



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANTÔNIO MARQUES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**TESTES DE COLORAÇÃO EM EXTENSÕES SANGUÍNEAS COM O USO DE
CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA**

Natal - RN
2014

ANTÔNIO MARQUES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**TESTES DE COLORAÇÃO EM EXTENSÕES SANGUÍNEAS COM O USO DE
CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Robson Fernandes de Farias.

Coorientadora: Profa. Dra. Deyse de Souza Dantas

Natal - RN
2014

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Francisco Gurgel de Azevedo – Instituto de
Química – IQ.

Júnior, Antônio Marques de Oliveira.

Testes de coloração em extensões sanguíneas com o uso de corantes artificiais utilizados na indústria / Antônio Marques De Oliveira Júnior. - Natal, 2016.

31f.: il.

Orientador: Robson Fernandes de Farias.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Hematologia. 2. Extensão sanguínea. 3. Leishman. I. Farias, Robson Fernandes de. II. Título

RN/UF/BSE-IQ

CDU 616.15

ANTÔNIO MARQUES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**TESTES DE COLORAÇÃO EM EXTENSÕES SANGUÍNEAS COM O USO DE
CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Robson Fernandes de Farias – UFRN
(orientador)

Dra. Zefa Valdivina Pereira – UFGD
(Examinadora Externa)

Prof. Dr. George Queiroz de Brito – UFRN
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Bráulio Silva Barros – UFRN
(Examinador Interno)

Aos meus pais, pelo carinho, afeto, educação e
respeito com que sempre me apoiaram nesta
jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Robson Fernandes de Farias pela oportunidade e orientação deste trabalho, pelo apoio, paciência, sabedoria e por toda a ajuda e atenção despendida.

À professora Dra. Telma Maria Araújo Moura Lemos pela recepção e atenção no laboratório de bioquímica clínica juntamente ao laboratório de patologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

À aluna de iniciação científica em Farmácia Samara Gisele Ferreira Santos pelo acompanhamento aos laboratórios de Farmácia, em especial, ao laboratório de bioquímica clínica e por toda a sua disponibilidade em contribuir com esse trabalho.

Aos meus pais, pelo carinho, afeto, educação e respeito com que sempre me apoiaram nesta jornada.

À minha esposa, Sandra Maria do Nascimento Silva, pela paciência, compreensão, carinho e amor com que sempre me apoia em meus trabalhos.

À minha filha, Maria Antônia do Nascimento Oliveira, pela sua companhia nas noites em claro e o seu sorriso inspirador nos momentos de cansaço.

A todos do laboratório de bioquímica clínica e de patologia, que colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

À Capes pelo financiamento concedido.

Por fim, a todos que de alguma maneira ou de outra fizeram parte deste processo de aprendizagem, de crescimento pessoal e profissional.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

RESUMO

O esfregaço do sangue em lâminas, tem por finalidade o estudo visual da morfologia celular, sua contagem e alterações qualitativas e quantitativas, não detectáveis pelo cálculo de taxas, índices e meios mecânicos utilizados visto ao microscópio, o esfregaço ideal deverá permitir a visualização de todos os elementos, sem que os mesmos apareçam superpostos uns sobre os outros. Tais resultados são conseguidos com a prática, que depende quase que exclusivamente da espessura da película do esfregaço sobre a lâmina. O trabalho realizado teve como objetivo principal avaliar a afinidade química e as possibilidades dos corantes artificiais: marrom alimentício, vermelho drim, murexida, vermelho de metila, azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta, juntamente com o Leishman, corante padrão utilizado na rotina laboratorial em hematologia, virem a ser utilizados também como soluções corantes em células sanguíneas, onde um deles, o cristal violeta apresentou maior afinidade na coloração dos leucócitos ou células sanguíneas brancas, podendo assim contribuir também na coloração e conseqüentemente na identificação das células hematológicas a partir da análise dos esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro observados através da técnica de microscopia óptica.

Palavras-chave: Hematologia. Esfregaço Sanguíneo. Células Sanguíneas. Leishman.

ABSTRACT

The smear of blood on slides, aims the visual study of cell morphology, its count and qualitative and quantitative changes, not detectable by calculating rates, indices and mechanical means used seen under the microscope, the ideal smear should allow viewing of all elements, without their appear superimposed on each other. These results are achieved with practice it depends almost exclusively on the film thickness of the smear on the slide. The work aimed to evaluate the chemical affinity and the possibilities of artificial dyes: food brown, red drim, murexide, methyl red, bright blue, indosol blue, rhodamine B and crystal violet, along with Leishman, standard dye used in routine laboratory hematology, also come to be used as colorants solutions blood cells, where one, crystal violet showed higher affinity for the coloring of leukocytes or white blood cells, and may thus also contribute to the color and therefore the identification of hematological cells from the analysis of blood smears on glass slides observed byoptical microscopy technique.

Keywords: Hematology. Blood Smear. Blood Cells. Leishman.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composição do Sangue	19
Figura 2 – Estrutura do Azul de metileno.....	23
Figura 3 – Estrutura da Eosina	23
Figura 4 – Hemácias.....	26
Figura 5 – Estrutura da Hemoglobina	26
Figura 6 – Tipos de leucócitos.	27
Figura 7 – Estrutura do Azul Brilhante	31
Figura 8 – Estrutura do Azul Indosol.....	32
Figura 9 – Estrutura do Rodamina B.	32
Figura 10 – Estrutura do Cristal Violeta	33
Figura 11 – Microscópio Óptico	37
Figura 12 – Microscópio óptico (OLYMPUS CX 21).	44
Figura 13 – Foto da solução de Rodamina B.....	45
Figura 14 – Vórtex.	47
Figura 15 – Esquema do método das duas lâminas. Coloração de um esfregaço sanguíneo: (A) dispensar umagota de sangue na lâmina; (B) com o auxílio de uma distensora, tocar a gota de sangue depositada; (C e D) empurra rápida e suavemente a distensora para frente para concluir o esfregaço.....	48
Figura 16 – Ionização do aminoácido	51
Figura 17 – Estrutura do DNA.....	52
Figura 18 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Azul Brilhante.....	53
Figura 19 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Azul Indosol.	53
Figura 20 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Rodamina B.....	54
Figura 21 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Cristal Violeta.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais de hematopoese	21
Tabela 2 – Unidades de medida utilizada em microscopia	36
Tabela 3 – Corantes testados na coloração dos esfregaços sanguíneos.	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 SANGUE.....	18
3.2 HEMATOPOESE	19
3.3 CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	25
3.3.1 Eritrócitos.....	25
3.3.2 Leucócitos.....	27
3.3.3 Plaquetas.....	29
4 ESTRUTURA DOS CORANTES.....	31
4.1 HISTOLOGIA.....	33
4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA	34
4.3 COMPONENTES DE UM MICROSCÓPIO ÓPTICO	38
4.4 CITOQUÍMICA	40
4.5 HISTOQUÍMICA.....	41
4.6 COLORAÇÃO LEISHMAN.....	42
4.7 ESTUDO DOS ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS.....	43
5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
5.1 REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS.....	44

5.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES CORANTES	46
5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO.....	47
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1 ANÁLISE DA MICROGRAFIA DAS LÂMINAS	50
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	60

1 INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido conjuntivo especializado que circula pelo sistema vascular sanguíneo, responsável pela manutenção da vida do organismo e constituído de dois componentes: células e plasma. Uma característica importante do sangue é a constância da sua composição química e suas características físicas, assegurando condições físicas para funcionamento das células. Ele é constantemente renovado pela entrada e saída de substâncias que modificam discretamente sua composição (HOFFBRAND, 2008).

As células do sangue geralmente são estudadas em extensões preparadas pelo espalhamento de uma gota de sangue sobre uma lâmina, onde as células ficam estiradas e separadas, o que facilita a observação ao microscópio óptico. (LORDÉLO, 2002).

Nesse sentido, o esfregaço do sangue em lâminas tem por finalidade o estudo visual da morfologia celular, sua contagem e alterações qualitativas e quantitativas, não detectáveis pelo cálculo de taxas, índices e meios mecânicos utilizados visto ao microscópio, o esfregaço ideal deverá permitir a visualização de todos os elementos, sem que os mesmos apareçam superpostos uns sobre os outros. Tais resultados são conseguidos com a prática, que depende quase que exclusivamente da espessura da película do esfregaço sobre a lâmina (BERNARD, 1986).

A observação das estruturas encontradas na natureza utilizando microscopia óptica, como uma extensão natural da observação a olho nu, representou papel importante no surgimento das ciências da natureza, tanto das ciências biológicas, como a histologia, anatomia, etc.

Este trabalho realizado teve como objetivo principal avaliar a afinidade química e as possibilidades dos corantes artificiais: marrom alimentício, vermelho drim, murexida, vermelho de metila, azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta, juntamente com o Leishman, corante padrão utilizado na rotina laboratorial em hematologia, virem a ser utilizados também como soluções corantes em células sanguíneas.

Dessa maneira, o trabalho realizado visou principalmente avaliar as possibilidades dos corantes artificiais, através da comparação das suas estruturas e afinidade química com corantes já testados na literatura, virem a ser também utilizados na coloração de esfregaços sanguíneos, assim com o Leishman, corante padrão utilizado na rotina laboratorial em hematologia, como soluções corantes em células sanguíneas, já que possuem uma maior variedade no mercado, serem mais acessíveis e terem um menor custo.

A metodologia utilizada na preparação das soluções corantes foi a mesma utilizada para o corante padrão Leishman utilizado em laboratórios de hematologia. A coloração de Leishmann é nomeada devido a seu inventor, o patologista escocês William Boog Leishman. Na preparação do corante Leishman foram utilizados 2,0 g do corante em pó que foram pesados em balança analítica e logo após foi transferido aos poucos para um balão volumétrico de 1000 mL contendo 500 mL metanol P.A. onde um agitador magnético foi utilizado para facilitar a dissolução de todo pó. Após a dissolução do pó foi completado todo o volume do balão até o menisco. A solução foi filtrada, guardada e identificada em frascos âmbar. Foram agitados de 2 a 3 vezes ao dia durante 7 dias e deixados em repouso por 1 mês antes da sua utilização.

Para apresentação da pesquisa, esta dissertação está organizada em sete capítulos, sendo o primeiro esta introdução. Já o segundo capítulo traz os objetivos deste trabalho.

O terceiro capítulo trata dos aspectos teóricos sobre as principais temáticas que envolvem a investigação, como as características e conceitos do sangue e das células sanguíneas. No quarto capítulo, é apresentada a estrutura dos corantes, com a histologia, microscopia óptica, componentes de um microscópio óptico, citoquímica, histoquímica, coloração leishman e estudo dos esfregaços sanguíneos.

No quinto capítulo, estão os procedimentos experimentais, contendo a descrição dos reagentes, solventes e equipamentos, preparação das soluções corantes e método de coloração. O sexto capítulo traz os resultados e discussões, com a análise da micrografia das lâminas. No sétimo capítulo, apresentam-se as considerações finais desta pesquisa, seguidas das referências bibliográficas

utilizadas e dos apêndices.

Ao final, os resultados mostraram que o cristal violeta apresentou maior afinidade na coloração dos leucócitos ou células sanguíneas brancas, podendo assim contribuir também na coloração e conseqüentemente na identificação das células hematológicas a partir da análise dos esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro observados através da técnica de microscopia óptica.

2 OBJETIVOS

- **Objetivo principal**

Avaliar as possibilidades dos corantes artificiais: azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta, virem a ser também utilizados na coloração de esfregaços sanguíneos, assim com o Leishman, corante padrão utilizado na rotina laboratorial em hematologia, como soluções corantes em células sanguíneas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

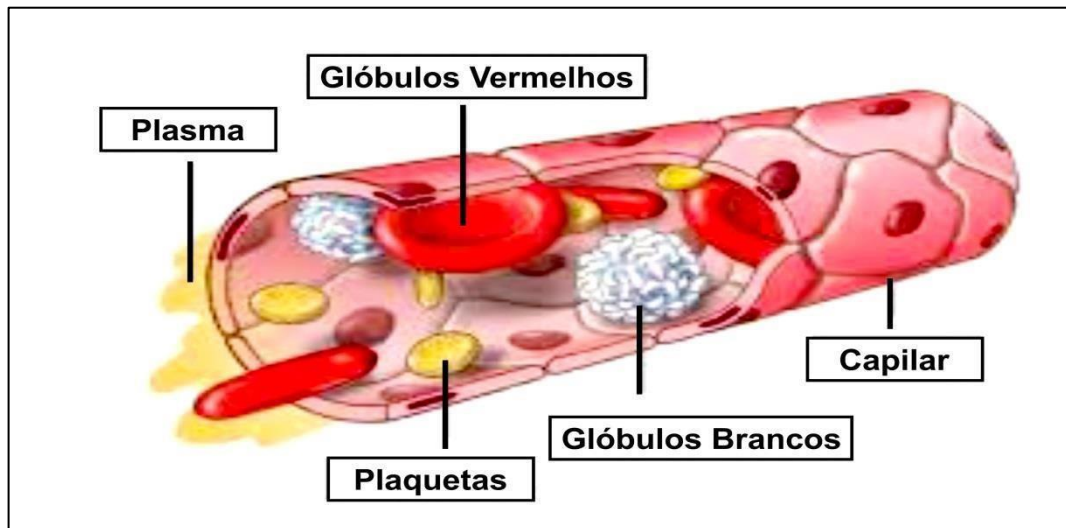
3.1 SANGUE

Em todos os campos da medicina ao longo das últimas décadas foram acompanhados por uma maior compreensão dos processos bioquímicos, fisiológicos e imunológicos envolvidos na formação e na função das células sanguíneas normais e nos distúrbios que podem ocorrer em diferentes doenças. Pesquisas apontam uma queda na mortalidade de pacientes que tiveram diagnóstico mais rápido de doenças hematológicas. Alterações no sangue podem ser adquiridas ou hereditárias, podendo ser originárias na formação de células ou nos componentes sanguíneos. Ao mesmo tempo, os tratamentos disponíveis para pacientes com doença do sangue e dos órgãos formadores de sangue foram ampliados e melhoraram substancialmente com a compreensão da fisiopatologia das doenças e com a introdução de novas drogas, além de novos meios de tratamento de suporte, segundo Hoffbrand (2008).

