

## Padronização do corante natural extraído à partir do urucum (*Bixa orellana*) e sua aplicação na histologia

Standardization of natural dye extracted from the annatto (*Bixa orellana*) and its application in histology

Normalización de colorante natural extraído del achiote (*Bixa orellana*) y su aplicación en la histología

Eliakim José de Souza Lopes<sup>1</sup>, Rodrigo Pereira Machado<sup>2</sup>, Fiorita Gonzales Lopes Mundim<sup>3</sup>, Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça<sup>4\*</sup>.

---

### RESUMO

**Introdução:** A utilização de corantes naturais é uma prática bem antiga, tendo evidências de uso datando cerca de 20 mil anos, os quais foram extraídos de fontes diversas (animais, vegetais ou minerais). Na rotina laboratorial, a maior parte dos corantes utilizados nas técnicas de coloração normal ou patológica são sintéticos, muitas vezes de difícil preparo e de pouco tempo de estocagem, envolvendo componentes que, segundo testes toxicológicos e químicos, tem efeitos prejudiciais à saúde de quem trabalha com eles e ao meio ambiente quando descartados. **Objetivo:** Este trabalho teve por objetivo analisar o emprego do corante natural extraído a partir do urucum (*Bixa orellana* L.) em colorações histológicas de tecidos animais, e padronizar os métodos de preparo e coloração, fazendo variações de quantia de matéria prima, pH e temperatura de coloração. **Métodos:** Através de análises espectrofotométricas de 24 grupos do corante com variáveis diferentes, e das microfotografias das lâminas dos grupos por um software (Image J), tentou-se determinar os melhores parâmetros para o preparo e coloração de lâminas histológicas com o corante de urucum. **Resultados:** a desidratação das sementes implica na qualidade do corante, visto que diminuiu os resultados de absorbância nas análises espectrofotométricas dos corantes, e a densidade óptica média na morfometria das lâminas. **Conclusão:** Pôde-se concluir que os melhores parâmetros são a utilização de 20g de sementes a cada 100mL de etanol 92,8°, sem adição de ácido acético, com coloração à temperatura ambiente, e que o urucum constitui um excelente substituto à eosina em colorações histológicas.

**Palavras-chave:** Corante de tecido, Lâmina, Urucum.

---

### ABSTRACT

**Introduction:** The use of natural colors is a very old practice, with evidence of use dating back about 20,000 years, which were obtained from various sources (animal, vegetable or mineral). In the standard procedure, most of the dyes used in normal or pathological staining techniques are synthetic, often difficult preparation and little storage time, involving components that, according toxicological and chemical testing, has adverse effects on health of those who work with them and the environment when discarded. **Objective:** This study aimed to analyze the use of natural dye extracted from the annatto (*Bixa orellana* L.) in histological staining of

---

<sup>1</sup>Acadêmico do curso Ciência Biológicas da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVAS), Pouso Alegre – MG.

<sup>2</sup>Mestrando em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas (Alfenas - MG).

<sup>3</sup>Professora do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde e do curso de Medicina da UNIVAS.

<sup>4</sup>Professora do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde e dos cursos de Biologia e Medicina da UNIVAS. \*E-mail: [drijar@hotmail.com](mailto:drijar@hotmail.com)

animal tissues, and standardize the methods of preparation and staining, making variations of amount of raw material, pH and temperature staining. **Methods:** By spectrophotometric analysis of 24 dye groups with different variables, and photomicrographs of the blades of the groups by software (Image J), we tried to determine the best parameters for the preparation and staining of histological slides with annatto dye. **Results:** Seed dehydration implies dye quality, as it decreased the absorbance results in the spectrophotometric analyzes of the dyes, and the mean optical density in the morphometry of the slides. **Conclusion:** It was concluded that the best parameters are the use of 20 g of seed at each 92,8° 100mL ethanol without addition of acetic acid, at room temperature with coloring, annatto and is an excellent substitute for eosin for histological staining.

**Keywords:** Fabric dye, Blade, Annatto.

---

## RESUMEN

**Introducción:** El uso de colores naturales es una práctica muy antigua, con la evidencia de su uso se remonta a unos 20.000 años, lo que se obtiene a partir de diversas fuentes (animal, vegetal o mineral). En el procedimiento estándar, la mayoría de los colorantes utilizados en las técnicas normales o patológicas de tinción son, preparación sintética a menudo difícil y poco tiempo de almacenamiento, involucrando componentes que, según las pruebas toxicológicas y químico, tiene efectos adversos en la salud de los que trabajan con ellos y el medio ambiente cuando se desechan. **Meta:** Este estudio tuvo como objetivo analizar el uso de tintes naturales extraídos del achiote (*Bixa orellana* L.) en la tinción histológica de los tejidos animales, y estandarizar los métodos de preparación y tinción, haciendo variaciones de cantidad de materia prima, el pH y la temperatura tinción. **Métodos:** Mediante el análisis espectrofotométrico de 24 grupos de tinte con diferentes variables, y microfotografías de las palas de los grupos de software (Image J), hemos tratado de determinar los mejores parámetros para la preparación y tinción de cortes histológicos con achiote. **Resultados:** la deshidratación de las semillas implica la calidad del colorante, ya que disminuyó los resultados de absorbancia en los análisis espectrofotométricos de los colorantes, y la densidad óptica media en la morfometría de las láminas. **Conclusión:** Se concluyó que los mejores parámetros son el uso de 20 g de semillas en cada 92,8° etanol 100 ml sin la adición de ácido acético, a temperatura ambiente con el colorante, achiote y es un excelente sustituto de eosina para tinción histológica.

**Palabras clave:** Tintura de telas, Hoja, Achiote

---

## INTRODUÇÃO

A utilização de corantes naturais é uma prática bem antiga, afirma a Associação Brasileira da Indústria Química (2009), tendo evidências de uso datando cerca de 20 mil anos. Segundo o mesmo autor, as matérias primas eram variadas, sendo extraídas de animais, como moluscos, por exemplo, de plantas ou de fontes inorgânicas, como a fuligem e o ocre. No entanto, o primeiro corante natural sintetizado com técnica mais apurada foi o Mauve, obtido em 1856 por Willian H. Perkin.

