tons amarelados e alaranjados ao citoplasma, fibras colágenas e mucopolissacarídeos. (Figura 3).

Figura 3 - **A** Corte histológico de coração corado em Hematoxilina e extrato de *C. floribundus*. **B** Corte histológico de encéfalo corado em Hematoxilina e extrato de *C. floribundus*. **C** Corte histológico de intestino corado em hematoxilina e *C. floribundus* evidenciando as criptas de Lieberkuhn corando principalmente mucopolissacarídeos. **D** Corte histológico de pele ao qual é possível observar o corte transversal de vasos sanguíneos, corados em Hematoxilina e extrato de *C. floribundus*.



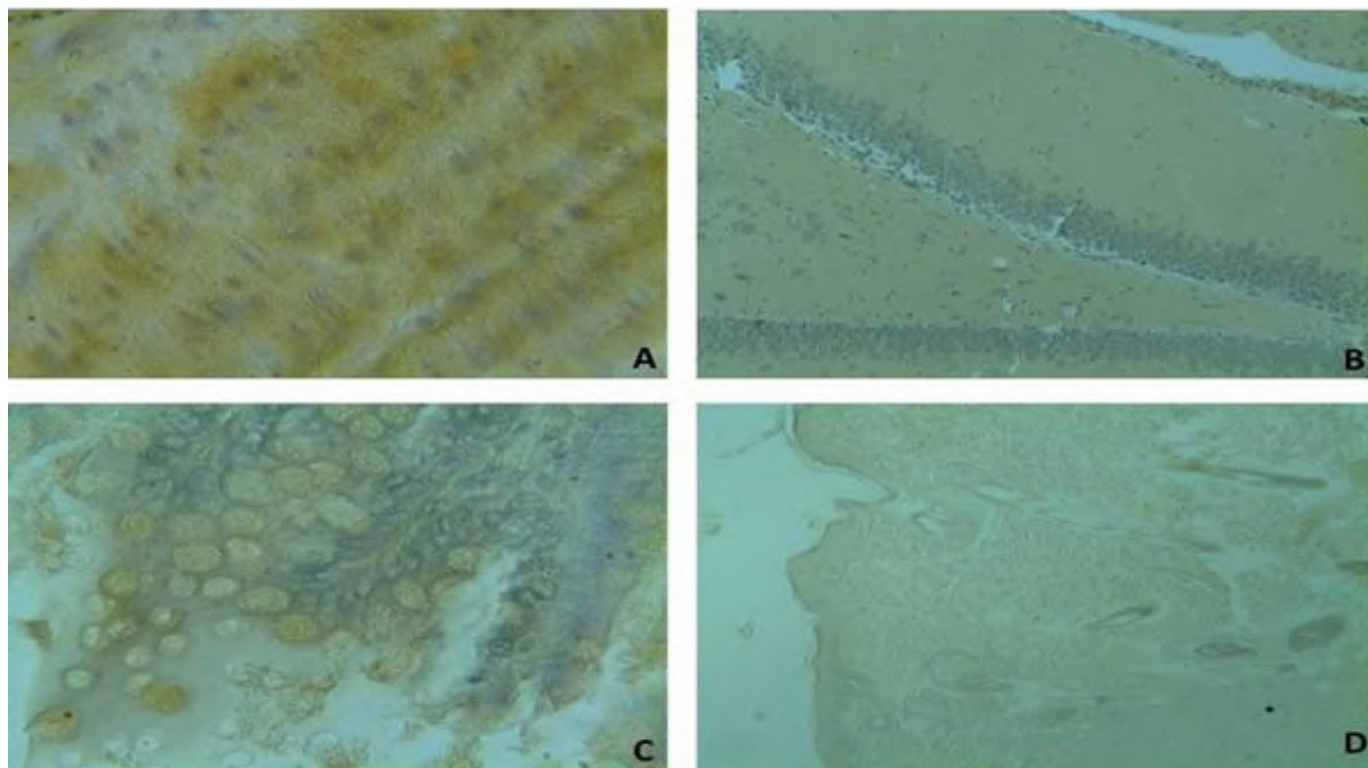
Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

A técnica aplicada a presente planta teve efeitos satisfatórios, *Croton urucurana* apresentou coloração em mesmos tons e padrões que a *Croton floribundus*, além de evidenciar citoplasma e fibras colágenas e mucopolissacarídeos (Figura 4). Vale ressaltar testes de uma extração não convencional, em que foram depositadas cascas de *C. urucurana* e água em autoclave, o fluido resultante foi seco em estufa, solubilizado em etanol 70% e aplicado sobre os cortes e também se obteve mesmo efeito indicando que a substância que evidencia as estruturas em tons alaranjados apresenta termo resistência.

Conforme Nunes e Cinsa et al 2016 temperatura é uma variável importante para uma coloração efetiva, o que indicam que tal substância pode promover diversos estudos e desenvolvimentos de técnicas variadas para melhor aplicabilidade de seu uso em um ambiente laboratorial, dentre outras variáveis.

Estudos envolvendo as espécies do gênero *Croton* são muito variados, portanto não somente foi provado nesse estudo que a *C. floribundus* e a *C. urucurana* são promissoras para a área da histologia, pois para farmacologia já possuem diversos estudos envolvendo a planta de *C. urucurana*, como portadora de propriedades antibacterianas pois Soldera et al 2010 diz em seu estudo que em seu látex quando em período sem floração, apresentam propriedades que afetam cepas de *S. aureus*, demonstrando outras áreas de grande impacto científico além da histologia propriamente dita. Dentro da literatura é difícil ou praticamente nula a existência de estudos envolvendo tais espécimes para uso laboratorial voltado para a histologia.