O sangue é um tecido conjuntivo especializado que circula pelo sistema vascular sanguíneo, responsável pela manutenção da vida do organismo e constituído de dois componentes: células e plasma. A parte celular é denominada hematócrito. A porção celular é formada quase que totalmente por glóbulos vermelhos ou eritrócitos, bem como por glóbulos brancos ou leucócitos e ainda pelas plaquetas. Estes últimos dois tipos de células, em conjunto, representam um volume celular desprezível, quando comparado ao volume ocupado pelos eritrócitos.

Desse modo, o valor do hematócrito representa, na prática, o volume ocupado pelos glóbulos vermelhos. Estes componentes podem ser separados por centrifugação se o sangue for coletado na presença de anticoagulantes. Cerca de 45% do volume sanguíneo é composto de eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos) e leucócitos (glóbulos brancos), e os outros 55% de plasma. O volume sanguíneo de um adulto normal é de 5 a 6 L (ABRAHAM, 2008, p. 165). A composição do sangue pode ser vista através da Figura 1.

Figura 1 – Composição do Sangue.



Fonte: Manual de Hematologia (2008).

Uma característica importante do sangue é a constância da sua composição química e suas características físicas, assegurando condições físicas para funcionamento das células. Ele é constantemente renovado pela entrada e saída de substâncias que modificam discretamente sua composição (LORDÊLO, 2002, p. 3). A constância da composição do sangue, com estreita faixa de variação, é o resultado mantido pela rapidez pela qual as substâncias deixam e entram no sangue quando estão em excesso ou em concentrações abaixo do normal, respectivamente.

A porção acelular ou plasma é constituído de 91,5% de água que serve de solvente das substâncias orgânicas e minerais e ainda de veículo para as células, moléculas e íons. Os restantes 8% são formados por proteínas, sais e outros constituintes orgânicos em solução (LORDÊLO, 2002, p. 3).

3.2 HEMATOPOESE

A porção celular do sangue composta de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, constituem três linhagens ou séries diferentes de células, que se originam, entretanto, de uma célula-mãe única, denominada célula pluripotente, totipotente,

stem-cell ou célula tronco (LORENZI, 2011, p. 6).

A stem cell é uma célula de origem embrionária, que tem capacidade de autorenovação, isto é, produzir células com características semelhantes as suas, de diferenciação em diversos tipos celulares e uma grande capacidade de amplificação.

Todo esse processo é mediado por fatores de crescimento e pelo microambiente. Os ossos são encarregados de proporcionar um microambiente adequado à Hematopoese, formado por uma rede de células estromais e vasos.

Os fatores de crescimento são hormônios que regulam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras e as funções das células maduras. Os fatores de crescimento têm origens variadas e atuam em mais de uma linhagem celular, sempre em conjunto com as interleucinas. Interleucinas são citocinas que agem independentes ou em conjunto com outras interleucinas estimulando os fatores de crescimento hematopoéticos.

As primeiras células sanguíneas do homem surgem no período embrionário, por volta da sétima ou oitava semana de vida. Nas primeiras semanas de gestação, o saco vitelino é o principal local de hematopoese (do grego haima, sangue; poiein, fazer). A hematopoese definitiva, entretanto, deriva de uma população de células-tronco observada na região AGM (aorta-gônadas-mesonefros). Acredita-se que esses precursores comuns às células endoteliais e hematopoéticas (hemangioblastos) aninhem-se no fígado, no baço e na medula óssea; de seis semanas até 6 a 7 meses de vida fetal, o fígado e o baço são os principais órgãos hematopoéticos e continuam a produzir células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento (Tabela 1). A medula óssea é o sítio hematopoético mais importante a partir de 6 a 7 meses de vida fetal e, durante a infância e a vida adulta, é a única fonte de novas células sanguíneas. As células em desenvolvimento situam-se fora dos seios da medula óssea, enquanto as maduras são liberadas nos espaços sinusais e na microcirculação medular e, a partir daí, na circulação geral (LORENZI, 2011, p. 7).

Nos dois primeiros anos, toda a medula óssea é hematopoética, mas durante o resto da infância há substituição progressiva da medula dos ossos longos por

gordura, de modo que a medula hemopoética no adulto é confinada ao esqueleto central e às extremidades próximas do fêmur e do úmero. Mesmo nessas regiões hematopoéticas, cerca de 50% da medula é composta de gordura. A medula óssea gordurosa remanescente é capaz de reverter para hematopoese e, em muitas doenças, também pode haver expansão da hematopoese aos ossos longos. Além disso, o fígado e o baço podem retomar seu papel hematopoético fetal (“hematopoese extracelular”), (HOFFBRAND, 2008, p. 11).

Tabela 1 – Locais de hematopoese

	0-2 meses (saco vitelino)
Feto	2-7 meses (fígado, baço)
	5-9 meses (medula óssea)
Lactentes	Medula óssea (praticamente todos os ossos)
Adultos	Vértebras, costelas, crânio, esterno, sacro e pelve.

Fonte: Hoffbrand (2008, p. 11).

Durante vários anos a microscopia vem causando impactos consideráveis diante de descobertas de doenças associadas aos seres vivos microscópicos e disfunções celulares presentes nos seres humanos.

A evolução nas técnicas de microscopia trouxe a utilização de substâncias a fim de que pudessem promover a visualização dessas estruturas celulares com intuito de serem melhores observadas. Com o passar do tempo, observaram também que essas substâncias não possuem função única apenas em corar estruturas, mas também, conservá-las a ponto de se evitar perda de material.

A hematologia é o ramo da medicina voltada principalmente para o estudo dos elementos formadores do sangue (células do sangue) e seus tecidos. Os elementos formadores, os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas, são examinados em laboratório de hematologia com a técnica de microscopia óptica onde os corantes participam ativamente na observação e identificação destas. Os elementos celulares do sangue costumam ser chamados de células sanguíneas.

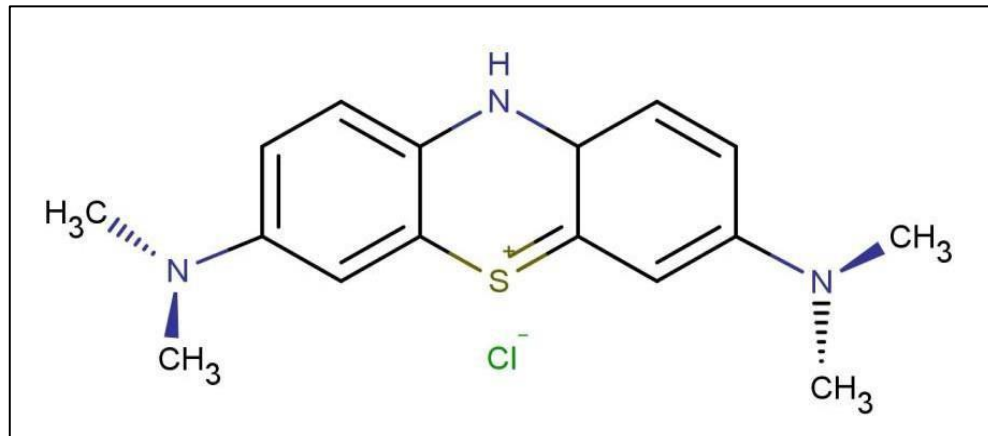
As variáveis hematológicas podem ser estudadas por meio de extensões sanguíneas que proporcionam a análise das séries branca e vermelha de forma relativamente prática (ISHIKAWA, 2010), mas para que esta análise seja eficiente, é imprescindível a utilização de uma técnica de coloração que permita a diferenciação entre estas células (THRALL, 2006).

As técnicas tintoriais em hematologia vêm evoluindo desde o final do século XIX, quando Romanowsky, protozoologista russo do final do século XIX idealizou uma mistura de corantes que poderia identificar células distintas com cores diferentes. Os corantes baseiam-se em misturas de diferentes concentrações de azul de metileno e eosina, dissolvidos em álcoois, normalmente o metanol. As formulações disponíveis hoje no mercado são constituídas por diferentes proporções entre essas duas tinturas-mãe e são conhecidas pelo nome de seus criadores: Leishman, May-Grunwald, Giemsa e Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006).

O corante de May-Grunwald (1902) é uma mistura de eosina e azul de metileno (não oxidados), que quimicamente se transforma em eosinato de azul de metileno. Giemsa (Alemanha) desenvolveu, no mesmo período, um corante que leva seu nome e que hoje se sabe ser uma mistura de azul I (mistura equimolar de azul I e azul de metileno) e eosinato de azul I (corante formado pela combinação equimolar de azul I, azul de metileno e eosina amarela).

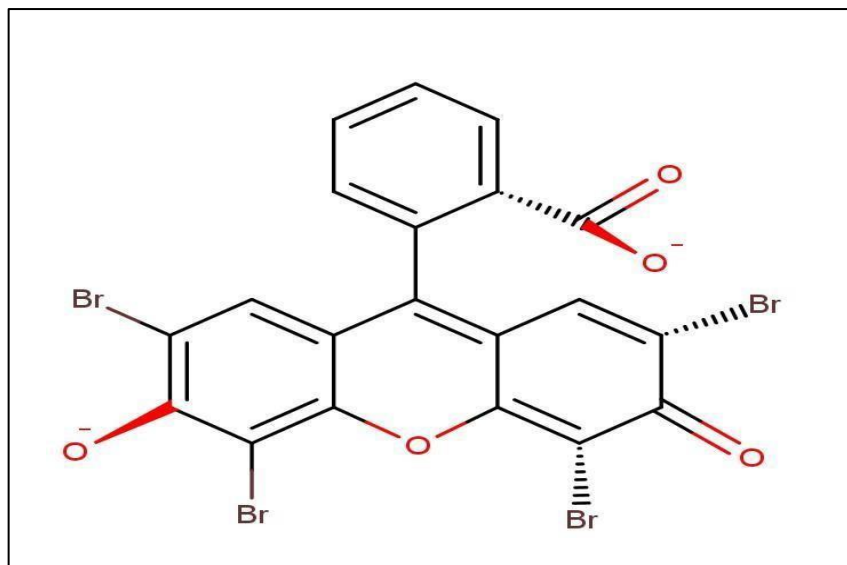
Esses dois corantes são utilizados através de um método de coloração mais demorado, em que após a fixação e coloração pelo May-Grunwald, se processa uma segunda coloração com solução de Giemsa, obtendo-se um resultado final melhor e mais detalhado. A necessidade de um único corante, que pudesse corar globalmente os elementos celulares com os detalhes do May-Grunwald-Giemsa, levou ao desenvolvimento de novos corantes: Leishman (Inglaterra, 1901) e Wright (Inglaterra, 1902). São corantes basicamente idênticos, compostos de eosina amarela e produtos da oxidação do azul de metileno.

Figura 2 – Estrutura do Azul de metileno



Fonte: Autor.

Figura 3 – Estrutura da Eosina.



Fonte: modificado pelo autor.

A utilização de misturas entre esses corantes é bem comum, sendo mais utilizada a combinação de May-Grunwald com Giemsa, chamada de Rosenfeld e uma segunda mistura que consiste na combinação de May-Grunwald, Giemsa e Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

O estudo do material biológico ao microscópio requer alguns procedimentos prévios que vão desde a coleta do material até a montagem final do preparado histológico; que os elementos a serem analisados não sejam difusíveis; que o produto da reação seja visível (cor ou precipitado); que a reação seja específica ou seletiva para o que se pretende analisar.

Outra técnica bastante empregada na rotina laboratorial é a coloração por panótico rápido, na qual as lâminas são submetidas à ação de três compostos: um fixador e duas soluções corantes (OLICHESKI, 2003).

Todas essas tinturas funcionam da mesma forma, demarcando estruturas de acordo com seu pH. Estruturas ácidas tem a tendência de se corar em tons de vermelho (acidófilas) e estruturas básicas em tons de azul (basófilas), estruturas que apresentam um pH neutro irão apresentar coloração intermediária entre essas duas cores (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Os termos acidofilia, basofilia, neutrofilia, azurofilia e policromatofilia são muito frequentemente utilizados em hematologia, referindo-se tão somente a aptidão revelada por distintas partes das células, frente a determinados corantes.

As colorações são feitas com substâncias sintéticas pertencentes ao grupo das anilinas, derivados da hulha. São compostos formados por um ácido e uma base, dividindo-se desde Ehrlich, em corantes ácidos, básicos e neutros.

Os corantes e pigmentos orgânicos podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicadas a um material, lhe conferem cor (ABIQUIM, 2006).

Há mais de 20 mil anos, o homem utiliza as cores, sendo o Negro-de-Fumo (Carbon Black) o primeiro corante de que se tem conhecimento. Por volta de 3.000 mil anos a.C., surgiram alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Na Roma Antiga, a cor púrpura, obtida de um molusco marinho chamado Murex, era símbolo da riqueza e distinção, sendo utilizada nas vestes reais (ABIQUIM, 2006).