Os corantes histológicos podem ser divididos em dois grupos principais: corantes ácidos e corantes básicos. Um corante ácido contém uma carga líquida negativa em sua porção colorida, tendo, portanto, cromóforo aniônico, que tende a se combinar com os componentes celulares básicos, que são eletricamente positivos. Às estruturas que se coram com corantes ácidos dá-se o nome de acidófilas, onde a eosina, fucsina ácida e o Orange G são exemplos dos mais usados. Já um corante básico mantém uma carga líquida positiva em sua parte colorida (cromóforo catiônico) e combina-se com os grupamentos ácidos das células. Tais estruturas recebem o nome de basófilas, e podem ser coradas com hematoxilina, azul de metileno ou verde de metila, por exemplo (ROSS e PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). Os mordentes, segundo

Ross e Pawlina (2012) podem ser definidos como uma substância que faz uma ponte de ligação entre o corante e o componente tecidual.

A maior parte dos cortes histológicos de tecidos animais tem suas amostras fixadas em formol, incluídas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina (H-E), porém, dependendo do caso, outras técnicas de coloração são às vezes empregadas para demonstrar componentes celulares e teciduais específicos, que incluem o uso de materiais como a orceína, resorcina-fucsina e a prata, por exemplo, no preparo das colorações (BEHMER, 2003).

Alguns testes toxicológicos realizados com corantes sintéticos sob vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMG), segundo Santos (2007), comprovaram alguns efeitos colaterais como alergias, problemas circulatórios, gástricos e oftalmológicos, câncer dentre outros. O impacto da utilização de corantes sintéticos sobre a saúde causa preocupações, direcionando a atenção para o uso daqueles de origem natural, que pode ser desprovido de efeitos tóxicos (COSTA e CHAVES, 2005).

Conforme Souza e Lorenzi (2008), a família Bixaceae possui distribuição pantropical e inclui três gêneros: *Amoreuxia*, *Bixa* e *Cochlospermum*, com aproximadamente 15 espécies, sendo que Brasil possui dois gêneros nativos (*Bixa* e *Cochlospermum*) e cerca de cinco espécies, onde a espécie de maior destaque é *Bixa orellana*. Os representantes dessa família variam de ervas, subarbustos, arbustos a árvores, possuindo folhas alternas, simples, com estípulas, com margem inteira ou serrada. A inflorescência pode ser paniculada ou racemosa, com flores vistosas, bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, diclamídeas. O cálice é pentâmero, dialissépalo com pré-floração imbricada e a corola, também pentâmera, e dialipétala com pré-floração imbricada ou convoluta. O fruto é do tipo cápsula.

O urucum (*Bixa orellana* L.) é um arbusto pertencente à família Bixaceae, nativo da América do Sul, América Central e Ásia, de origem pré-colombiana. Possui um crescimento rápido, sem necessitar de muita água, podendo atingir até seis metros de altura, sendo portanto uma planta rústica e perene, pertencente à flora amazônica. Pode florescer e frutificar o ano todo, entretanto, a maior ocorrência é na primavera e no final do verão. As flores são hermafroditas, com cinco pétalas, surgindo na extremidade dos ramos. Os frutos são ovóides, tipo cápsula, com denso revestimento de espinhos moles. Os frutos são chamados de cachopas, tem coloração variada e abriga em média 54 sementes envoltas por arilos vermelhos, de onde se extrai seus pigmentos (RHODE et al., 2006; SANTOS, 2007; CASTRO, 2009).

Dos corantes naturais conhecidos, o urucum é um dos mais utilizados, sendo que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de sementes de urucum (MERCADANTE e PFANDER, 2001), representando cerca de 90% dos corantes naturais usados (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001). Os índios já faziam uso do urucum, e fazem até hoje, extraíndo a tintura vermelha das sementes para pintarem o corpo, e atualmente, o pigmento do urucum (a bixina), é usado, industrialmente, em diversos setores, como alimentício, farmacêutico, têxtil e cosmético (RHODE et al., 2006).

Tal corante é chamado, internacionalmente, de *annato*, e é extraído do pericarpo das sementes de *B. orellana*, consistindo em uma mistura de pigmentos de coloração amarelo-alaranjada em consequência da presença de vários carotenoides, cujo principal é a bixina (COSTA e CHAVES, 2005). De todos os carotenoides presentes no urucum, a bixina compreende cerca de 80% do total dos pigmentos (MERCADANTE e PFANDER, 2001), e juntamente com a norbixina, são os dois pigmentos mais importantes do urucum. A bixina consiste em um pigmento lipossolúvel, enquanto que a norbixina é um pigmento hidrossolúvel, que pode ser obtida com a saponificação da bixina. Tais componentes fazem com que o urucum tenha uma boa adesão às proteínas (RHODE et al., 2006).

Em outros trabalhos feitos (RHODE et al., 2006), já foi constatado que o urucum tem alto potencial como corante histológico, porém, ainda não foram estabelecidos os parâmetros que proporcionem os melhores resultados nas visualizações microscópicas com tal corante.

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo analisar o emprego do corante natural extraído a partir do urucum (*Bixa orellana* L.) em colorações histológicas de tecidos animais, e padronizar os métodos de

coloração, fazendo variações de quantia de matéria prima, pH e temperatura de coloração, já que, na rotina laboratorial, a maior parte dos corantes utilizados nas técnicas de coloração normal ou patológica são sintéticos, muitas vezes de difícil preparo e de pouco tempo de estocagem, envolvendo componentes tóxicos à quem os prepara ou ao ambiente, quando se vê a necessidade de descarte.

## **METODOLOGIA**

### ***Preparo das lâminas***

Para os cortes, foram utilizadas peças de baço de rato *Wistar*, fixadas com formalina tamponada por 24 horas (pH 7,4-7,4) e líquido de Bouin por 12 horas, as quais passaram por uma desidratação, ficando imersas em soluções crescentes etanol (70%, 95% e três absolutos), uma hora em cada solução, sob agitação em *shaker*, e foram diafanizadas por imersão por uma hora em duas soluções de xilol, também sob agitação. As peças foram impregnadas em parafina, mergulhando-as em dois banhos, um de uma hora e outro de duas horas, em estufa a 65°C. A espessura utilizada na microtomia foi a de 5µm, utilizando-se lâminas previamente limpas com solução aquecida de detergente a 10%.