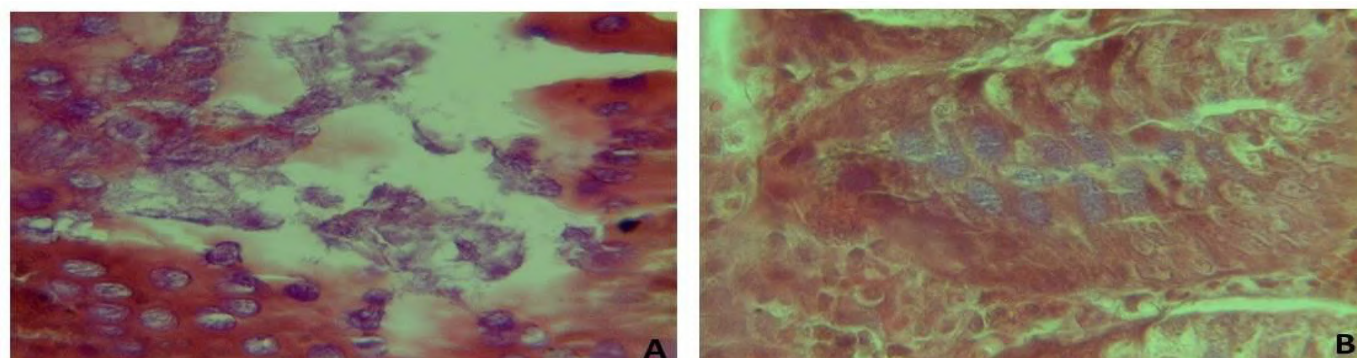
Figura 4 - **A.** Corte histológico de coração corado em Hematoxilina e extrato de *C. urucurana*.. **B.** Encéfalo corado em Hematoxilina e extrato de *C. urucurana*. **C.** Intestino corado em hematoxilina e *C. urucurana* evidenciando mucopolissacarídeos em células caliciformes. **D.** Pele corada em Hematoxilina e extrato de *C. urucurana*.



Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

A coloração de mucopolissacarídeos pelos extratos do gênero *Croton* foi certificada pela comparação com secções de intestino delgados submetidos à reação histoquímica de PAS (Ácido Periódico-Schiff) (Figura 5). A preservação e distribuição de mucopolissacarídeos foram comprovadas e evidenciadas pela coloração padrão de PAS. A técnica controle demonstrou reação positiva em regiões similares ao extrato na lâmina teste tanto com estratos de *C. urucurana* quanto em *C floribundus*. Com base nestes resultados, é possível corroborar que estas espécies apresentam pigmentos com grande afinidade a mucopolissacarídeos tendo grande potencial de substituto a esta técnica histoquímica padrão. Tal reação ainda não contém comparativos utilizando as espécies supracitadas na literatura, exigindo mais estudos para sua compreensão.

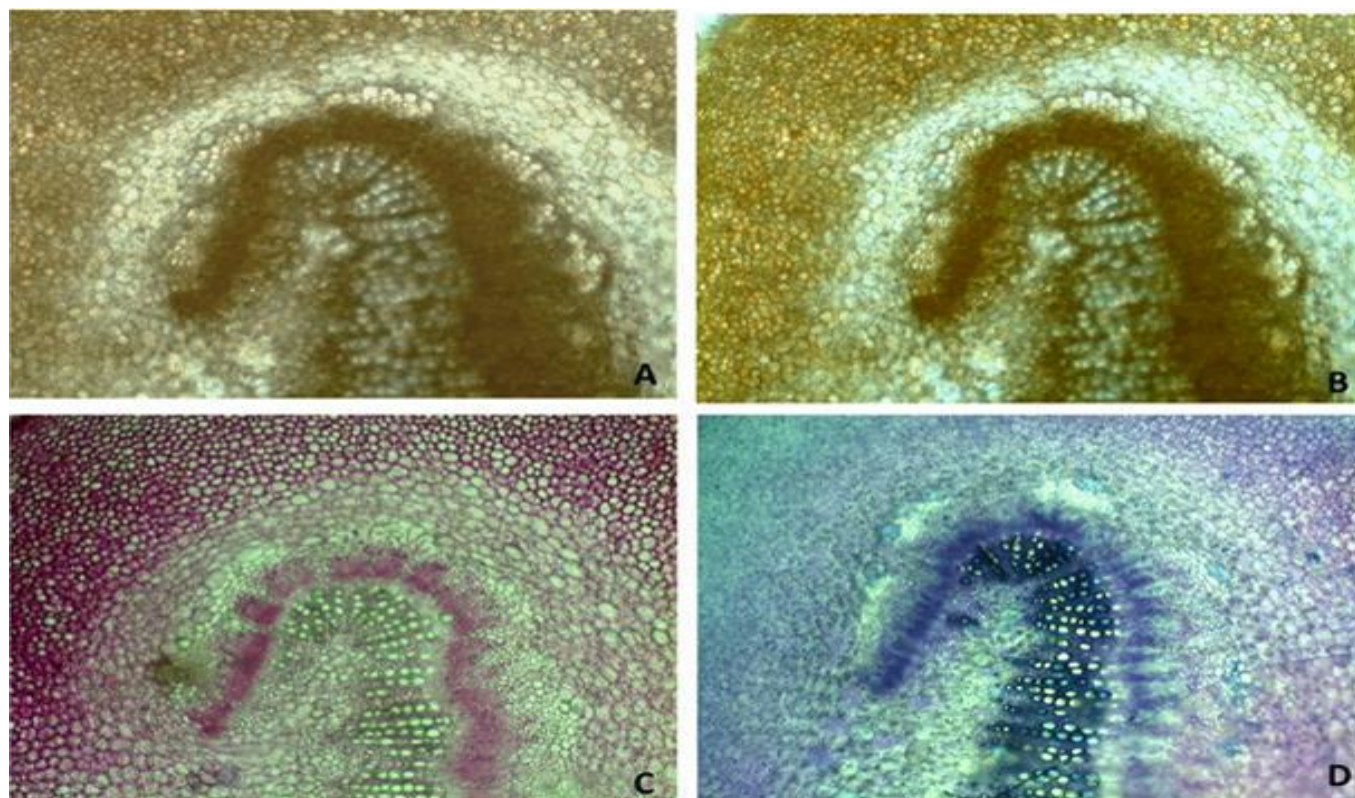
Figura 5 - **A** Corte histológico de intestino corado em Hematoxilina, Eosina e PAS identificando mucopolissacarídeos na luz intestinal. **B** Corte histológico de intestino corado em Hematoxilina, Eosina e PAS identificando Criptas de Liberkuhn.



Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

Foram feitas secções de pecíolo de abacateiro (*Persea americana*) à mão com uso de navalhas de micrótomo apoiadas sobre uma superfície de uma tampa de placa de petri a fim de conseguir um corte mais fino e uniforme possível, para serem testados os extratos de *Croton floribundus* e *Croton urucurana*, com tempo de 40 minutos de solução de 1:10 de diluição em etanol 70% em cada extrato testado, metodologia desenvolvida pelo autor, onde conferiram coloração a estruturas vasculares, constituídas de lenhinas, ligninas, poli fenóis e celulose. É plausível comparar este padrão de coloração vegetal à distinção de células caliciformes do intestino, que promovem síntese e secreção de mucopolissacarídeos. Ambos os componentes contêm abundância de polímeros de glicose (Carrapiço 1998, Arruda et al 2008). Portanto, os extratos provenientes do gênero *Croton* podem apresentar grande afinidade a mucopolissacarídeos. As colorações de Ácido Periódico-Schiff (PAS) e Azul de Toluidina foram ambas capazes de destacar regiões similares aos extratos vegetais (Figura 6).

Figura 6 - **A.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado em e extrato de *C. urucurana*.. **B.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado em e extrato de *C. floribundus*.. **C.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado em Ácido Periódico-schiff (PAS). **D.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado em Azul de Toluidina.



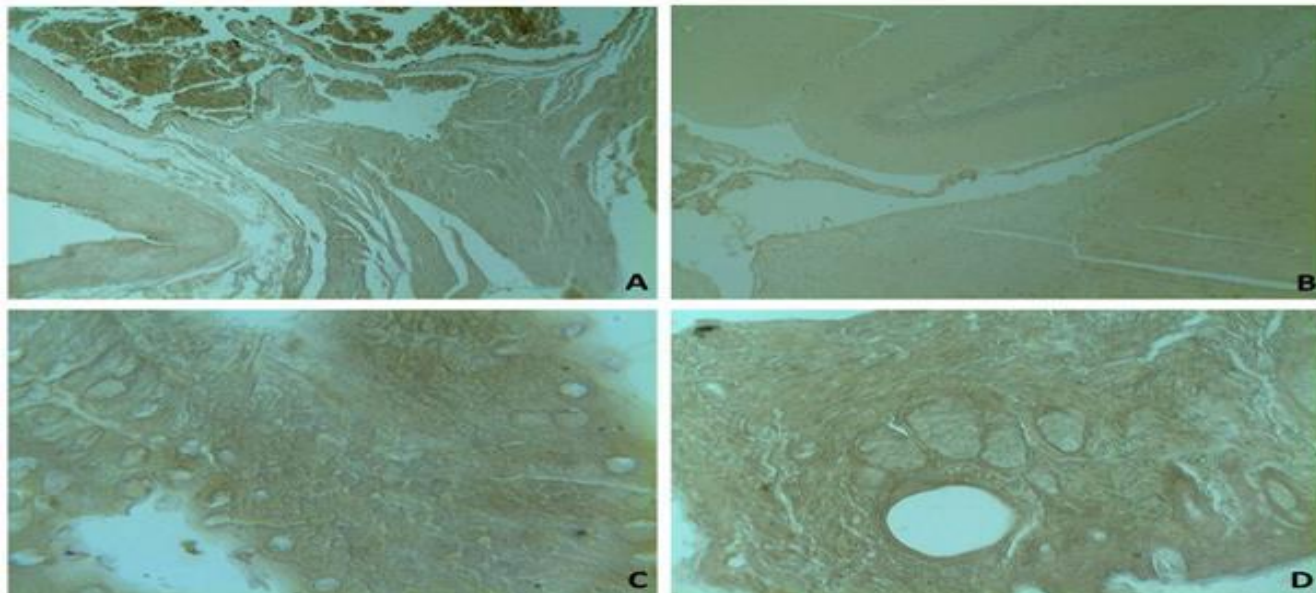
Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

3.4 *Ocotea odorifera*

O presente estudo revelou que o extrato da *Ocotea odorifera* é um corante viável. Sua coloração em tons em cor marrom e marrom claro conferiu cor no citoplasma contendo em si propriedades ácidas. No encéfalo, as meninges apresentaram coloração mais intensa, além da túnica íntima das artérias (Figura 7).