3.3 CÉLULAS SANGUÍNEAS

As células do sangue geralmente são estudadas em extensões preparadas pelo espalhamento de uma gota de sangue sobre uma lâmina, onde as células ficam estiradas e separadas, o que facilita a observação ao microscópio óptico. Essas extensões são coradas com misturas especiais, que contêm azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), e azures (corantes básicos de cor púrpura) (ZAGO; FALCÃO, 2013; RAPAPORT, 1990).

São muito utilizadas as misturas de Leishman, Wright e Giemsa, designadas com os nomes dos pesquisadores que as introduziram. Com essas misturas de corantes, as estruturas acidófilas tornam-se de cor rosa, as basófilas, de cor azul e as que fixam os azures, ditas azurófilas, de cor púrpura. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013, RAPAPORT, 1990).

3.3.1 Eritrócitos

Os eritrócitos humanos são células anucleadas caracterizadas morfológicamente pelo seu formato de disco bicôncavo e diâmetro médio de 7,2 μm em um esfregaço sanguíneo. Os fatores que determinam essa forma característica do eritrócito são seu citoesqueleto, sua membrana celular e seu coloide (NAOUM, 2001).

Quimicamente, o conteúdo dos eritrócitos é constituído de 66% de água e 33% de uma única proteína, a hemoglobina. Os outros componentes juntos, como outras proteínas, enzimas e alguns lipídeos, somam o 1% restante. Outra importante característica do eritrócito é sua resiliência, a capacidade de se deformar para percorrer a microcirculação e retornar ao seu formato original (NASCIMENTO, 2002).

Ao penetrarem a corrente sanguínea, vindos da medula óssea vermelha, na

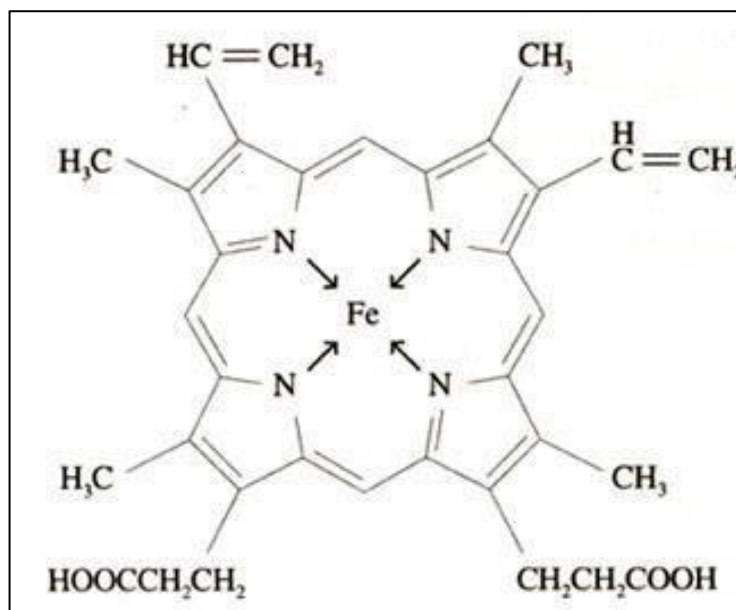
qual são formados, os eritrócitos imaturos (reticulócitos) contêm ainda certa quantidade de ribossomos. Quando corados apresentam uma cor azulada, devido à basofilia do RNA. Certos corantes, como o azul brilhante de cresil, precipitam o RNA, dando origem a uma delicada rede de material basófilo, que aparece bem corado em azul (Figura 3). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 4 – Hemácias.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013, p. 229).

Figura 5 – Estrutura da Hemoglobina.



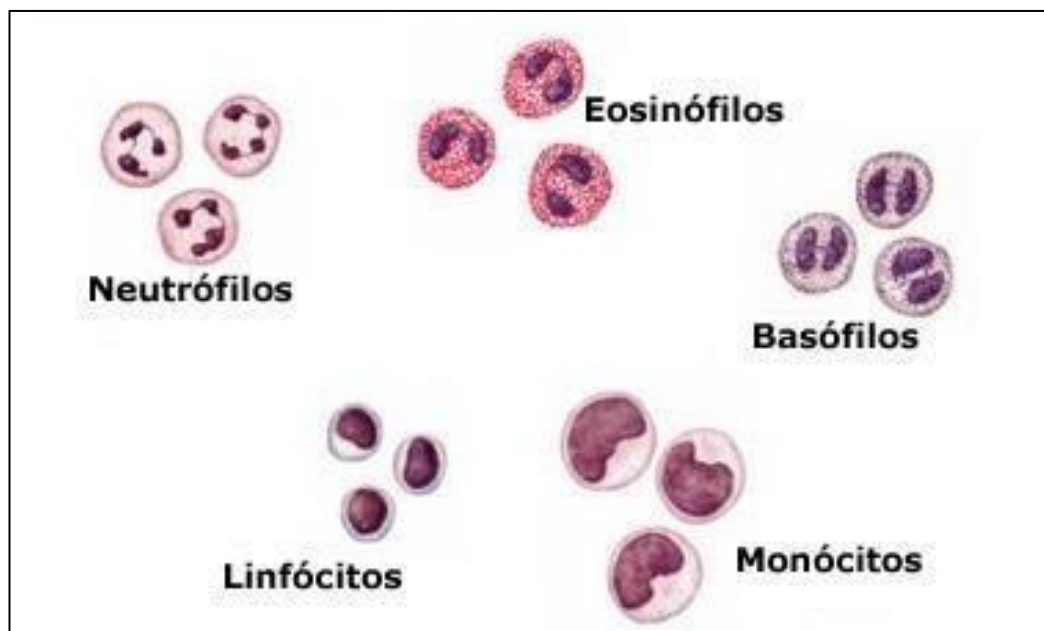
Fonte: Hoffbrand (2008, p. 27).

3.3.2 Leucócitos

Os leucócitos ou glóbulos brancos são células produzidas na medula óssea e no tecido linfático, responsáveis pela defesa do organismo diante das infecções e agentes tóxicos. Esse sistema de defesa é formado pelos leucócitos e por células teciduais derivados desses leucócitos, que trabalham em conjunto para destruir os agentes invasores por fagocitose e pela formação de anticorpos.

Os leucócitos produzidos na medula óssea ficam armazenados até que sejam necessários na corrente sanguínea, quando são liberados; os linfócitos, na sua grande maioria, são armazenados nos tecidos linfoides e liberados gradualmente pela circulação, onde por diapedese voltam para os tecidos e depois de algum tempo reentram na linfa e retornam ao sangue várias vezes.

Figura 6 – Tipos de leucócitos.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013, p. 227).

São classificados em dois grupos principais, os granulócitos (que possuem grânulos no citoplasma das células) e agranulócitos, que não possuem grânulos. Dos granulócitos podemos destacar os neutrófilos, basófilos e os eosinófilos, e dos agranulócitos, os linfócitos e os monócitos (NASCIMENTO, 2002). Abaixo, estão explicações sobre cada um desses tipos de leucócitos.

- **Neutrófilos:** são conhecidos também como polimorfonucleares e correspondem cerca de 50% a 70% das células circulantes; possuem grânulos citoplasmáticos pequenos corados fracamente em púrpura-avermelhado. Os neutrófilos são capazes de deixar os vasos sanguíneos e entrar nos tecidos, onde protegem o corpo fagocitando bactérias e substâncias estranhas ao organismo.
- **Basófilos:** possuem grânulos relativamente grandes corados em azul-púrpura; liberam histamina (contribui para as respostas alérgicas dilatando e permeabilizando os vasos sanguíneos) e heparina (previne a coagulação do sangue).
- **Eosinófilos:** possuem grânulos corados em laranja-avermelhado e fagocitam complexos antígeno-anticorpo. Seus núcleos geralmente têm dois lobos conectados por um filamento. O número de eosinófilos circulantes aumenta de forma muito acentuada no sangue circulante durante as reações alérgicas, e durante as infestações parasitárias.
- **Linfócitos:** são o segundo tipo mais abundante de leucócitos (após ou neutrófilos), compreendendo cerca de 30% dos glóbulos brancos em circulação, a maioria se localiza no tecido linfoide e são formados por linfoblastos. São leucócitos pequenos, sendo apenas um pouco maiores que os eritrócitos, e cada um deles tem um núcleo que é circular ou algo recortado num dos lados. São importantes nas respostas imunes específicas do corpo, incluindo a produção de anticorpos.

- **Monócitos:** possuem um único núcleo; são células grandes. São formados por monoblastos. São capazes de entrarem no tecido conjuntivo frouxo, onde se desenvolvem em grandes células fagocíticas, denominadas macrófagos, que podem ingerir bactérias e outras substâncias estranhas ao organismo.

Os leucócitos são incolores, de forma esférica quando em suspensão no sangue e têm a função de proteger o organismo contra infecções. São produzidos na medula óssea (assim como os eritrócitos) ou tecidos linfoides e permanecem temporariamente no sangue. Diversos tipos de leucócitos utilizam o sangue como meio de transporte para alcançar seu destino final, os tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.3.3 Plaquetas

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados com um diâmetro de 2 a 4 μm e um volume médio de 7 a 11 fL, têm forma discoide e circulam de 7 a 10 dias na corrente sanguínea, sendo então removidas por macrófagos. Em condições normais, o número de plaquetas é de 150×10^3 a $400 \times 10^3 \mu\text{L}$ no sangue periférico. Dois terços circulam na corrente sanguínea e um terço fica retido no baço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A membrana plaquetária é formada por uma dupla camada de fosfolípidos onde serão incorporados colesterol, glicolípidos e glicoproteínas. Além de algumas organelas, as plaquetas contêm os grânulos alfa e grânulos densos que fornecem várias substâncias participantes do processo hemostático (HOFFBRAND, 2008).

As plaquetas são produzidas na medula óssea por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos, uma das maiores células do organismo. O precursor do megacariócito, o megacarioblasto, surge por um processo de diferenciação da célula-tronco hematopoética. O megacariócito amadurece por replicação endomitótica sincrônica (isto é, replicação do DNA sem haver divisão nuclear ou

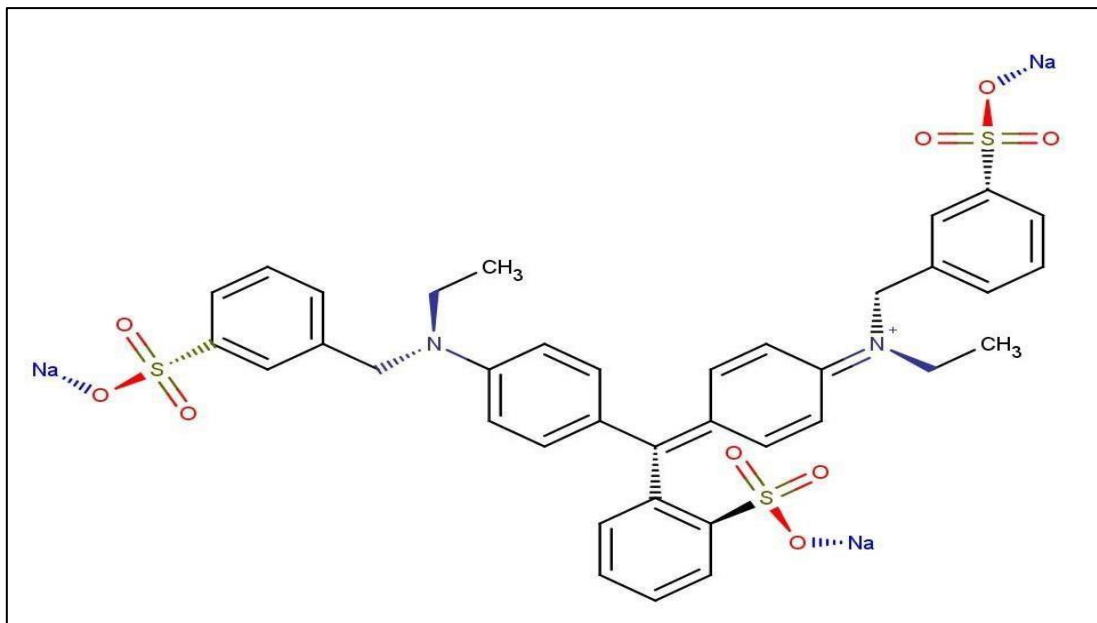
citoplasmática), aumentando o volume do citoplasma e o número de lobos nucleares em múltiplos de dois.

Plaquetas formam-se pela fragmentação do citoplasma do megacariócito, originando-se 1000 a 5000 de cada megacariócito. O intervalo entre a diferenciação da célula-tronco humana e a produção de plaquetas é da ordem de 10 dias. (HOFFBRAND, 2008).