### ***Preparo dos corantes***

Como matéria-prima dos corantes, utilizou-se as sementes extraídas, manualmente, dos frutos maduros. A metodologia envolvida no preparo dos corantes foi uma adaptação da utilizada por Rhode et al. (2006): preparou-se três soluções corantes com quantias de matéria-prima diferentes, 10g, 20g e 30g, as quais foram colocadas em 100mL de etanol 92,8° e submetidas a agitação por 24 horas, em frascos protegidos da luz. As soluções passaram por filtração a vácuo, e foram acondicionadas em frascos protegidos da luz.

### ***Desidratação das sementes***

Realizou-se uma desidratação de uma amostra de sementes (200g), em dois grupos: um à temperatura de 65°C e outro a 110°C. Cada grupo foi constituído de dez amostras com 10g de sementes, as quais ficaram em estufa por cinco dias, sendo aferidas suas massas diariamente no mesmo horário. Os dados coletados foram analisados por teste de Friedman, e as massas obtidas de cada desidratação foram comparadas por teste de Wilcoxon. Posteriormente, preparou-se mais três soluções corantes de cada grupo da desidratação, seguindo a mesma metodologia dos primeiros (10g, 20g e 30g).

### ***Análise espectrofotométrica***

As variáveis analisadas consistiram na quantidade de matéria-prima (10g, 20g e 30g / 100mL de etanol 92,8°), e na concentração de ácido acético (0%; 0,5%; 1% e 2%), onde o cruzamento das variáveis possibilitou a divisão de 24 grupos de teste, que podem ser visto na Tabela 1. De cada grupo, analisou-se a absorbância de dez amostras das soluções corantes.

Para determinação do pico de absorbância, do melhor espectro de leitura e do fator de diluição das amostras, fez-se, como teste piloto, uma diluição seriada da solução corante U1/U2, utilizando como solvente o etanol 92,8° e uma leitura nos espectros de 415, 445, 460, 490, 520, 535, 550, 580, 610 e 640nm.

Preparou-se para cada grupo de teste, 10 amostras das soluções corantes de sementes frescas, desidratadas a 65°C e desidratadas a 110°C. Cada amostra possuía 4mL, de onde 10µL eram do corante. Nos grupos com a variação de ácido acético, as amostras com concentrações de 0,5%, 1% e 2% continham, respectivamente, 20, 40 e 80µL de ácido acético. Todas as amostras permaneceram acondicionadas em tubos de ensaio vedados com papel filme e envoltos em papel alumínio, para evitar evaporação e degradação do corante pela luz.

Todas as amostras foram analisadas no espectro de 415nm, utilizando-se como “branco” o etanol 92,8°, e para os grupos com variação de pH, o mesmo álcool acrescido da respectiva concentração de ácido acético. Os dados obtidos passaram por análise estatística, tendo como base o teste de Friedman, comparando-se os grupos de 10g, 20g e 30g a cada concentração de ácido acético, e os grupos de 0%, 0,5%, 1% e 2% a cada proporção de matéria prima.

**Tabela 01:** Grupos de testes com suas respectivas variáveis.

<b>Grupo</b>	<b>Proporção (100mL etanol 92,8º)</b>	<b>Concentração Ác. Acético</b>	<b>Temperatura Coloração</b>
U1	10g	0%	Ambiente
U2	10g	0%	60°C
U3	10g	0,5%	Ambiente
U4	10g	0,5%	60°C
U5	10g	1%	Ambiente
U6	10g	1%	60°C
U7	10g	2%	Ambiente
U8	10g	2%	60°C
U9	20g	0%	Ambiente
U10	20g	0%	60°C
U11	20g	0,5%	Ambiente
U12	20g	0,5%	60°C
U13	20g	1%	Ambiente
U14	20g	1%	60°C
U15	20g	2%	Ambiente
U16	20g	2%	60°C
U17	30g	0%	Ambiente
U18	30g	0%	60°C
U19	30g	0,5%	Ambiente
U20	30g	0,5%	60°C
U21	30g	1%	Ambiente
U22	30g	1%	60°C
U23	30g	2%	Ambiente
U24	30g	2%	60°C

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

### **Coloração das lâminas**

Para cada grupo de teste, preparou-se 10 lâminas, que foram submetidas a um aquecimento a 65°C por uma hora, para em seguida serem desparafinizadas, passando por três banhos de xilol de cinco minutos cada, e hidratadas com três soluções de etanol absoluto (um minuto em cada), uma de etanol 95% (um minuto), uma de etanol 70% (um minuto) e água destilada (um minuto). Foram coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos, de onde retirou-se o excesso de corante com um banho de água de torneira por cinco minutos e dois banhos de água destilada.

Depois, foram desidratadas com etanol 70% por dois minutos e com etanol 92,8º por dois minutos para serem coradas com urucum por trinta minutos. Nos grupos com variação de temperatura, este tempo transcorreu com as lâminas dentro de uma estufa a 60°C. O excesso foi retirado com o próprio solvente do corante (cinco segundos), e prosseguiu-se a desidratação com dois banhos de etanol absoluto por cinco segundos. As lâminas foram diafanizadas passando por três xilóis, um minuto em cada, e montadas com verniz incolor (automotivo). Preparou-se também dez lâminas controle, coradas com a coloração padrão de hematoxilina e eosina, para comparação com as lâmina coradas com hematoxilina e urucum.

### **Análise morfológica**

De cada lâmina confeccionada, foram captadas imagens do tecido, utilizando uma câmera Opton, sem alteração de luminosidade, e de cada imagem, através do software Image J (versão 1.49, de Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), inverteu-se a coloração da fotografia com a ferramenta "Invert" e mediu-se

a densidade óptica média com o recurso “Measure”, de uma área de 22.500 pixels. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por teste de Friedman, comparando-se os grupos de 10g, 20g e 30g a cada concentração de ácido acético e os grupos de 0%, 0,5%, 1% e 2% a cada proporção de matéria prima, nas lâminas coradas a temperatura ambiente e a 60°C. Para comparação entre as lâminas coradas a temperatura ambiente e as coradas a 60°C foi feito um teste de Wilcoxon. O grupo com o melhor resultado estatístico foi comparado com um grupo controle (corado com hematoxilina-eosina) também através do teste de Wilcoxon.