O extrato proveniente de *O. odorifera* (Lauraceae) conferiram coloração a fibras colágenas, que leva a propiciar uma alternativa interessante à eosina e outros corantes que também contêm esse mesmo efeito como Tricrômico de Masson ou Picrossirius. A importância de se evidenciar colágeno em lâmina se dá por vários diagnósticos que dependem deste componente extracelular para identificar patologias como hérnias entre outras doenças (Junior, Trindade & Cerski 2003).

Figura 7 - A. Corte histológico de coração corado em hematoxilina e extrato de *O. odorifera*. **B.** Corte histológico de encéfalo corado em hematoxilina e extrato de *O. odorifera*. **C.** Corte histológico de intestino corado em hematoxilina e *O. odorifera*. **D.** Corte histológico de pele ao qual é possível observar o corte transversal de vasos sanguíneos, corados em hematoxilina e extrato de *O. odorifera*.

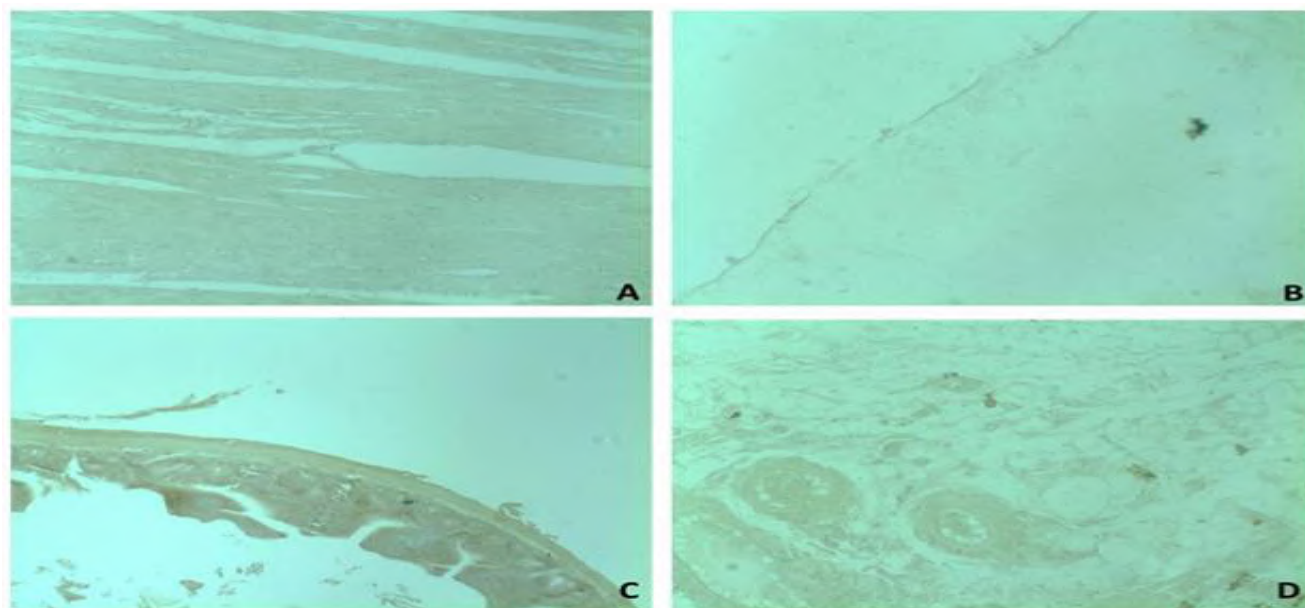


Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

3.5 *Xylopiya brasiliensis*

O extrato das cascas de *X. brasiliensis* conferiu coloração em tons marrons, e amarelos claros não tão satisfatório aos conteúdos citoplasmáticos (Figura 8). A coloração revelou redução da coloração de estruturas nucleares pela hematoxilina.

Figura 8 - A. Corte histológico de coração corado em Hematoxilina e extrato de *X. brasiliensis*. **B.** Corte histológico de encéfalo corado em Hematoxilina e extrato de *X. brasiliensis*. **C.** Corte histológico de intestino corado em hematoxilina e *X. brasiliensis*. **D.** Corte histológico de pele ao qual é possível observar o corte transversal de vasos sanguíneos, corados em Hematoxilina e extrato de *X. brasiliensis*.