4 ESTRUTURA DOS CORANTES

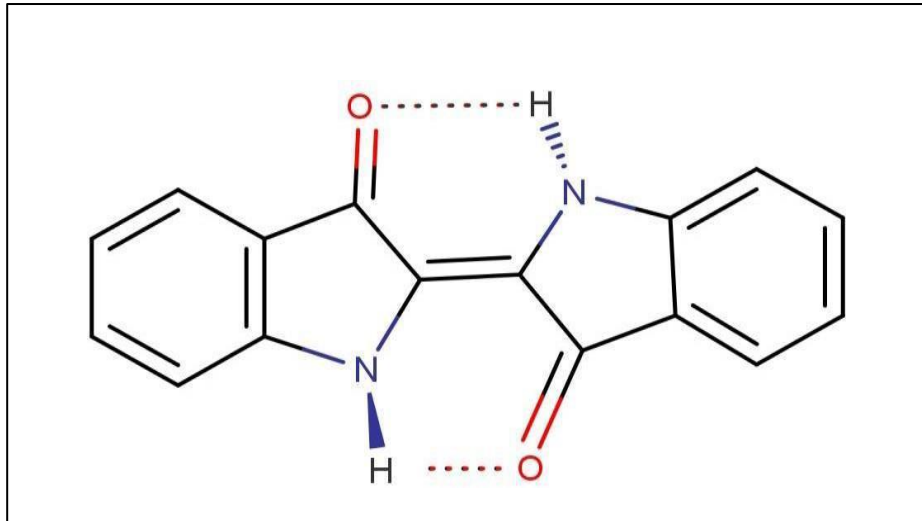
Algumas estruturas, como o núcleo da célula, têm afinidade pelos corantes básicos e coram-se de azul ou púrpura. Outras estruturas celulares têm afinidade pelos corantes ácidos e coram-se de rosa-avermelhado. Assim, como explicam Junqueira e Carneiro (2013), as células e as estruturas são mais facilmente visualizadas e diferenciadas (por isso a denominação de contagem diferencial). De acordo com Silbert (2011), as estruturas dos corantes azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta são demonstradas nas figuras 7, 8, 9 e 10.

Figura 7 – Estrutura do Azul Brilhante.



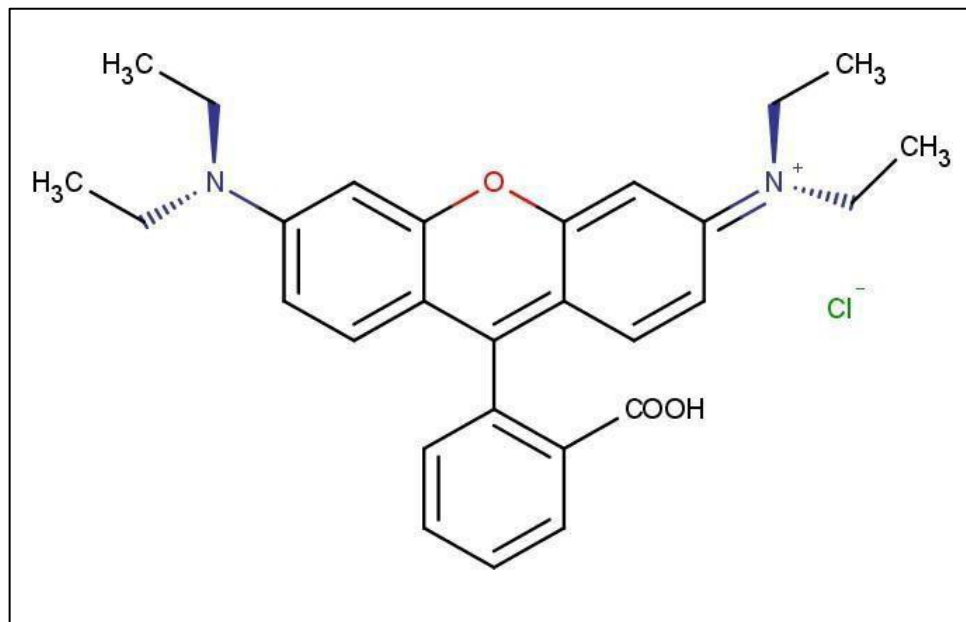
Fonte: autor.

Figura 8 – Estrutura do Azul Indosol.



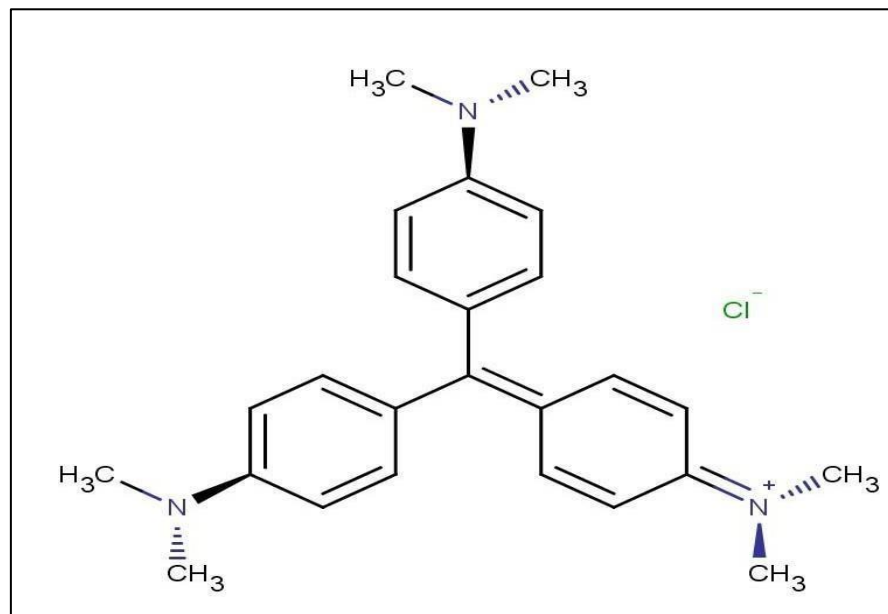
Fonte: autor.

Figura 9 – Estrutura do Rodamina B.



Fonte: Autor.

Figura 10 – Estrutura do Cristal Violeta.



Fonte: Autor.

De acordo com Ross (2011), os corantes básicos reagem com componentes aniônicos de células e tecidos (componentes que carregam uma carga líquida negativa). Os componentes aniônicos incluem os grupamentos fosfato dos ácidos nucleicos, os grupamentos sulfato das glicosaminoglicanas e os grupamentos carboxila das proteínas. A capacidade desses grupamentos aniônicos para reagir com o corante básico é chamada de basofilia.

Por outro lado, conforme o mesmo autor, os corantes ácidos reagem com grupamentos catiônicos nas células e nos tecidos, especialmente com grupamentos amino ionizados das proteínas. A reação dos grupamentos catiônicos com o corante ácido denominada acidofilia. As reações dos componentes celulares e teciduais com os corantes ácidos não são tão específicas, nem tão exatas, quanto as reações com os corantes básicos.

4.1 HISTOLOGIA

A histologia é um dos ramos das ciências morfológicas que estuda os tecidos

animais e vegetais. Em seu sentido mais amplo, a palavra histologia é utilizada como sinônimo de anatomia microscópica, devido a englobar não somente a estrutura microscópica dos tecidos, mas também das células, órgãos e sistemas orgânicos.

Todavia, a histologia não deve ser compreendida como o estudo da estrutura isolado da função, mas sim como uma ciência que enfoca a inter-relação e a integração de atividades moleculares e fisiológicas dentro do corpo com as estruturas anatômicas específicas, isso, conseqüentemente, exige uma conceituação bastante visual.

A coloração é de importância fundamental em histologia, pois os tecidos não tratados têm pouca diferenciação óptica. As colorações de um modo geral se efetuam por processos físico-químicos ou puramente físicos. Muitos corantes se comportam como substâncias de caráter ácido ou básico e tendem a formar ligações eletrostáticas (salinas) com componentes ionizados dos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

Os primeiros biólogos, celulares começaram simplesmente observando tecidos e células, então abrindo-as e cortando-as para ver o seu conteúdo. O que eles viram era, para eles, bastante confuso – uma coleção de objetos minúsculos quase que não visíveis cuja relação com as propriedades da matéria viva pareciam um mistério impenetrável. No entanto, esse tipo de investigação visual foi o primeiro passo em direção ao entendimento e permanecer essencial no estudo da biologia celular.

Em geral, as células são muito pequenas – pequenas demais para serem vistas a olho nu. Elas não foram visíveis até o final do século XVII, quando o microscópio foi inventado. Por centenas de anos depois, tudo o que se sabia sobre as células foi descoberto utilizando esse instrumento. Os microscópios ópticos, que utilizam luz visível para iluminar os espécimes, ainda são peças vitais de

equipamentos em um laboratório de biologia celular e de hematologia.

Embora esses instrumentos agora incorporem muitas melhorias sofisticadas, as propriedades da própria luz colocam um limite de nitidez de detalhes que eles podem revelar. Os microscópios eletrônicos, inventados na década de 1930, vão além desse limite pela utilização de feixes de elétrons, em vez de feixes de luz como fonte de iluminação, aumentando grandemente a sua capacidade para ver os finos detalhes das células e até mesmo tornando algumas moléculas grandes visíveis individualmente.

O desenvolvimento do microscópio óptico dependeu dos avanços na produção das lentes de vidro. Pelo século XVII, as lentes foram refinadas a ponto de tornarem possível a fabricação de microscópios simples. Utilizando um instrumento simples como esse, Robert Hooke examinou um pedaço de rolha e, em 1665, comunicou para a Society de Londres que a cortiça era composta de uma massa de minúsculas câmaras, que ele chamou de “células”. O nome “célula” foi estendido até para as estruturas que Hooke descreveu, que eram apenas as paredes celulares que permaneceram depois que as células vegetais vivas dentro delas morreram. Mais tarde, Hooke e seu contemporâneo holandês Antoni Van Leeuwenhoek foram capazes de visualizar células vivas, revelando um mundo não visto anteriormente abundante de organismos microscópicos móveis.

Na história da microscopia, 200 anos foram necessários para que o microscópio deixasse de ser um instrumento exótico e pouco acessível para ser usado em uma escala mais ampla. Então, a partir do século XIX, graças aos estudos realizados por microscopistas puderam afirmar o conceito de célula como verdade científica, surgindo à ciência da biologia celular (MELO, 2002).

Em geral, podem-se dividir as unidades de estruturas biológicas em macroscópicas e microscópicas, sendo essa última invisível a olho nu. As unidades de medida em microscopia compreendem o micrômetro (μm), em microscopia óptica e nanômetro (nm) e o angstrom (Å), na microscopia eletrônica.

Tabela 2 – Unidades de medida utilizada em microscopia

Unidade de medida	Símbolo	Valor
Micrômetro	μm	0,001 mm
Nanômetro	nm	0,000001 mm
Angstrom	Å	0,0000001 mm

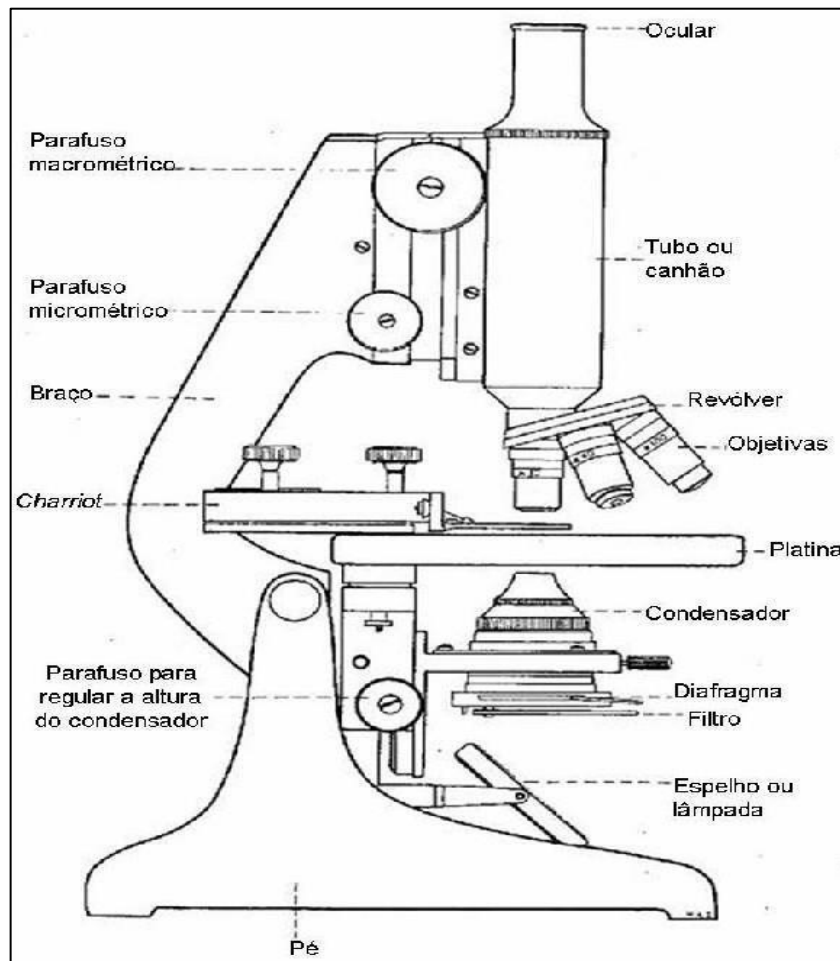
Fonte: Junqueira e Carneiro (2013, p. 4).

O tipo mais simples de microscópio é uma lente de aumento, que permite a observação de estruturas com diversas vezes de aumento; é muito utilizado para a observação de grãos de minérios, de superfícies de fraturas de metais, de amostras de fibras têxteis, papel e outros produtos da indústria química e metalúrgica. Os microscópios “compostos” já são instrumentos mais poderosos, que permitem desde a observação com aumentos de algumas dezenas de vezes até um máximo de 1500 a 2000 vezes, o limite da observação com luz visível.