## RESULTADOS

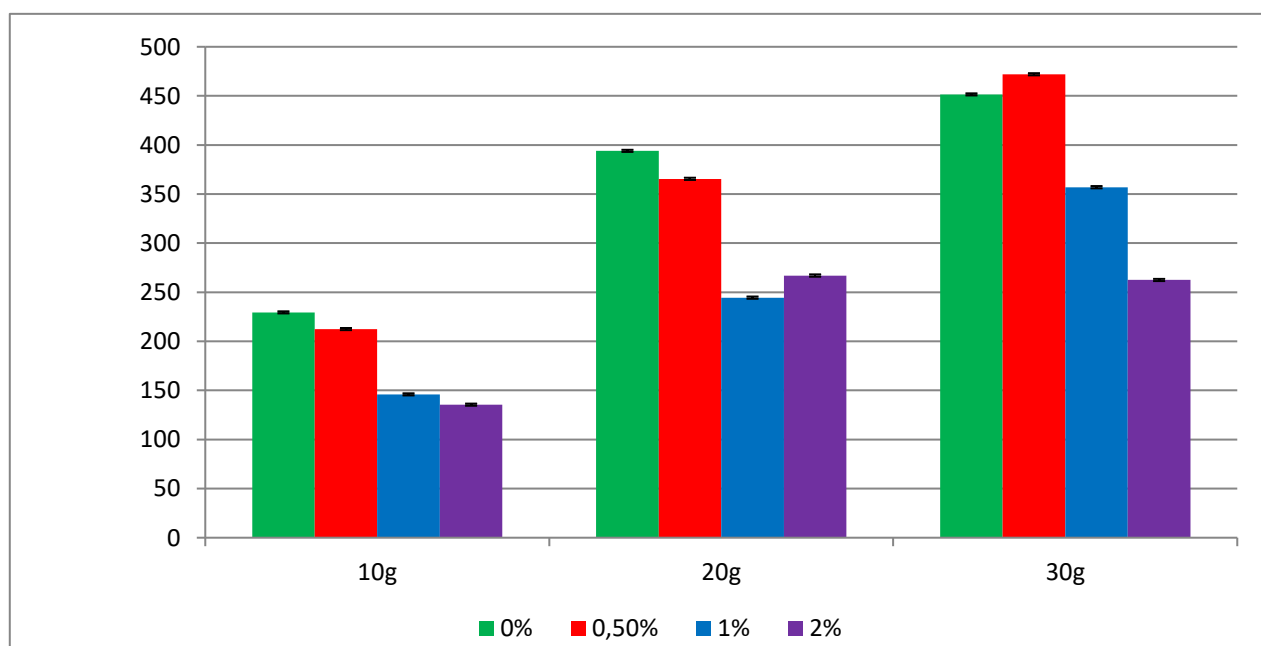
### *Desidratação das sementes*

A desidratação revelou uma quantia significativa de água contida nas sementes, onde a massa de água evaporada foi maior na secagem a 110°C (2,243g) do que a 65°C (1,568g) depois de 96 horas na estufa, tendo um p-valor (bilateral) = 0,0051. A cada 24 horas, não houve significância na comparação das medianas das massas, porém, a comparação entre as massas iniciais e as massas obtidas depois de 96 horas apontou uma significância com (p) = 0,0001 para 65°C e 110°C.

### *Análise Espectrofotométrica*

Pelo teste de Friedman aplicado nos dados obtidos das análises espectrofotométricas, com relação à matéria-prima, as medianas de absorvância foram maiores com o aumento de sementes em 100mL de etanol 92,8°, resultando em maior absorvância sempre em 30g, independente da concentração de ácido acético, como pode ser visto na **Figura 1**. Já com a variação de ácido acético, constatou-se que com o aumento deste, os valores de absorvância diminuem, independente da proporção de sementes por 100mL de etanol 92,8°. As comparações dos valores de absorvância de 20g para 30g não tiveram significância, destacando-se o grupo 20g; 0% de ácido acético.

**Figura 1-** Valores de absorvâncias das amostras de corante de sementes frescas, com variação de quantidade matéria-prima e pH. Medianas com os respectivos desvios padrões.

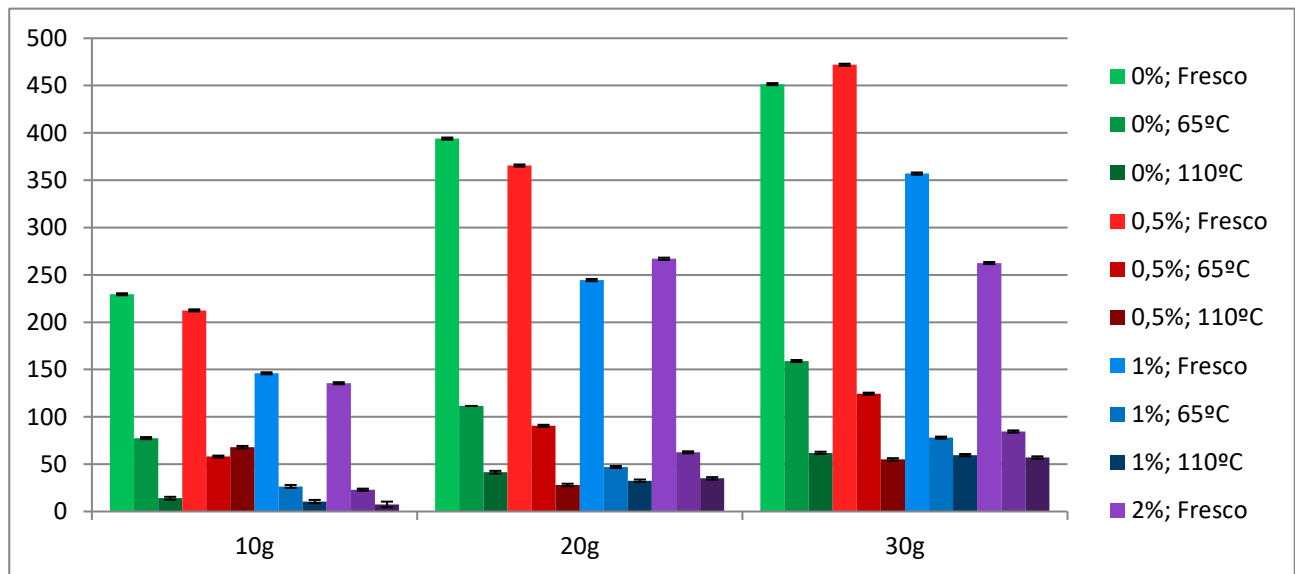


Fonte: Dados da Pesquisa.