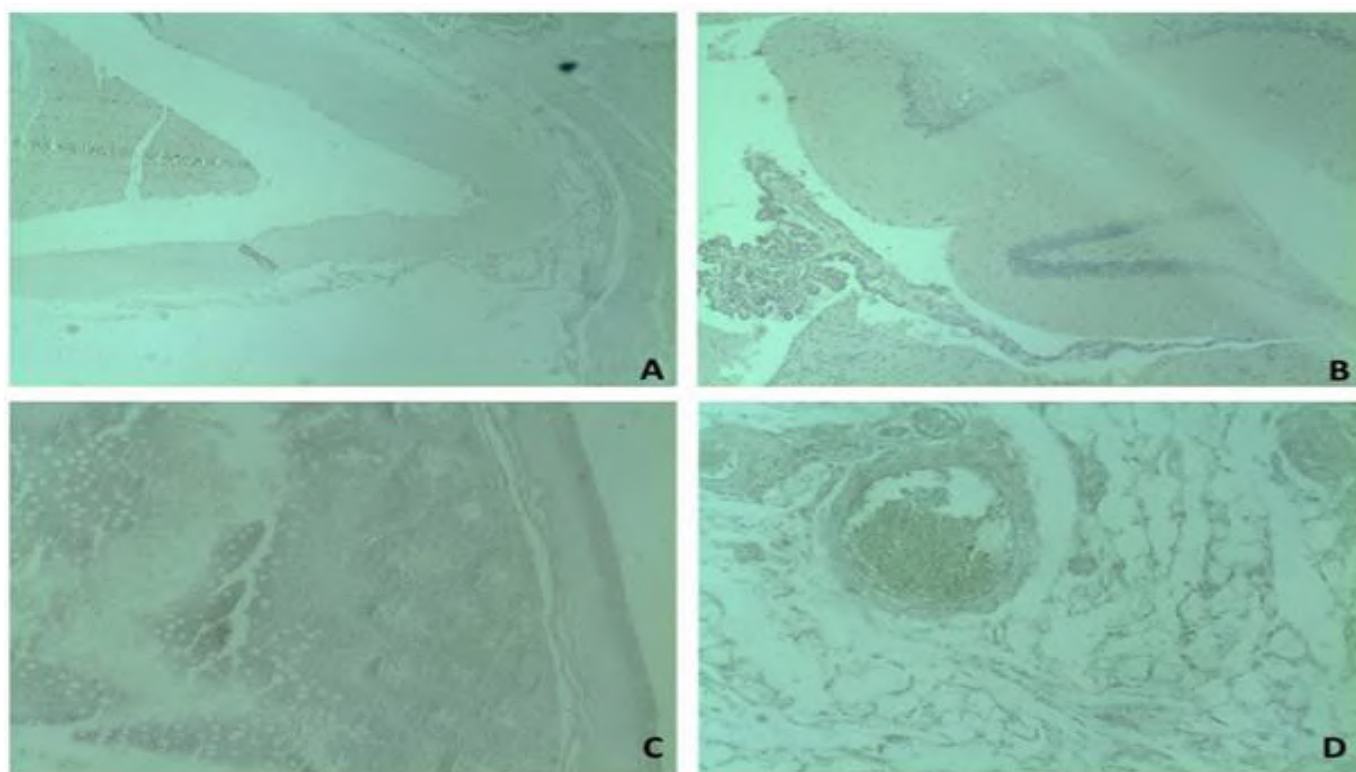
Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

As plantas de *X. brasiliensis* possuíam frutos em formação, e estavam no fim de sua floração, onde podem ser motivos para que se necessite de mais estudos, pois de acordo com Soldera et al 2010 as mudanças de fase vegetativa das plantas como reprodução, produção de flores ou frutos podem interferir nas propriedades de todos os componentes de uma planta, necessitando ainda de estudos aprofundados para compreender as substâncias e suas ações histológicas.

3.6 *Zanthoxylum rhoifolium*

Foram revelados alguns componentes celulares em tons de marrom claro. Células do complexo coróide nos cortes de encéfalo, além de estruturas ricas em fibras colágenas nos cortes de pele. Evidenciou paredes arteriais de cavidades cardíacas em cortes de coração, todos em tons de bege e amarelo (Figura 9).

Figura 9 - A. Corte histológico de coração corado em hematoxilina e extrato de *Z. rhoifolium*. **B.** Corte histológico de encéfalo corado em hematoxilina e extrato de *Z. rhoifolium*. **C.** Corte histológico de intestino corado em hematoxilina e *Z. rhoifolium*. **D.** Corte histológico de pele ao qual é possível observar o corte transversal de vasos sanguíneos, corados em hematoxilina e extrato de *Z. rhoifolium*.



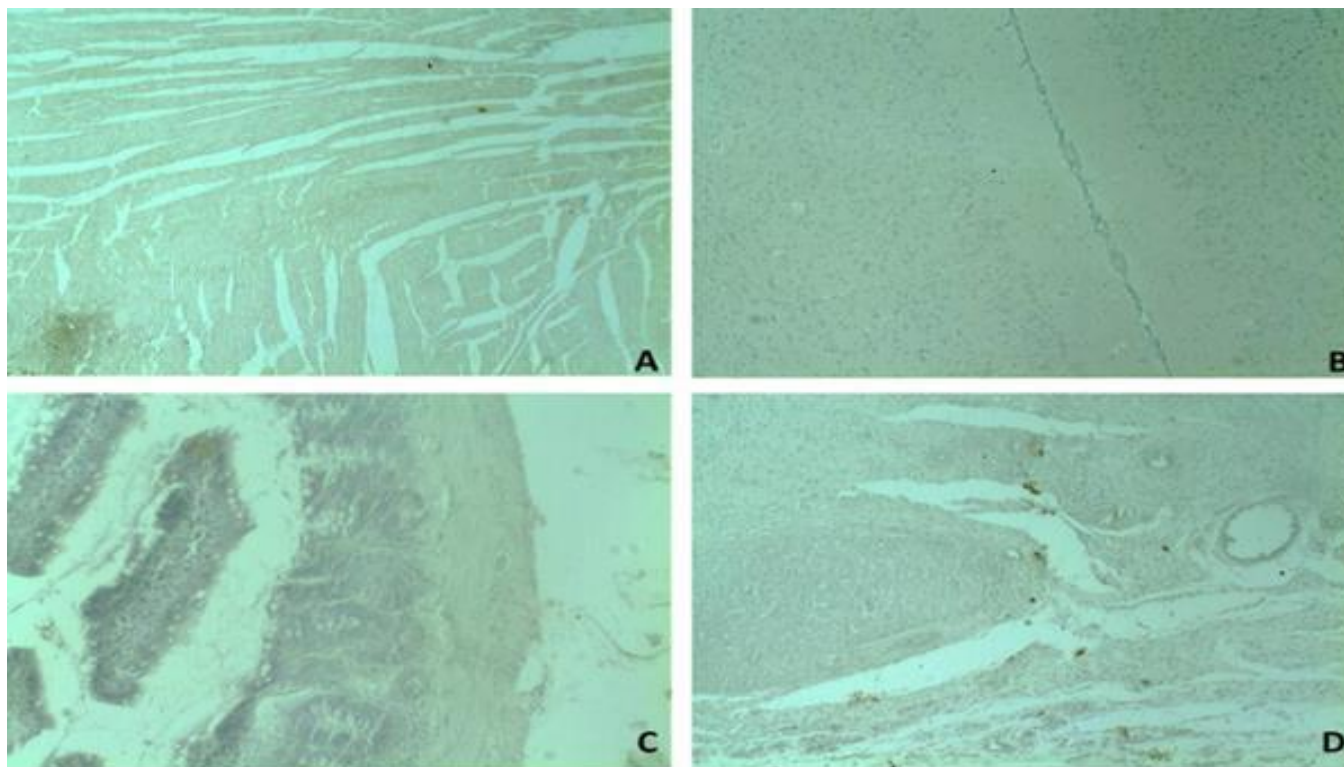
Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