O microscópio composto tem basicamente um conjunto de lentes, a ocular (que fica perto do olho do observador, ou do dispositivo fotográfico) e a objetiva (que fica perto do objeto a ser examinado). Unindo os dois conjuntos de lentes ficam um tubo ótico com “comprimento ótico” padronizado, geralmente com 160 nm . Na prática, os microscópios modernos têm um grande número de outros elementos óticos incorporados ao caminho da luz dentro do “tubo”, como filtros, analisadores, prismas, espelhos, lentes, “zoom”, etc.

Ao microscópio de luz (também chamado microscópio óptico), as preparações coradas são examinadas por iluminação que atravessa o espécime (transiluminação). O microscópio de luz é composto de partes mecânicas e óticas (Figura 11).

Figura 11 – Microscópio Óptico.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013, p. 3).

Segundo Junqueira e Carneiro (2013), o componente óptico consiste em três sistemas de lentes: condensador, objetivas e oculares, como pode ser observado na figura acima. O condensador concentra a luz de uma lâmpada e projeta um feixe luminoso sobre o espécime. A objetiva recebe a luz que atravessou o espécime e projeta uma imagem aumentada do espécime em direção à ocular, que novamente amplia a imagem e a projeta na retina, em uma tela, em uma câmera fotográfica ou em um detector eletrônico. No caso das imagens projetadas na retina, a ampliação total é calculada multiplicando-se o aumento da objetiva pelo aumento da ocular.

4.3 COMPONENTES DE UM MICROSCÓPIO ÓPTICO

A microscopia óptica possibilita o aumento de imagens através da luz que, após incidir sobre a amostra, passa por um conjunto de lentes objetivas (que formam e aumentam a imagem) e oculares (que aumentam a imagem). Além de ampliar a imagem de um objeto, o microscópio serve para aumentar o poder de resolução do olho humano (0,1 - 0,2 mm). Poder de resolução é a capacidade de distinguir dois pontos muito próximos um do outro.

Os microscópios ópticos têm um limite de resolução da ordem de 0,2 μm , ou seja, as lentes destes microscópios conseguem mostrar dois pontos distintos se estes estiverem separados por distâncias de pelo menos 0,2 μm . É importante lembrar que, para uma estrutura ser observada através de um microscópio óptico, é necessário que ela seja suficientemente fina para deixar que os raios luminosos a atravessem, além de ter índices de refração ou coloração diferentes do meio que a circundam.

Um microscópio óptico típico é constituído por partes mecânicas, ópticas e elétricas:

- Base: é o suporte do microscópio, peça que sustenta todas as outras.
- Braço ou estativa: é a peça que liga a base até a parte superior do microscópio e onde se deve segurar o microscópio para ser transportado.
- Platina: é uma placa de metal com um orifício no centro, por onde passam os raios luminosos. O objeto que vai ser observado é colocado sobre uma lâmina de vidro e esta, sobre a platina, exatamente em cima do orifício.
- Charriot: Localizado acessória e superficialmente à platina, é formado por uma presilha, dois botões giratórios e dois trilhos que têm a função de movimentar a lâmina no plano e assim permitir a observação de toda a sua área.
- Canhão: parte mais superior do microscópio, contém um conjunto de

espelhos que projetam a imagem em direção às oculares nele encaixadas.

- Revólver: peça encontrada abaixo do canhão na qual se inserem várias lentes objetivas. É dotado de um movimento de rotação que permite posicionar a objetiva desejada para a observação do material a ser analisado.
- Fonte de luz: normalmente uma lâmpada ou, em modelos mais antigos, um espelho, que se apoia na base do microscópio. No caso da fonte de luz ser uma lâmpada, pode-se observar, ao lado da estativa ou da base do microscópio, o interruptor da lâmpada e o regulador da intensidade luminosa.
- Condensador: de forma circular e situado entre a platina e a base, o condensador converge os raios luminosos provindos da lâmpada e projeta-os como um cone de luz sobre o material que está sendo examinado.
- Receptáculo do filtro: peça de forma circular, presa ao condensador, destinada à recepção de um filtro. Este é uma placa de vidro colorida (azul, verde, etc.) que torna a luz adequada ao uso.
- Diafragma ou íris: fica acima do receptáculo do filtro e se liga a uma alavanca que permite sua abertura ou fechamento, levando ao controle da passagem total ou parcial da luz.
- Objetivas: são lentes que projetam uma imagem aumentada e invertida do objeto nas oculares e inserem-se no revólver, através de rosca. Toda objetiva traz gravado o número do aumento que proporciona. A objetiva de 100 X é também chamada objetiva de imersão e é somente utilizada com óleo especial, o qual permite maior refração da luz para dentro da objetiva, corrigindo a pouca luminosidade nas observações feitas em grandes aumentos. Após o uso, o óleo é removido com xilol, éter ou benzina, embebido em papel especial ou algodão.

- Ocular: aumenta a imagem do objeto após o aumento já proporcionado pela objetiva. É através desta lente que o observador vê a imagem do objeto (daí o nome ocular, uma vez que o olho do observador está colocado à frente dela). Toda ocular traz gravado o número de aumentos que proporciona. Para saber-se em que aumento vemos um objeto ao microscópio é necessário apenas multiplicar o número do aumento dado pela objetiva pelo número do aumento dado pela ocular. Por exemplo, se a objetiva usada aumenta 5 X e a ocular aumenta 10 X, o objeto está sendo observado com um aumento total de 50 X.

4.4 CITOQUÍMICA

É a área da biologia celular e estrutural dedicada aos estudos dos métodos de coloração de tecidos e constituintes celulares e subcelulares. As células, assim como, os tecidos são compostos em sua maioria, por elementos químicos de baixo peso molecular, como: hidrogênio, carbono, nitrogênio e oxigênio. Isso faz com que o material a ser analisado (matéria orgânica), em microscópio óptico apresente coloração, resultado de várias reações químicas muito complexas entre a solução corante e o material, para que assim torne-se visível e possa ser estudado e analisado.

A maioria dos elementos que constituem os tecidos é naturalmente incolor e os respectivos índices de refração não se afastam muito da água. Para que eles se tornem visíveis ao microscópio óptico é necessário, recorrermos à coloração quer dos componentes proteicos das estruturas, quer das inclusões celulares de natureza química diversa.

Os componentes químicos que podem ser avaliados pela técnica citoquímica são: ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lipídeos, íons (complexos moleculares), vitaminas e enzimas. As reações citoquímicas envolvidas entre corante e substrato podem ser por ligações covalentes, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas.

Por serem corantes sintéticos, os corantes testados são mais acessíveis, apresentam uma maior variedade em relação aos corantes tradicionais utilizados em hematologia, são atóxicos, o que permite uma maior segurança durante a análise e descarte ao meio ambiente, justificando assim, as suas várias aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia e na própria hematologia.

Visto ao microscópio, o esfregaço ideal, será aquele que permite a visualização correta de todos os elementos, sem que os mesmos apareçam superpostos uns sobre os outros. Tais resultados são conseguidos com a prática, dependente quase que exclusivamente da espessura da película do esfregaço sobre a lâmina.

4.5 HISTOQUÍMICA

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

Ainda que muito esteja por explicar sobre a cor, sabe-se que certos grupos atômicos, designados cromóforos, lhe estão associados. Os mais importantes são $C=C$, $C=O$, $C=S$, $C=N$, $N=N$, $N=O$ e NO_2 , e destes, quanto maior for o seu número num determinado composto, mais intensa é a cor.

4.6 COLORAÇÃO LEISHMAN

Os corantes empregados habitualmente em técnica hematológica, pertencem ao grupo dos corantes sintéticos, derivados da hulha, as anilinas, solubilizadas no estado de sais. Romanowsky idealizou um método em que uma solução de corantes poderia corar estruturas. Misturas dos corantes eosina e azul de metileno são preparadas segundo proposição de vários autores: Leishman, May-Grunwald, Giemsa, Wright e outros (que dão os respectivos nomes aos corantes, segundo Leishman, Giemsa, etc.). Esses corantes são dissolvidos em álcool (em geral metanol). Na solução envelhecida, o azul de metileno se oxida em gradações diferentes, originando diversos “azures” de metileno. Dessa forma, teremos então uma solução alcoólica de um complexo eosinato de azul e “azures” de metileno (OS CORANTES..., 2009).

Dessa forma, o corante Leishman é um derivado do corante Ramanowsky e constitui uma mistura de eosinato de azul de metileno e eosinato de violeta e azul de metileno, dissolvido em álcool metílico.

O corante de Leishman, é usado em microscopia para colorir esfregaços de sangue, ele fornece excelente qualidade de coloração. É um sistema para coloração de células em esfregaço de sangue periférico, medula óssea ou para estudo citológico de elementos celulares colhidos por punção, raspagem ou concentrados celulares de derrames cavitários (SILVA; MARMITT; HAETINGER, 2008).

É baseado em uma mistura metanólica de azul de metileno “policromado” (demetilado em vários corantes azures) e eosina. A solução estoque metanólica é estável e também serve ao propósito de fixar diretamente o esfregaço eliminando um passo de pré-fixação. Se uma solução de trabalho é feita por diluição com um tampão aquoso a mistura resultante é muito instável e não pode ser usada por muito tempo (SILVA; MARMITT; HAETINGER, 2008).

Na preparação do corante Leishman foram utilizados 2,0 g do corante em pó que foram pesados em balança analítica e logo após foi transferido aos poucos para um balão volumétrico de 1000 mL contendo 500 mL metanol P.A. onde um agitador

magnético foi utilizado para facilitar a dissolução de todo pó. Após a dissolução do pó foi completado todo o volume do balão até o menisco. A solução foi filtrada, guardada e identificada em frascos âmbar. Foram agitados de 2 a 3 vezes ao dia durante 7 dias e deixados em repouso por 1 mês antes da sua utilização.

4.7 ESTUDO DOS ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS

Os esfregaços de sangue, após a coloração, fornecem dados valiosos no estudo das doenças relacionadas ao sangue e demais sistemas do organismo. O diagnóstico das leucemias, anemias, estados hemorrágicos e infecções por hematozoários são exemplos comuns da utilização desse estudo.

Uma sistematização técnica ao examinar os esfregaços torna-se necessária, para retirar deles o maior número possível de conclusões.

O estudo microscópico é iniciado com pequeno aumento, observando-se a distribuição das células especialmente nas margens e cauda do esfregaço sanguíneo. Seleciona, ainda, a porção de espessura e distribuição adequada dos elementos para o exame da morfologia celular, que já se esboça, orientando quanto à eficiência da coloração executada.

Sob imersão, os detalhes da regularidade do contorno celular, basofilia, acidofilia do citoplasma, características tintoriais de suas granulações, distribuição da cromatina nuclear fornecem dados para o exame morfológico das células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos.

Estudam-se hemácias quanto ao tamanho, forma, conteúdo de hemoglobina, inclusões e maturidade. A imaturidade é evidenciada pela presença de núcleos. Quanto às alterações do diâmetro, ou anisocitose, as hemácias são classificadas em micróцитos, macróцитos e megalócitos, quando comparadas com o normócito de 7,2 μm de diâmetro médio.

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes, equipamentos e materiais para realização deste trabalho estão listados a seguir.

a) Equipamentos

Microscópio óptico (OLYMPUS CX 21), vórtex (Logem), agitador magnético (Modelo TE-085-Tecnal), balança analítica digital (Modelo 240 A-Precisa), pHmetro, lâminas de vidro, suporte para lâminas, micropipetador, pipetas, balão de fundo chato 1000 mL, cuba de vidro, vidro de relógio, pisseta, funil de vidro, bastão de vidro, frascos âmbar, tubos de ensaio com rosca e estante.

Figura 12 – Microscópio óptico (OLYMPUS CX 21).



Fonte: divulgação.

b) Reagentes

Para esta pesquisa, foram utilizados como reagentes os seguintes materiais: Água destilada, metanol P.A. (Vetec), marron alimentício (Kerry), azul brilhante (Duas Rodas), vermelho drim (Master Flavor), azul indosol (Epa Química), Rodamina B (Leagel), Murexida (Epa Química), cristal violeta (Duas Rodas) e vermelho de metila (Master Flavor).

Figura 13 – Foto da solução de Rodamina B.



Fonte: divulgação.

5.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES CORANTES

Para tal procedimento, foram testados inicialmente oito corantes utilizados na indústria alimentícia na coloração dos esfregaços sanguíneos das amostras de sangue periférico. Todos os corantes foram preparados utilizando os mesmos procedimentos na preparação do corante padrão Leishman. Segue abaixo a Tabela 3 com os corantes testados.

Tabela 3 – Corantes testados na coloração dos esfregaços sanguíneos.

Numeração	Corante
1	Marrom Alimentício
2	Azul Brilhante
3	Vermelho Drim
4	Azul Indosol
5	Rodamina B
6	Murexida
7	Cristal Violeta
8	Azul Brilhante

Fonte: elaboração do autor.

Após a preparação das soluções corantes com base no padrão Leishman, as soluções foram testadas e logo observou-se que a maioria das soluções corantes não coravam bem, o que provavelmente seria resultado de um má esfregaço sanguíneo ou da concentração das soluções ou até mesmo por não apresentarem afinidade por membranas celulares.

Como forma de melhorar os resultados as soluções iniciais foram diluídas nas seguintes concentrações 250 μ L, 500 μ L, 700 μ L e 1000 μ L em metanol P.A. Feitas as novas diluições, foram homogeneizados no vórtex durante 1 minuto, filtrados em papel de filtro e funil de vidro, e em seguida guardados em tubos de ensaio

com rosca e identificados de acordo com o corante e suas diluições. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

Figura 14 – Vórtex.



Fonte: autor.