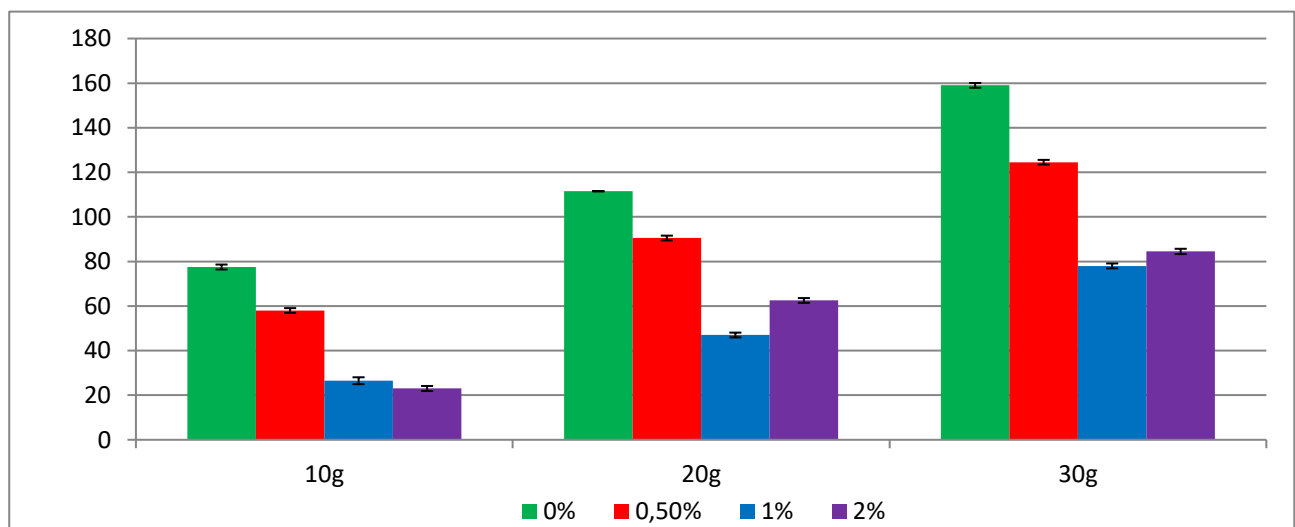
Comparando-se as absorvâncias dos corantes preparados com extrato fresco de sementes com os preparados com sementes desidratadas a 65°C e a 110°C, observou-se uma queda acentuada nas médias de absorvâncias (**Figura 2**). Nos corantes de sementes secas a 65°C, a adição de matéria-prima implicou na elevação da absorvância do corante. A adição de ácido acético também proporcionou queda nas absorvâncias. As análises estatísticas não apontaram significância nos valores de 20g para 30g (**Figura 3**), destacando-se também o grupo de 20g;0% de ácido acético em relação ao grupo de 10g;0% de ácido acético, para os corantes preparados de sementes desidratadas a 65°C.

**Figura 2:** Comparação das absorvâncias dos corantes preparados com sementes frescas, desidratadas a 65°C e a 110°C. Medianas com os respectivos desvios padrões.



Fonte: Dados da Pesquisa.

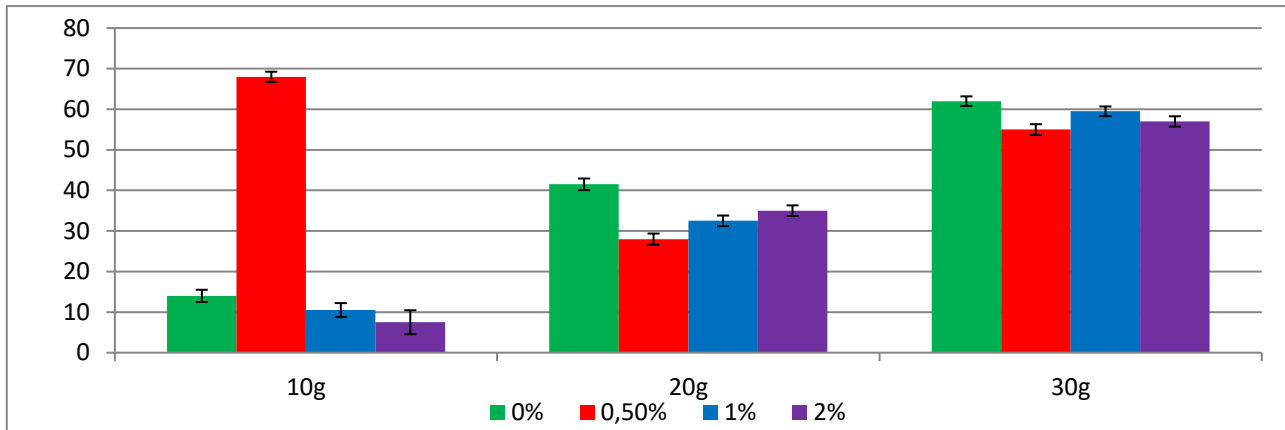
**Figura 3:** Valores de absorvâncias das amostras de corante de sementes desidratadas a 65°C, com variação de quantidade matéria-prima e pH. Medianas com os respectivos desvios padrões.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Já nos corantes preparados com sementes desidratadas a 110°C, a adição de matéria-prima também fez com que a absorbância fosse maior, e a adição de ácido acético mais uma vez fez com que os valores diminuíssem, exceto no grupo de 10g;0,5% de ácido acético. Como não houve significância na comparação dos valores, 10g e 30g, destacou-se os grupos com 10g; 0,5% de ácido acético, conforme pode ser visto na **Figura 4**.