3.7 *Piptocarpa macropoda*

Foram reveladas algumas estruturas em tons fracos de amarelo em estruturas ricas em fibras colágenas nos cortes de pele, todos em tons de amarelo entre claro e escuro, evidenciou também citoplasma, mas de maneira insatisfatória (Figura 10).

As estruturas celulares não puderam obter coloração tão eficiente quanto os demais. O extrato talvez seja uma substância pigmentosa cujas propriedades não proporcionam uma ligação direta, incapaz de reagir só com o tecido, impedindo a coloração necessária. Portanto, é necessário testar o uso de outras técnicas como o uso de mordentes a fim de proporcionar uma coloração mais satisfatória (Nunes & Cinsa 2016).

Figura 10 - **A.** Corte histológico de coração corado em Hematoxilina e extrato de *P.macropoda*. **B.** Corte histológico de encéfalo corado em Hematoxilina e extrato de *P.macropoda*. **C.** Corte histológico de intestino corado em hematoxilina *P.macropoda*. **D.** Corte histológico de pele, corados em Hematoxilina e extrato de *P.macropoda*.

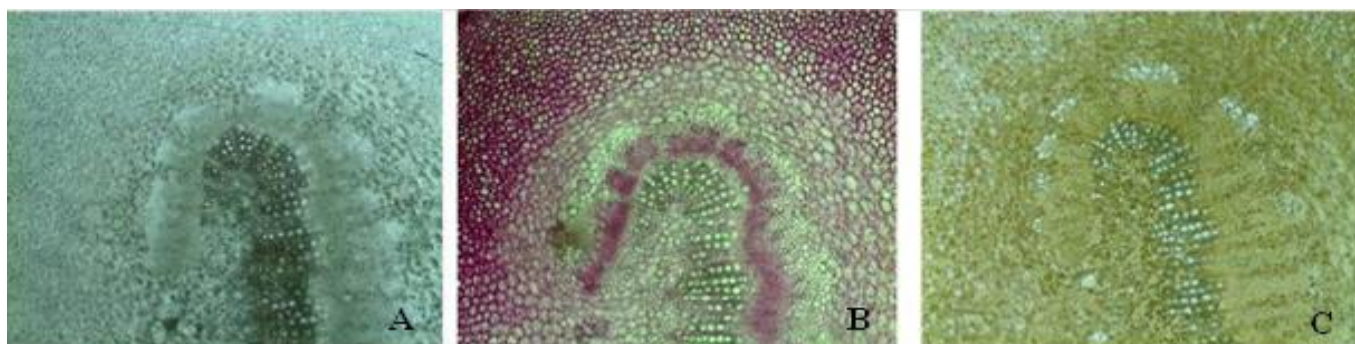


Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

3.8 *Solidago microglossa*

O extrato de *S. microglossa* não conferiu coloração a nenhum componente celular de nenhum tecido animal. Em tecido vegetal, houve coloração em tons em verde (Figura 11). O extrato contém potencial de coloração a parede celular. As folhas de *S. microglossa* (Asteraceae) proporcionaram coloração a estruturas vasculares como xilema, ricas em celulose (Carrapiço 1998).

Figura 11 - **A.** Corte de pecíolo de *Persea americana* como um controle negativo sem nenhuma coloração. **B.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado em Ácido Periódico-schiff (PAS). **C.** Corte de pecíolo de *Persea americana* corado com Extrato de *S. microglossa*.



Fonte: Autores (2018), feito no laboratório de Histotecnologia da universidade do Vale do Sapucaí.