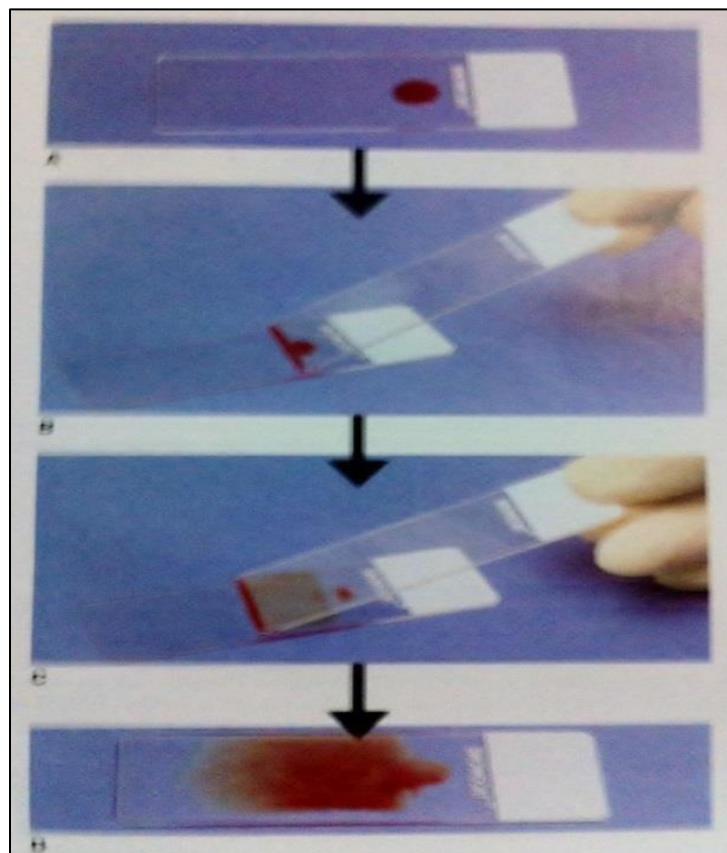
5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO

O método utilizado para realizar o esfregaço sanguíneo foi o método das duas lâminas (método de Wedge), que consiste na deposição de uma pequena gota de sangue homogeneizado, aproximadamente da metade até três quartos da extremidade direita da lâmina, em uma lâmina limpa colocada em uma superfície plana (Figura 15A). A extremidade de uma segunda lâmina “distensora” é posicionada na frente da gota de sangue, formando um ângulo de 30 a 35° (Figura 15B).

A distensora é então recuada até tocar a gota de sangue (Figura 15C). Assim que o sangue tenha se espalhado ao longo de sua borda posterior, a distensora é empurrada para a esquerda (ou para a direita, para os canhotos) com um movimento rápido e uniforme (evitando pressioná-la) de modo que uma fina camada de sangue seja distendida sobre a lâmina (Figura 2.5 D). As lâminas com os esfregaços foram

colocadas voltadas para cima, sobre um suporte adaptado em uma cuba de vidro ou forma de pirex de uso caseiro.

Figura 15 – Esquema do método das duas lâminas. Coloração de um esfregaço sanguíneo: (A) dispensar uma gota de sangue na lâmina; (B) com o auxílio de uma distensora, tocar a gota de sangue depositada; (C e D) empurra rápida e suavemente a distensora para frente para concluir o esfregaço.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013, p. 47).

Cada lâmina distensora foi usada somente uma vez, e descartada em um recipiente para materiais perfuro cortantes. O esfregaço foi colocado em um recipiente inclinado, permitindo a secagem da lâmina ao ar de maneira rápida, ficando assim pronta para ser corada ou fixada.

As colorações foram realizadas colocando-se as lâminas com a extensão sanguínea seca voltadas para cima sobre o suporte para a coloração, em seguida foram todas cobertas com 20 gotas de cada corante e deixou-as secar por 2 minutos (fase de fixação), logo após adicionou-se água destilada em igual volume,

tendo o cuidado de distribuir de maneira homogênea e deixar por 6 a 8 minutos (fase de coloração).

Ao colocar água teve-se o cuidado de não deixar transbordar para não retirar o corante. Desprezou-se as soluções água-corante e foram lavadas as lâminas em água corrente. A parte posterior das lâminas foram limpas com gaze seca e deixando-as secar em posição vertical a temperatura ambiente. Tendo feito todos esses procedimentos, todas as soluções corantes foram observadas em microscópio binocular, com objetiva de 100 X e oculares de 10 X, ou seja, foram ampliadas 1000 vezes. Após observação em microscópio foram fotografadas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE DA MICROGRAFIA DAS LÂMINAS

Corantes são substâncias químicas que apresentam cor definida pela presença de grupos atômicos ou radicais cromóforos na sua molécula. Corantes ácidos são sais cuja base é incolor e o ácido corado. A eosina, representando o grupo, apresenta cor vermelha. Corantes básicos são sais cuja base é corada e o ácido é incolor, sendo representado pelo azul de metileno. Corantes neutros apresentam o ácido e a base corados como o eosinato de azul de metileno, obtido pela combinação, em proporções adequadas, da eosina e azul de metileno. São os mais usados na hematologia.

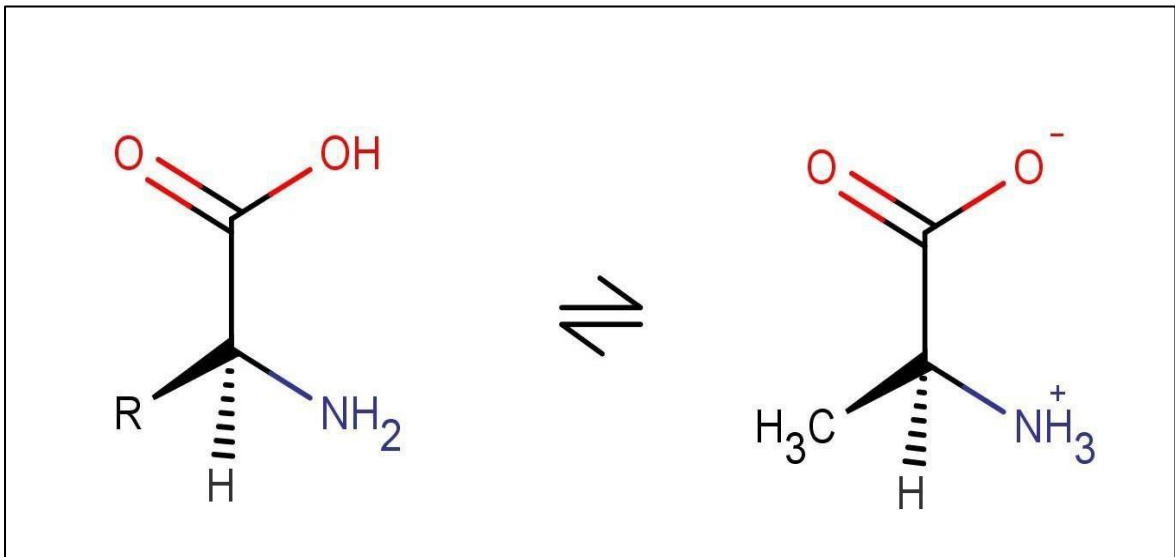
Tratada pelos corantes, a célula evidencia estruturas acidófilas, basófilas e neutrófilas, conforme a retenção do corante ácido, básico ou neutro, respectivamente.

O núcleo celular, apresentando-se ácido pela presença de ácido desoxirribonucléico (DNA), cora-se pelo azul de metileno, enquanto o citoplasma alcalino cora-se pela eosina. Granulações neutrófilas específicas coram-se em vermelho-violáceo. Outras estruturas são destacadas pela afinidade com azul de metileno obtida pela oxidação do azul de metileno.

Um corante ionizado em solução reage com um substrato de carga iônica oposta (afinidade eletrostática).

Quase todas as proteínas, que ocorrem nos tecidos animais e vegetais, são anfóteras (apresentam propriedades de ácido e de base fracas), embora algumas estejam em tais extremos. Em condições de pH neutro, a maioria das proteínas têm uma carga positiva de seus aminoácidos ionizados como mostra a Figura 16 o (NH_3^+) e, como tal, ligam-se a corantes ácidos com carga negativa, como a eosina.

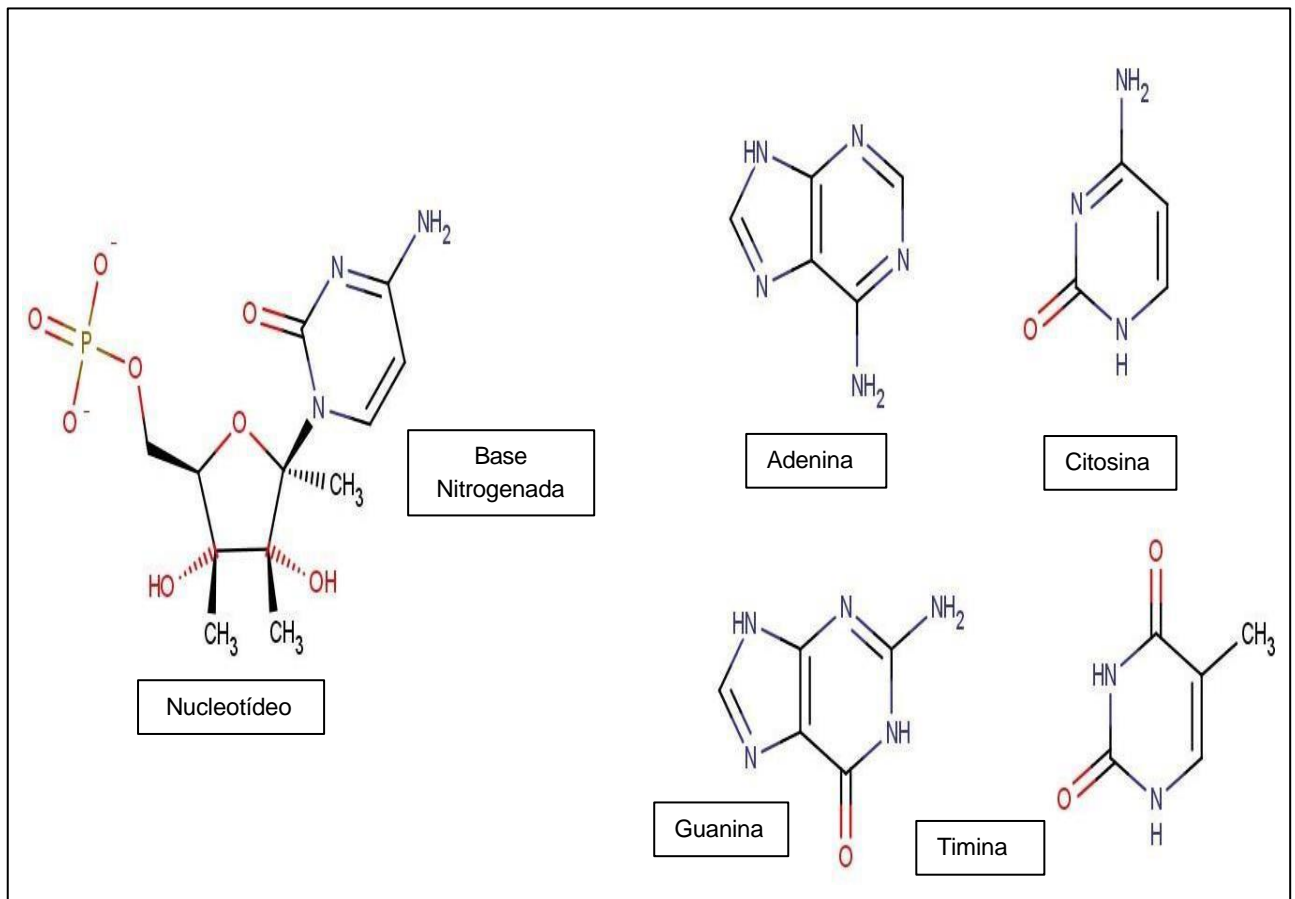
Figura 16 – Ionização do aminoácido.



Fonte: autor.

Por outro lado, os ácidos nucleicos possuem uma carga negativa em pH neutro, como mostra a Figura 17 o grupo fosfato e, portanto, estas moléculas ligam-se a corantes básicos, como é o caso do azul de metileno, azul brilhante, rodamina B e cristal violeta.

Figura 17 – Estrutura do DNA

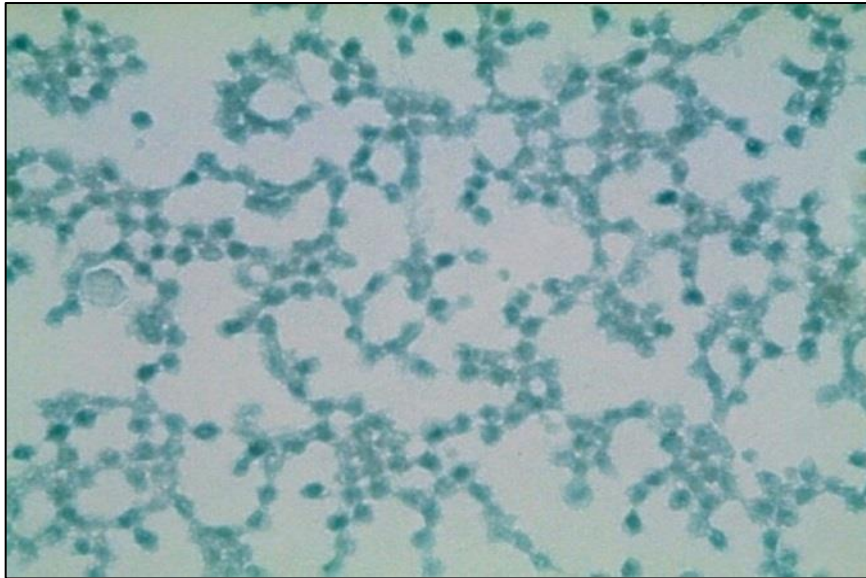


Fonte: autor.