**Figura 4:** Valores de absorbâncias das amostras de corante de sementes desidratadas a 110°C, com variação de quantidade matéria-prima e pH. Medianas com os respectivos desvios padrões.

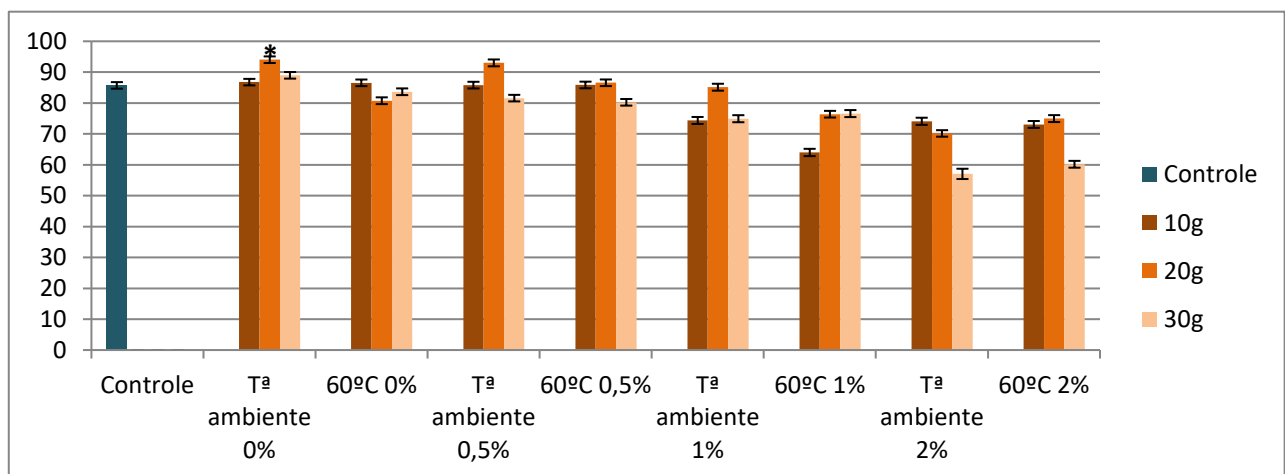


Fonte: Dados da Pesquisa.

### Análise morfométrica

Os valores de densidade óptica média obtidos da análise das microfotografias não apontaram significância na comparação entre os grupos de 10g, 20g e 30g a cada concentração de ácido acético, porém, os valores das medianas foram maiores nas lâminas coradas em temperatura ambiente, destacando-se o de valor maior as lâminas de 20g se ácido acético (**Figura 5**). Já com a variação do ácido acético, constatou-se que a densidade óptica média é menor conforme se aumenta a concentração do ácido (**Figura 6**).

**Figura 5:** Valores de densidade óptica média encontradas nas microfotografias com variação de proporção de matéria-prima e temperatura de coloração. Controle: hematoxilina e eosina.\* p=0,0367.

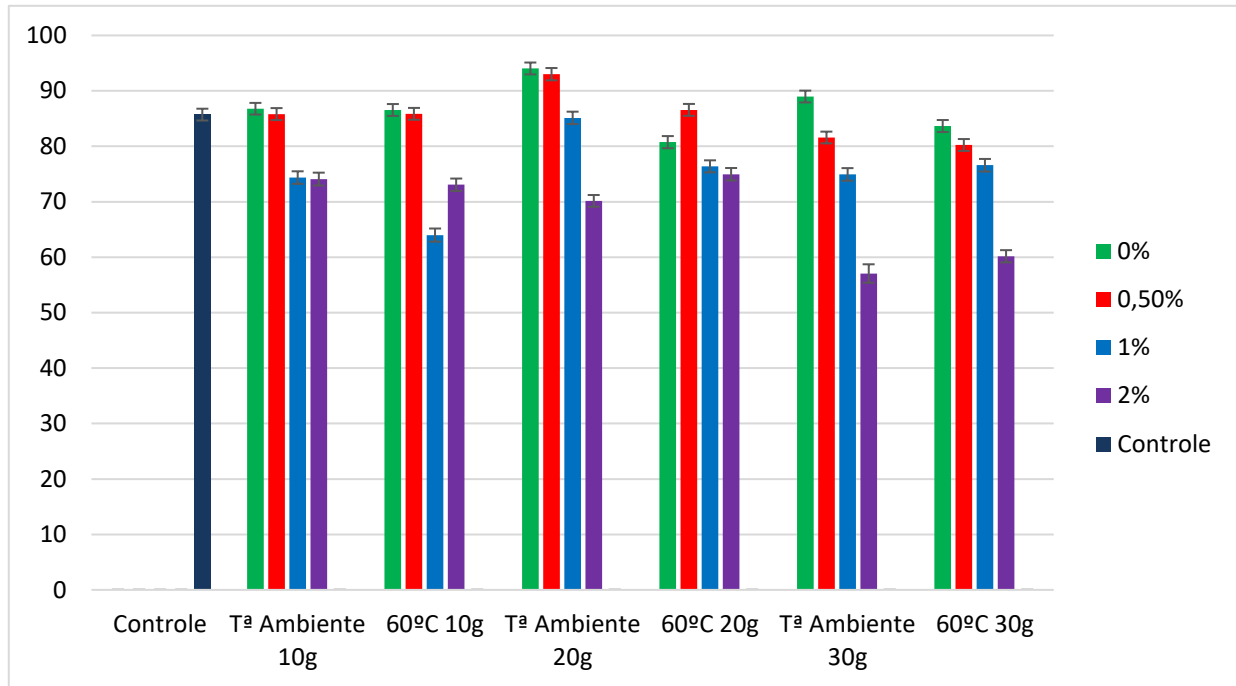


Fonte: Dados da Pesquisa.