4. Considerações Finais

Vários estudos foram realizados utilizando plantas que contivesse valor tintorial positivo para uso histológico e parasitológico, tornando-se potenciais substitutas de corantes presentes no mercado consumidor. Alguns exemplos são *Curcuma longa* (Zingiberaceae), que contém propriedades ácidas, corando citoplasma, *Betta vulgaris* (Amaranthaceae), potencial substituto do lugol em coloração de parasitas, *Lawsonia Inemis* (Lithereaceae), na contra coloração de bactérias Gram-positivas, além de possuir propriedades ácidas, e ter a capacidade de corar citoplasma uma estrutura básica (Avwioro et al 2014, Chukwu et al 2011, Cheng et al., 2014, Bassey et al 2012).

Rubus fruticosus (Rosaceae), *Morus nigra* (Moraceae) entre outras amoras que contém propriedades básicas, pois coram regiões nucleares. *Bixa orellana* (Bixaceae), assim como *Fridericia chica* (Bignoniaceae) contém propriedades ácidas, evidenciam citoplasma, substituindo a eosina em colorações histológicas. *Rubia tinctoria* (Rubiaceae) promove a coloração de estruturas calcificadas. *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) contém afinidade à regiões nucleadas, além de evidenciar ovas de vermes como *A. lumbricoides*. *Hibiscos rosa sinesis* (Malvaceae) potencial substituto do lugol em coloração de parasitas, *Azadirachta indica* (Meliaceae) que confere coloração ao citoplasma em tons verdes o que pode-se concluir um potencial substituto da eosina, além de evidenciar ovas de parasitas em tons acinzentados (Bassey et al 2012, Cheng, Saad & Abdullah 2014, Daryani et al 2011; Egbujo et al., 2008, Kodjikian et al 2005; Okolie, 2008; Rohde et al, 2006; Wian et al, 2006, Oliveira et al 2018).

As diversas plantas supracitadas já tiveram comprovação científica quanto aos seus potenciais de colorações, o que encoraja a busca de mais fontes alternativas de corantes, que por mais que já existam diversos estudos, ainda existem compostos naturais que não foram descobertos, além de substâncias naturais similares que as sintéticas, o que podem substituir outros corantes além de hematoxilina ou eosina.

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo, necessita-se estabelecer algumas condições técnicas como o tempo mínimo de coloração, concentração do corante, ou o uso de mordentes para potencializar a coloração conferida entre outros estudos, para enfim obter-se corantes naturais e nacionais alternativos para uso rotineiro na histologia, principalmente a partir de espécimes do gênero *Croton*, nesse estudo foi atribuído nome da substância a ser estudada de Crotonoína de Barbosa, pois sua atribuição no uso de coloração em tecidos é inédita, e com grandes oportunidades de estudos futuros.

Além disso, os espécimes que obtiveram resultados não tão esperados precisam ser melhor estudados, pois esta presente pesquisa avaliou apenas extrações com uso de água e etanol 70%, não testando outros diversos meios de extração de pigmentos, ainda também padronização de técnicas que possam contribuir para colorações mais efetivas, ou seja tal estudo avaliou as possibilidades de corar, e não as formas de extração, ou tempo padrão de cada espécime, direcionado diretamente no potencial ou não de coloração de tecidos de encéfalo, pele, intestino e coração de ratos Wistar.

Referências

- Al-Tikriti, S. A. & Walker, F. (1978). Anthocyanin BB: a nuclear stain substitute for haematoxylin. *Journal of Clinical Pathology*. 31(2): 194-6
- Anterino, S., Paiva, T. M. N., Silva, P., Zoby, L. C., Ferreira, J. M. & Motta Sobrinho, M. A. (2014). Adsorção do corante Eosina a partir de solução aquosa utilizando casca de marisco *Anomalocardia brasiliana*. *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*.
- Arruda, A. M. V., Fernandes, R. T. V., Silva, J. M. & Lopes, D. C. (2008). Avaliação morfo-histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. *Revista Caatinga, Revista Caatinga*, 21(2): 01-11.
- Avwioro, O. G., Onwuuka, S. K., Moody, J. O., Agbedahusi, J. M., Oduola, T., Ekpo, O. E & Oladele, A. A. (2007). *Curcuma longa* extract as a histological dye for collagen fibres and red blood cells. *Anatomical Society Britain and Ireland*, 210, 600-3.
- Barcat, J. A. 2003. Orceína y fibras elásticas. *Medicina Buenos Aires*, 63 (5): 453-6.
- Bassey, R. B., Oremosu, A. A. & Osinubi, A. A. A. (2012). *Curcuma longa*: Staining Effect on Histomorphology of the Testis. *Macedonian Journal of Medical Science*, 1 (5): 26-9.