Como já foi informado anteriormente, foram testados inicialmente 8 tipos de corantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia e que de acordo com os testes realizados, alguns foram sendo descartados por não apresentarem poder de coloração diante das células sanguíneas.

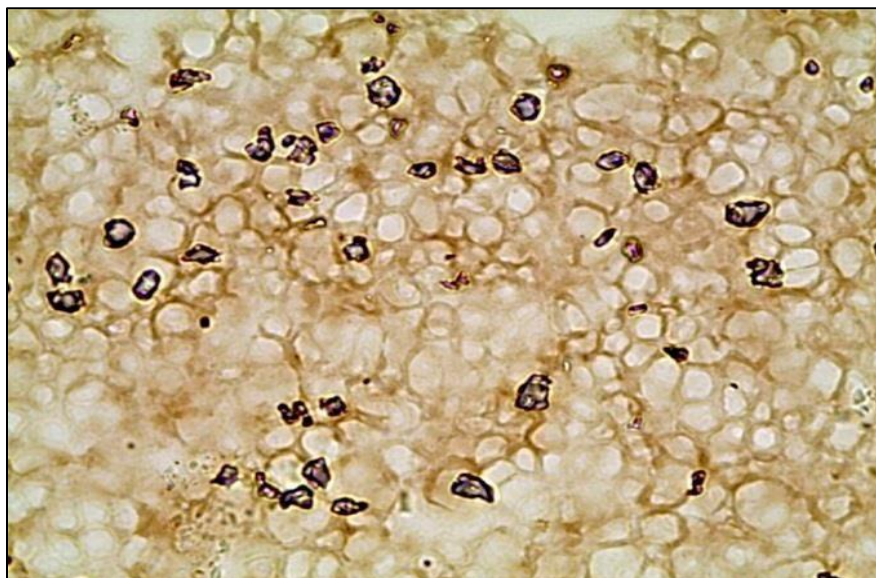
Dos corantes testados, apenas 4 apresentaram poder de coloração quando aplicados aos esfregaços sanguíneos, como podem ser observados nas figuras 18, 19, 20 e 21.

Figura 18 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Azul Brilhante.



Fonte: autor.

Figura 19 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Azul Indosol.



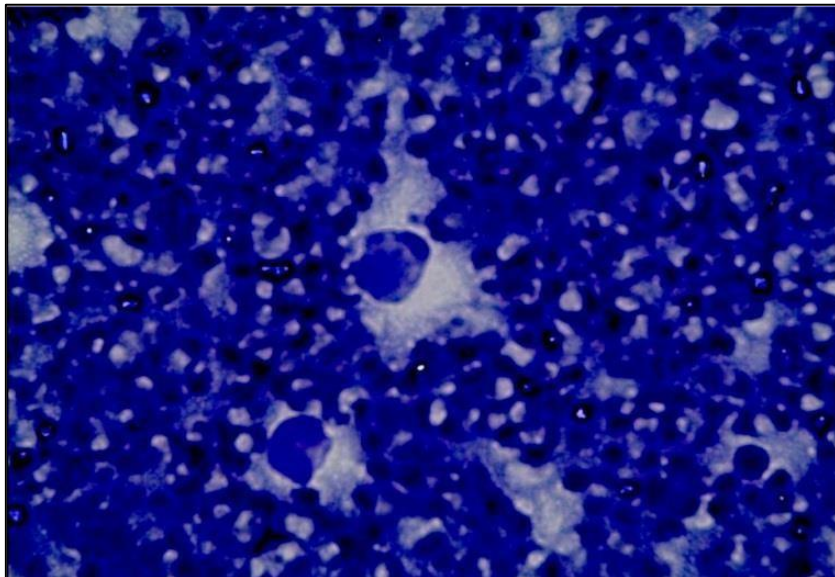
Fonte: autor.

Figura 20 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Rodamina B.



Fonte: autor.

Figura 21 – Micrografia do esfregaço sanguíneo corado com Cristal Violeta.



Fonte: Autor.

A lâmina corada pela solução feita com o corante azul brilhante, corante básico, apresentou uma afinidade por membrana citoplasmática, o que provavelmente foi ocorrido pela atração eletrostática pela afinidade do grupo NH_3^+ dos aminoácido presentes nas proteínas do citoplasma da célula, não apresentando, portanto, especificidade por algum tipo de célula sanguínea de linhagem branca ou vermelha, como os leucócitos e as hemácias.

A lâmina corada com o azul indosol, no geral, corou bem a célula, mas por apresentar muitos “grumos” resultado este, que pode ter sido provocado por uma má homogeneização e filtração, não foi possível diferenciar com exatidão os tipos de células sanguíneas.

Já a lâmina da solução corante com o rodamina B, corante básico, apresentou uma boa afinidade por membranas citoplasmáticas, porém, foram visualizadas a presença de algumas hemácias, caracterizadas pela ausência de núcleo e apresentando coloração rosa, resultado da presença de hemoglobina, sendo possivelmente da afinidade do corante pelo grupo fosfato, presente na estrutura do DNA das células.

O resultado mais expressivo foi o da lâmina corada com a solução do cristal violeta, corante básico, onde apresentou afinidade por membrana citoplasmática e uma boa afinidade por células de linhagem branca, ou seja, leucócitos, caracterizadas pela coloração azul e sendo um pouco maior do que as hemácias. Este resultado provavelmente deve ter sido alcançado pela afinidade também do corante pelo grupo fosfato presente no DNA das células, a presença NH_2^+ (grupo catiônico) torna-o básico, assim como o azul de metileno, presente na mistura do corante Leishman que tende a corar por atração eletrostática, estruturas ácidas, como por exemplo, os ácidos nucléicos presentes no núcleo das células, justificando assim sua afinidade por determinada célula.

7 CONCLUSÃO

A literatura especializada afirma que alterações no sangue podem ser adquiridas ou hereditárias, podendo ser originárias na formação de células ou nos componentes sanguíneos. Assim, os processos bioquímicos, fisiológicos e imunológicos envolvidos na formação e na função das células sanguíneas normais e nos distúrbios que podem ocorrer em diferentes doenças tem sido estudados pela área da Saúde ao longo das últimas décadas (HOFFBRAND, 2008; BERNARD, 1986).

Nessa perspectiva, os tratamentos disponíveis vêm sendo ampliados e melhoraram substancialmente para pacientes com doença do sangue e dos órgãos formadores de sangue, com a compreensão da fisiopatologia das doenças e com a introdução de novas drogas, além de novos meios de tratamento de suporte. Dessa maneira, existe uma tendência de diminuição da mortalidade de pacientes que tiveram diagnóstico mais rápido de doenças hematológicas (HOFFBRAND, 2008).

Diante disso, esta pesquisa teve como objetivo principal avaliar a afinidade química e as possibilidades dos corantes artificiais: marrom alimentício, vermelho drim, murexida, vermelho de metila, azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta, juntamente com o Leishman, corante padrão utilizado na rotina laboratorial em hematologia, virem a ser utilizados também como soluções corantes em células sanguíneas.

A partir da análise dos resultados obtidos com os corantes artificiais, azul brilhante, azul indosol, rodamina B e cristal violeta, pode-se concluir que eles possuem potencialmente poder de coloração em esfregaços de células sanguíneas e podem ser utilizados como soluções corantes na hematologia em paralelo ao padrão Leishman, sendo o cristal violeta, específico para coloração de células brancas, que por apresentar essa característica, pode desempenhar um papel importantíssimo na identificação de leucócitos, que são responsáveis pela primeira linha de defesa contra infecções.

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM). **Corantes**. 2006 Disponível em <http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>. Acesso em 28 mar. 2013.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. 1294 p.

BAIN, B. **Células Sanguíneas**. São Paulo: Artes Médicas, 1997.

BERNARD, J. J. **Manual de Hematologia**. 3 ed. São Paulo: Masson do Brasil, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução CNNPA nº 44, DE 1977**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1977/res0044_00_00_1977.html. Acesso em: 3 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 27**, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0027_06_08_2010.html. Acesso em: 5 mar. 2014.

DE ROBERTS, E. M. F.; HIB, Jose. **Bases da biologia celular e molecular**. Tradução por Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade; Sérgio Ferreira de Oliveira; Telma Maria Tenório Zorn. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FAILACE, Renato. **Hemograma**: manual de interpretação. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995

FIGUEIREDO, A. **Histoquímica e Citoquímica em plantas**. Lisboa: Faculdade de ciências da Universidade de Lisboa, 2007.

HENRY, J. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999.

HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos em hematologia**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ISHIKAWA, N. M. et.al. **Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes**. Brasília: Embrapa, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIERSZENBAUM, Abraham L. **Histologia e biologia celular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; LODI, W. R. N. **Princípios de Bioquímica**. 2 d. Editora Sarvier, 1991.

LIMA, R. et al. **Métodos de laboratórios aplicados à clínica**. 7 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia**. 4 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2011.

LORENZI, Therezinha. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2 ed. São Paulo: Medsi, 1999.

MERCOSUL. Grupo Mercado Comum. **Resolução nº 11/2006**. Regulamento técnico Mercosul sobre “lista geral harmonizada de aditivos alimentares e suas classes funcionais”. Disponível em: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_11-06.pdf. Acesso em: 3 mar. 2014.

NAOUM, Paulo C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia - Hemoter**, São José do Rio Preto-SP, p.15-23, fev., 2001.

OLICHESKI, Adriana. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa para o diagnóstico de protozoários do gênero Babesia (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero Ehrlichia (Ehrlich, 1888) em cães (Canis familiaris) no município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2003. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Porto Alegre, 2003.

OS CORANTES Alimentícios. **Aditivos & Ingredientes**, n. 62, p. 28-39, 2009. Disponível em: https://aditivosingredientes.com/upload_arquivos/201602/2016020457300001454331253.pdf. Acesso em: 30 mar. 2014.

RAPAPORT, Samuel I. **Hematologia: introdução**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1990.

ROSS, Michael H, **Histologia: texto e atlas - em correlação com a biologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014

SILVA, Cristiano Pochmann da; MARMITT, Sandro; HAETINGER, Claus. **Avaliação da degradação do corante vermelho bordeaux através de processo fotoquímico**. Lajeado-RS: Engenharia Sanitária Ambiente, 2008.

SKOOG, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004.

THRALL, M. et.al. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

WILLIAMS; A. et al. **Hematologia**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1976.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora

Atheneu, 2013.

ZEBRAL, Yuri; SILVA, Bruna Zafalon; ROBALDO, Ricardo. Teste de corantes para análise e identificação de células sanguíneas EM *Odontesthes bonariensis*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20, 2011. **Anais [...]** Pelotas-RS: Cic 2011, 2011. p. 1 – 4

APÊNDICES

APÊNDICE A

The Pharmaceutical and Chemical Journal, 2016, 3(4):17-22

Available online www.tpcj.org



Research Article

ISSN: 2349-7092
CODEN(USA): PCJHBA

Food dyes as blood cell dyes: An experimental and molecular modelling study to brilliant blue FCF and brown HT

Antônio M. de Oliveira Jr.^a, Telma M.A.M. Lemos^b, Deyse de S. Dantas^c, Robson F. de Farias^{a*}

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Norte, Cx. Postal 1664, 59078-970 Natal-RN, Brasil

^bDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. General Gustavo de Farias, s/n, 59012-570, Petrópolis, Natal-RN, Brasil

^cUniversidade Federal do Amapá – UNIFAP, Rod. Juscelino Kubitschek, KM-02 Jardim Marco Zero, 68.903-419, Macapá - AP, Brasil

Abstract In this work, the food dyes brilliant blue FCF and brown HT are experimentally tested as blood cell dyes. Quantum chemical calculations by Semi-Empirical (PM6) method were also performed. Calculated HOMO and LUMO orbitals energies, dipole moments, polar surface areas and entropies, suggested a higher affinity by the cells towards [blue FCF]⁻² in comparison with [brown HT]⁻². For both species, protonation of the benzene central ring (by NH₃⁺ of amino acids present at the plasmatic membranes) is supposed based on the specific location of LUMO orbitals.

Keywords Brilliant Blue FCF, Brown HT, Blood cells, Molecular modelling; Semi-Empirical

Introduction

The classical technique of light microscopy remains the basis of any cell study and, consequently, the use of several dyes to promote the appropriate visualisation of the cells and their organelles, is paramount [1,2].

Brilliant blue FCF(ethyl-[4-[[4-[ethyl-[(3-sulfophenyl) methyl] amino] phenyl]-(2-sulfophenyl) methylidene]-1-cyclohexa-2,5-dienylidene]-[(3-sulfophenyl)methyl]azanium), CAS Registry Number: 3844-45-9, it is a colorant used in food (such as in ice pops or in the liqueur blue curaço) and cosmetic (such as in shampoos and mouthwashes) industries. It is water soluble, with a λ_{max} at about 628 nm. It is generally a disodium salt with chemical formula C₃₇H₃₄N₂Na₂O₉S₃ (Figure 1).