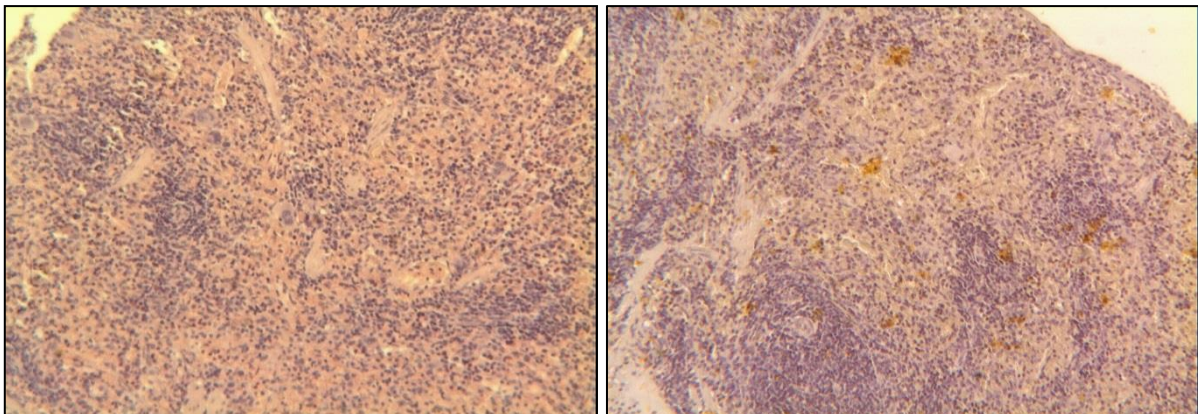


Constatou-se uma variação significativa na comparação das lâminas coradas com hematoxilina-eosina com as lâminas coradas com hematoxilina-urucum a 20g sem ácido acético em temperatura ambiente, com um p-valor (bilateral) = 0,0367, onde o valor da mediana da coloração com urucum foi superior à da coloração com eosina (94,04 contra 85,72, respectivamente).

**Figura 6:** Valores de densidade óptica média encontradas nas microfotografias com variação pH e temperatura de coloração.

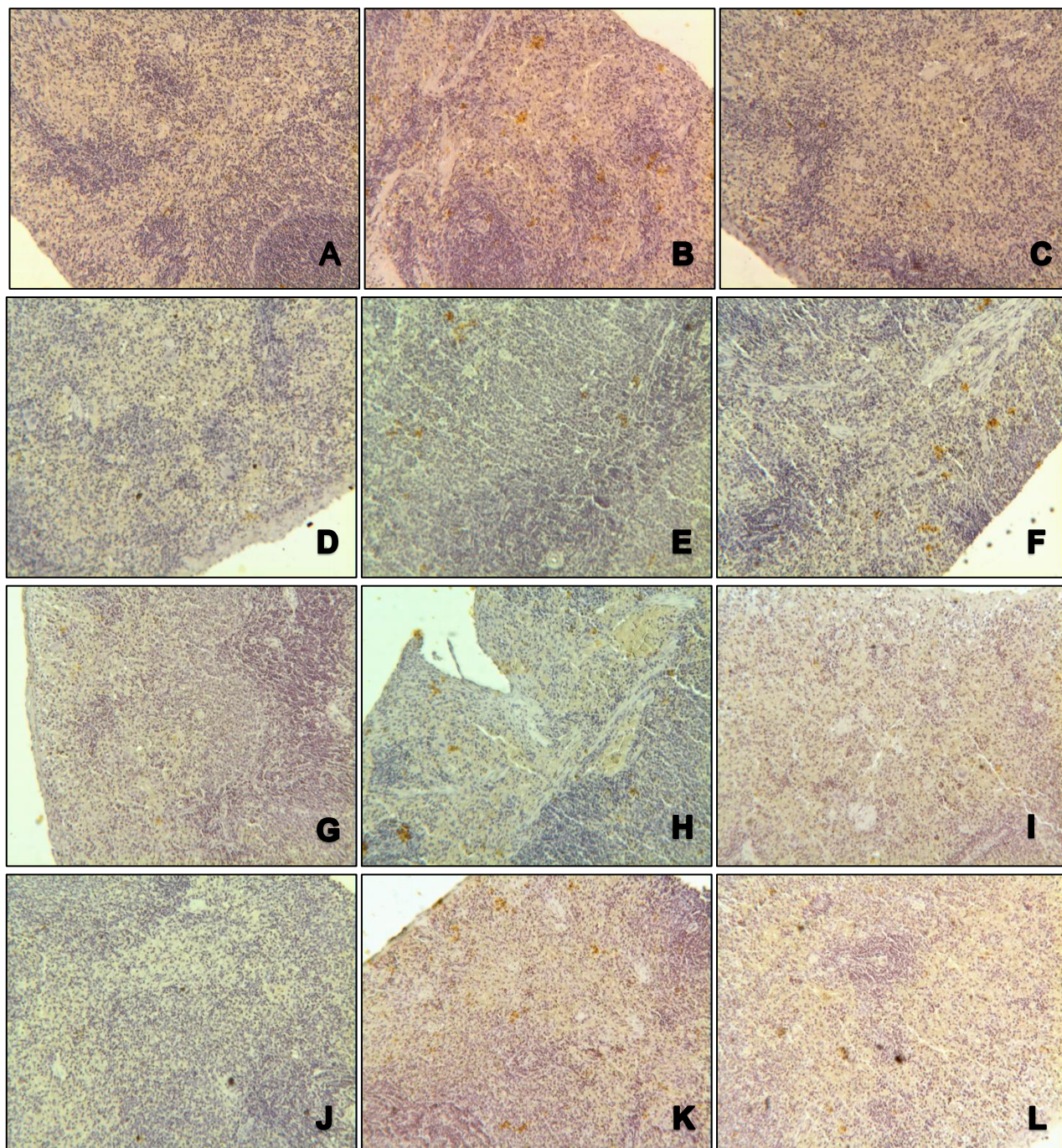


**Figura 7:** Imagens de lâminas coradas com hematoxilina-eosina e hematoxilina-urucum sem ácido acético, proporção de 20g, respectivamente (aumento de 100x).