- Carrapiço, F. J. N. (1998). Tecidos vegetais estrutura e enquadramento evolutivo. *Departamento de biologia vegetal/ Secção de Biologia celular e biotecnologia vegetal*. V unico
- Candido, H. M. N., Pereira, A. L., Cortines, E., Azevedo, M. M. DE, (2018), Censo Florestal de um trecho de Mata Ciliar urbana do Rio Paraíba do Sul, Três Rios, *Diversidade e Gestão*, RJ., 2(1):17-25.
- Cheng, C. W., Md Saad, S., Abdullah, R., (2014). Alternative staining using extract of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and red beet (*Beta vulgaris*) in diagnosing ova of intestinal nematodes (*Teichuris trichiuria* and *Ascaris lumbricoides*). *Europe Journal of Biotechnology and Bioscience*, 1(5): 14-8.
- Chukwu, O. O. C., Odu, C. E., Chukwu, D. I., Hafiz, N., Chidzie, V. N. & Onyimba, I. A. (2011). Application of extracts of Henna (*Lawsonia inermis*) leaves as a counter stain, *African Journal of Microbiology Research*, 5(21): 3351-6.
- Daryani, A., Sharif, M. & Meigouni, M. (2011). Staining of *Facicola hepatica* by natural herbal dyes, *Comparative clinical pathology*, 20(4): 305-8.
- Egbujo, E. C., Adisa, O. J. & Yahaya, H. B. (2008). A Study of the Staining Effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on the Histology Section of the Testis, *International Journal of Morphology*, 26(4): 927-930.
- Gartner, P. L. & Hiatt, L. J. (2007). Tratado de Histologia em cores, 3ed por Elsevier Editora Ltda.
- Golunski, C. M., Miotto, S. P. S., Junior, C. V., Corazza, T., Mienczki-Pereira, A. A., Mossi, A. J., Budke, J. C. & Casian, R. L. (2015). Diversidade e estrutura genética em *Ocotea odorifera* (Vell) Rohwer (Lauraceae) no Sul do Brasil. *PERSPECTIVA, Erechim*. 39(145): 41-52.
- Junior, I. W.; Trindade, M. R. M.; Cerski, C. T. (2003). O colágeno em fáscia transversal de pacientes com hérnia inguinal direta submetidos à videolaparoscopia, *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 18* (3): 196-202.
- Kodjikian, L., Richth, T., Beby, F., Flueckiger, F., Boehnke, M. & Garweg, J. G. (2005). Springer Nature, Toxic effects of indocyanine green, infracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium, *National Library of Medicine*, 243(9): 917-925. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-1121-6>.
- Kusculu, N. & Ester, F. (2022). Applicability of alkanet (*Alkanna tinctoria*) extract for the histological staining of liver tissue, *Journal of the Indian Chemical Society*, 4(99)1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100409>.
- Lopes, E. J. De S., Pereira, R. M., Mundim, F. G. L. & Mendonça, A. R. Dos A. (2019). Padronização do corante natural extraído à partir do urucum (*Bixa orellana*) e sua aplicação na histologia. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 11 (4) 1-12. <https://doi.org/10.25248/reas.e241.2019>.
- Lorenzi, H. & Souza, V. C. (2019). Botânica sistemática, (4a ed.), *Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda SP*.
- Mahaba, Z. & Hamilo, A. (2018). Staining of Parasitic Helminths by Extracts of *Allium cepa*, *Juglans regia*, and *Rubia tinctorum*: An Approach to Herbal Dyes., *Iranian Journal of Parasitology*. 13(2)293-300
- Mittal, A., Jhare, D., Mittal, J. (2013). Adsorption of hazardous dye Eosin Yellow from aqueous solution onto waste material De-oiled Soya: Isotherm, kinetics and bulk removal. *Journal of Molecular Liquids*, (179) 133-144.
- Moreira, I. C., Lago, J. H. G., Young, M. C. M. & Roque, N. F. 2003. Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopia brasiliensis*, *Sociedade Brasileira de Química*, 14(5): 828-831.
- Nunes, C. S. & Cinsa, L. A. (2016). Princípios do processamento histológico de rotina, *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, 8(Único): 31-40.
- Okolie, N. J. C. (2008). Staining of Ova of Intestinal Parasites with Extracts of *Hibiscus sabdariffa* and *Azadirachta indica*, *International Science Research Journal*, 1(2): 116-9.
- Oliveira, M. A. B., Pereira, S. T., Mendonça, A. R. Dos A.; Lopes, E. J. De S.; Mundim, F. G. L.; Pereira, R. M. (2018). Extratos de *morus nigra* L. (amora-preta) e *bixa orellana* L. (urucum) para substituição dos corantes hematoxilina e eosina (HE) na técnica histológica de rotina. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 11 (2) 1-10.
- Rohde, D. C., Silveira, S. O. & Vargas, V. R. A. (2006). O uso do corante do urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica* *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 38(2): 119-121.
- Sá, I. M.; Valle, L. S. & Almeida, G. S. (2007). A Tradição do Uso de Plantas Tintórias da Comunidade Rural de Santo Antonio do Rio Grande, *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5(1): 276-278.
- Silva, P. M. Dos S., Faschitello, T. R., Queiroz, R. S. De, Freeman, H. S., Costa, S. A. Da, Leo, P., Mondemor, A. F., Costa, S. M. Da, Natural dye from *Croton urucurana* Baill. bark: Extraction, physicochemical characterization, textile dyeing and color fastness properties, *Journal & Books Science Direct Elsevier*, v173, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107953>.
- Soldera, C. C.; Zanella, G. N. & Frasson, A. P. Z., (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana da *Croton urucurana*. *Revista contexto & saúde, Ijuí-MT, Editora Unijuí*, 10(19) 25-31.
- Souza, H.Q., Hidalgo, A. F., Chaves, F. C. M. (2007). Preparo do corante (*Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl.) e sua Aplicação em Histologia. *Horticultura Brasileira*, 25(1): 36.
- Souza, L. M. (2011). Estudo fitoquímico de *Macroptilium lathyroides* (L) urb. (Fabaceae). Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química III.
- Timm, L. L. (2005). Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas Histológicas, *Caderno La Salle XI*, Canoas, 2(1): 231-9.
- Wiam, I. M., Sonfada, M. I., Oke, B. O., Kwari, H. D., & Onyeyili, P. A. (2006). *Lawsonia inermis* And *Hibiscus sabdariffa*: Possible Histological Stains. *Tropical Veterinarian*, 24(1-2), 1-5.