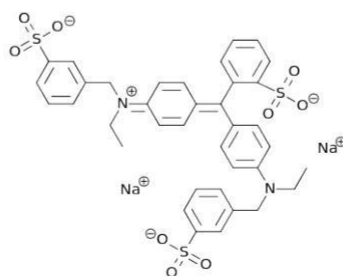


Figure 1: Structural formula for brilliant blue FCF



Brown HT (Figure 2), Disodium 4-[(2E)-2-[(5Z)-3-(hydroxymethyl)-2,6-dioxo-5-[(4-sulfonatophthalen-1-yl)hydrazinylidene]-1-cyclohex-3-enylidene]hydrazinyl]naphthalene-1-sulfonate, $C_{27}H_{18}N_4Na_2O_9S_2$, is a synthetic coal tar diazo food dye, used, for example, to substitute cocoa or caramel as a colorant.

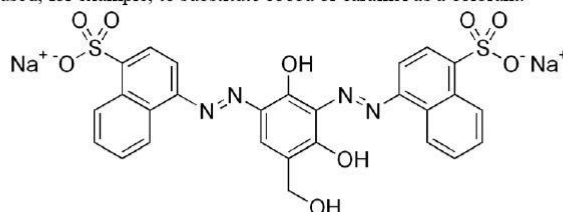


Figure 2: Structural formula for brown HT

Certainly, in cytology, the use of low cost and/or low toxicity dyes is important, taking into account the green chemistry tendencies. In this connection, in the present work, brilliant blue FCF and brown HT are tested as blood cell dyes.

Experimental

Quantum chemical calculations were performed by using Spartan'14 (version 1.1.8) [3]. A semi-empirical (PM6) method was used. Since both dyes are disodium salts that dissociate into solution, in both cases the calculations were performed on the dianions: $[C_{37}H_{34}N_4O_9S_3]^{2-}$ and $[C_{27}H_{18}N_4O_9S_2]^{2-}$, respectively.

The dyes solutions were prepared as follows: 0.028 g of the dyes were dissolved in 250, 500, 750 and 1,000 μ L of methanol (Vetec).

The blood laminas for microscopy were prepared by the following protocol: blood smears on the glass plaque were dried at room temperature (26 °C) for 1 h. After that, the blood smears were covered with the dyes solutions (20 drops) for 3 minutes. Hence, 20 drops of distilled and buffered water were used (10 minutes of contact) in order to remove the dye solution excesses. Finally, the microscopy laminas were washed with distilled water and dried at room temperature (26 °C) at vertical position, for 30 minutes.

The laminas were then visualized (and photographed) in a binocular optical microscope (Olympus, model CX 21; 10 X and 100 X objective lenses, that is, a 1,000 X of maximum magnification).

Results and Discussion

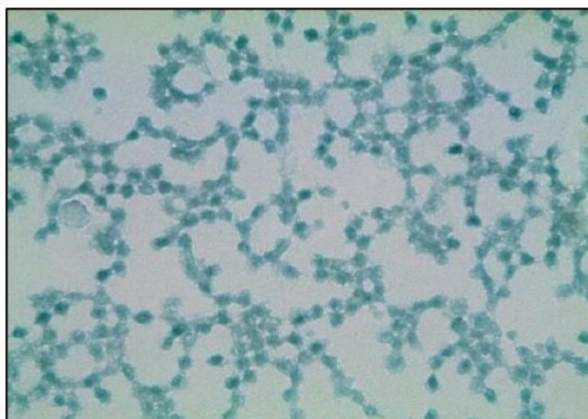


Figure 3: Blood cells (100 X) with brilliant blue FCF (0.028 g/1,000 μ L.)



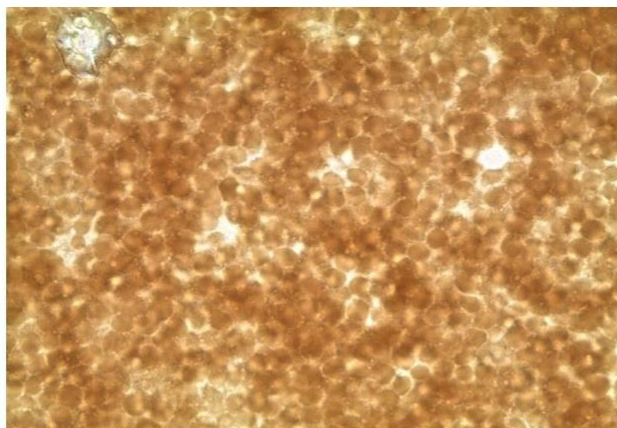
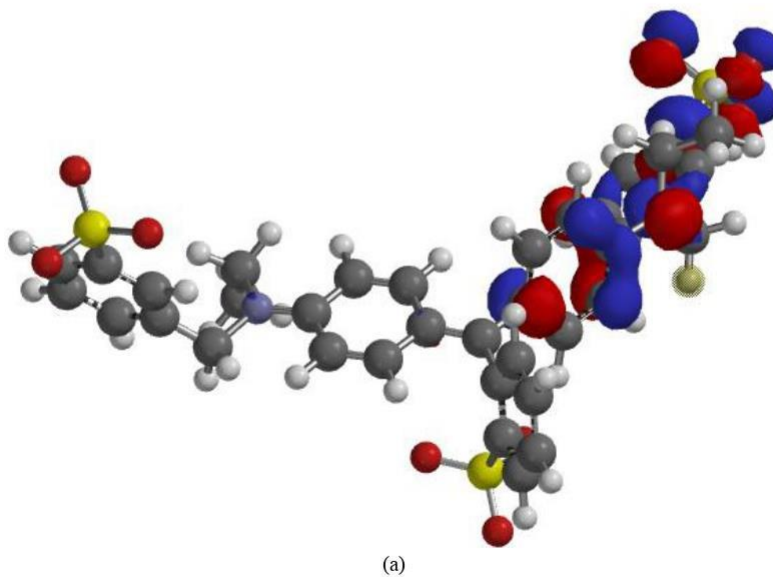
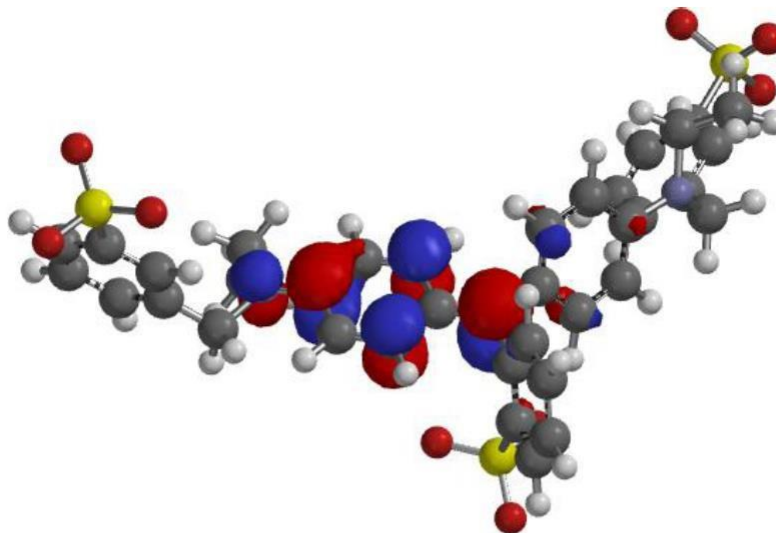


Figure 4: Blood cells (1,000 X) with brown HT (0.028 g/1,000 μ L)

It was verified that brilliant blue FCF and brown HT exhibit very high affinity towards plasmatic membranes, specially the solutions with the concentrations 0.028 g/750 μ L and 0.028 g/1,000 μ L. Two illustrative results are shown in Figures 3 and 4.

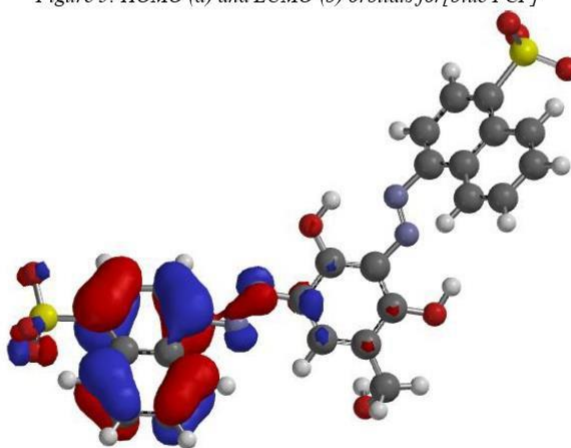
Brilliant blue is a basic dye. Hence, it is supposed that it must interact with the NH_3^+ groups of the amino acids present at the plasmatic membranes of the blood cells. On the other hand, it was verified that both dyes do not have any specific affinity, that is, for withe or red blood cells, for example. The interaction with NH_3^+ groups occurs, probably, by protonation of the respective dianions.





(b)

Figure 5: HOMO (a) and LUMO (b) orbitals for [blue FCF]²



(a)



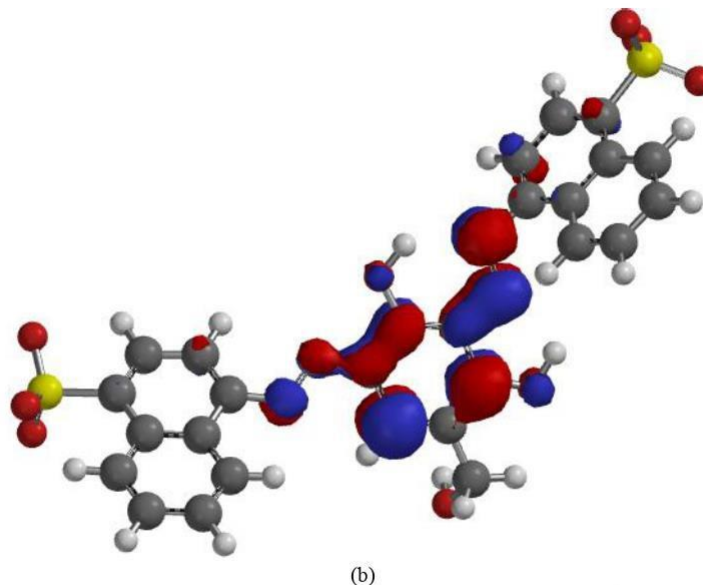


Figure 6: Homo (a) and LUMO (b) orbitals for [brown HT]²⁻

The quantum chemistry calculations results are summarized in Table 1. As can be verified, the [brown HT]²⁻ exhibits a higher dipole moment and a large polar surface area than [blue CFC]²⁻. So, it could be supposed a lower capacity of [brown HT]²⁻ to penetrate the lipid cell barrier [4], in comparison with [blue CFC]²⁻. Furthermore, [brown HT]²⁻ exhibits a LUMO orbital with an 1.77 eV energy, whereas the same orbital to [blue CFC]²⁻ has a 0.44 eV energy. So, since the interaction with the NH₃⁺ groups could be supposed as occurring by protonation, such protonation process is most favourable to [blue CFC]²⁻. Once again, the calculated data pointed out to a [blue CFC]²⁻ higher affinity towards cell bloods in comparison with [brown HT]²⁻. The HOMO and LUMO orbitals for both dianions are shown in Figures 5 and 6.

Table 1: Calculated quantum chemical parameters for blue FCF and brown HT dianions

Parameter	[C ₃₇ H ₃₄ N ₂ O ₉ S ₃] ²⁻	[C ₂₇ H ₁₈ N ₄ O ₉ S ₂] ²⁻
Energy/kJmol ⁻¹	-1012.13	-1034.08
E _{HOMO} /eV	-5.22	-4.95
E _{LUMO} /eV	0.44	1.77
Volume/Å ³	697.60	523.31
Area/Å ²	709.9	545.35
PSA/Å ²	154.83	183.59
Ovality	1.87	1.74
Polarizability	96.63	82.24
ZPE/kJmol ⁻¹	1675.17	1034.43
Dipolemoment/D	15.45	23.86
H ⁰ /au (298.15 K)	0.2919	0.0310
S ⁰ /Jmol ⁻¹ (298.15K)	898.04	763.00
G ⁰ /au (298.15K)	0.1899	-0.0556

As can be verified in Figure 5, the LUMO for [blue CFC]²⁻ is located, essentially, on the central benzene ring. Hence, it is possible to suppose a protonation of such ring by the NH₃⁺ group, as a main step in the interaction with



the amino acids groups of the plasmatic membrane. So, it is also possible to suppose that the Na^+ cations remain as the counter-ions of the SO_3^- groups, as the dye molecule penetrates the lipidic barrier.

As can be verified in Figure 6, to [brown HT]⁻² the LUMO orbital is also located, mainly, on the central benzene ring. So, the same reasoning made to [blue CFC]⁻² can be pointed out.

Since the ovality of both dianions are very similar (Table 1), it could be concluded that steric hindrance is not, for [blue CFC]⁻² and [brown HT]⁻², a factor to be considered for comparison and prediction of their affinities towards the cell membranes.

The calculated standard entropy values for [blue CFC]⁻² and [brown HT]⁻², 898.04 and 763.00 Jmol^{-1} , respectively, also suggests a higher affinity by the cells towards [blue CFC]⁻², since it is most favourable to the cell “incorporate” in its structure a molecule (dye) with higher entropy.

References

1. J. Brachet, Molecular cytology, vol. 1 – the cell cycle, Academic Press, Orlando, 1985.
2. J. Brachet, Molecular cytology, vol. 2 – cell interactions, Academic Press, Orlando, 1985.
3. Wave function Inc., Irvine, California, USA, 2014.
4. G.H. Bourne, J.F. Danielli (Ed.), International review of cytology, vol. 91–membranes, Academic Press, Orlando, 1984.