**Figura 8:** Imagens de lâminas coradas com hematoxilina-urucum (aumento de 100x). Legenda: A: 10g, 0%; B: 20g, 0%; C: 30g, 0%; D: 10g, 0,5%; E: 20g, 0,5%; F: 30g, 0,5%; G: 10g, 1%; H: 20g, 1%; I: 30g, 1%; J: 10g, 2%; K: 20g, 2%; L: 30g, 2%.





## DISCUSSÃO

Os corantes histológicos vendidos já preparados possuem custos elevados, uma vez que são importados, porém, são os mais utilizados nas técnicas, já que poupam a etapa de preparação dos mesmos e já vêm com métodos mais fáceis para estocagem.

No entanto, o desenvolvimento de corantes histológicos naturais, utilizando plantas de fácil acesso e de fácil cultivo da flora brasileira, seria uma melhor alternativa em vários aspectos, já que as formas de preparo e estocagem seriam estudadas para viabilizar a utilização destes corantes, que seriam menos tóxicos tanto para quem os prepara quanto para o meio ambiente na necessidade do descarte (DEEPALI et al., 2014). Além disso, por se tratarem de plantas nativas, os custos em sua produção seriam significativamente baixos, fator este importante para o preparo em grande escala, provado a eficiência do corante natural (DEMCZUK JUNIOR, 2012).

Outro fator importante é que, são muitas as estruturas celulares que podem ser coradas e servirem para o diagnóstico patológico, e, uma vez que tais corantes alternativos mostrem eficiência na coloração de tais estruturas, mostrando-se como colorações específicas, contribuiriam para diagnósticos laboratoriais.

As análises espectrofotométricas tiveram como objetivo avaliar a influência da quantia de matéria-prima e da variação do pH (pela adição de ácido acético) na absorbância das soluções corantes. Um corante com uma maior absorbância tende a ser melhor visualizado ao microscópio, ao passo que o pH da solução corante pode evidenciar ou não determinada estrutura celular, por atração iônica dos cromóforos às estruturas celulares. Tais parâmetros corretamente combinados melhoram a ligação das moléculas de pigmentos às estruturas celulares que se deseja visualizar (FAVARO, 2007; AVWIORO, 2005).

A diminuição da absorbância constatada na comparação dos corantes de sementes frescas, de sementes secas a 65°C e a 110°C pode ter acontecido pela degradação da bixina e norbixina presentes nas sementes, o que implica em repensar-se os métodos de conservação das sementes para o preparo do corante de urucum. O urucum, como já constatado em outros trabalhos (RHODE et al., 2006), possui cromóforo aniônico, caracterizando-o, portanto, como corante ácido, corando assim as estruturas celulares alcalinas, como o citoplasma e algumas organelas, podendo substituir a eosina, utilizada na coloração de rotina “H-E” (hematoxilina – eosina).

A adição de ácido acético pode ter alterado a afinidade (ligações iônicas) do corante pelo tecido, mesmo aumentando-se a proporção de matéria-prima, implicando em valores de densidade óptica média menores dos que constatados nas lâminas sem ácido acético.

Por ser menos tóxico à saúde e gerar efluentes menos nocivos ao meio ambiente, já que em seu preparo é utilizado somente o etanol 92,8°, e como proporciona uma boa visualização microscópica de tecidos animais, o corante do urucum pode se tornar um excelente substituto da eosina, uma vez que este contém em sua composição o bromo, elemento altamente tóxico e mutagênico (RHODE et al., 2006; OLIVEIRA e AFONSO, 2013).

Uma futura análise das microfotografias de lâminas preparadas com soluções corantes feitas de sementes desidratadas a 65°C e a 110°C, utilizando as mesmas variáveis de estudo, poderiam averiguar se realmente a desidratação confere uma visualização de qualidade inferior às lâminas, como deduzida pelas análises espectrofotométricas deste trabalho.

## CONCLUSÃO

Pôde-se concluir pelas análises espectrofotométricas e de morfometria que os melhores parâmetros para o preparo do corante de urucum para colorações histológicas são a utilização de 20g de sementes a cada 100mL de etanol 92,8°, sem adição de ácido acético, com coloração à temperatura ambiente, e que o urucum constitui um excelente substituto à eosina em colorações histológicas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PIVIC/UNIVAS pela bolsa de iniciação científica ao primeiro autor.

---

## REFERÊNCIAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. Corantes e Pigmentos. São Paulo. 2009.
2. AVWIORO OG, AWOYEMI FA, ODUOLATA novel natural collagen and muscle stain from *Morinda Lucida* extracts. The International Medical Journal, 2005; 4(2): 44-48.
3. BEHMER OA. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. Ed. Barueri, SP: Manole, 2003; 341p.
4. CASTRO CB et al. A Cultura do Urucum. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009; 66p.
5. COSTA CLS, CHAVES MH. Extração de pigmentos das sementes de *Bixaorellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. Química Nova, 2005; 28(1): 149-152.
6. DEMCZUK JUNIOR B. Estabilidade e aplicação de urucum no estado do Paraná. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012; 134 p.
7. DEEPALI K, LALITA S, DEEPIKA M. Application of aqueous plant extracts as Biological stains. International Journal of Scientific & Engineering Research, 2014; 5(2): 1586-1589.
8. FAVARO MMA. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típica brasileiras para aplicação como corantes. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007; 102 p.
9. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Biologia Celular e Molecular. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012; 376p.
10. MERCADANTE AZ, PFANDER H. Caracterização de um novo carotenóide minoritário de urucum. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2001; 21(2): 193-196.
11. OLIVEIRA RS, AFONSO JC. Bromo. Química Nova na Escola, 2013; 35(1): 66-67.
12. RHODE DC, SILVEIRA SO, VARGAS VRA. O uso do corante urucum (*Bixa orellana*) na técnica de coloração histológica. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2006; 38(2): 119-121.
13. ROSS MH, PAWLINA W. Histologia: Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012; 1000p.
14. SANTOS JAB. Análise comparativa entre técnicas de processamentos para extração de pigmentos nas sementes de urucum. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007; 185p.
15. SOUZA VC, LORENZI H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008; 640p.
16. TOCCHINI L, MERCADANTE AZ. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2001; 21(3): 310-313.