



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

GABRIEL MARTINS DE BARROS

CORANTES EXTRAÍDOS DAS CASCAS DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense Camb.*) E DO CAJÁ (*Spondias Mombin L.*): OBTENÇÃO E ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE

TERESINA - PI
2021

GABRIEL MARTINS DE BARROS

CORANTES EXTRAÍDOS DAS CASCAS DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense Camb.*) E DA CAJÁ (*Spondias Mombin L.*): OBTENÇÃO E ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de mestre em Ciências e Saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para diagnóstico em saúde

Orientador: Airton Mendes Conde Júnior

Co-Orientador: João Batista Raposo Mazullo Filho

GABRIEL MARTINS DE BARROS

**CORANTES EXTRAÍDOS DAS CASCAS DO PEQUI (*Caryocar Brasiliense*
Camb.) E DA CAJÁ (*Spondias Mombin l.*): OBTENÇÃO E ANÁLISE DA
BIOCOMPATIBILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Ciências e Saúde
da Universidade Federal do Piauí para
obtenção do título de mestre
em Ciências e Saúde

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior (Orientador) - Presidente

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Santos Moura - (Membro Titular) - 1^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Karinn de Araújo Soares Bastos (Membro Titular) - 2^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maíra Soares Ferraz (Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, Diana e Lúcio pela atenção e apoio; sempre serão os meus heróis pelo que me ensinaram e continuam me ensinando até hoje.

Minha namorada Monaliza pela companhia diária, obrigado pelo companheirismo, apoio e paciência nos momentos dessa pesquisa

Minha irmã Gabrielly pela amizade e pelo entusiasmo nas conquistas

Ao meu orientador professor Airton Conde pelo aprendizado, pela ajuda, disponibilidade e confiança na realização dessa pesquisa.

Ao meu coorientador professor João Batista por me ajudar em pesquisas desde a graduação.

A professora Valdiléia Uchôa por toda ajuda na confecção dos extratos.

Ao meu avô Francisco das Chagas pelo apoio material nessa pesquisa.

Aos Amigos do laboratório pela parceria, ajuda com os experimentos, troca de experiências.

A coordenação do PPGCS, em especial a secretaria Edilene pela pronta atenção

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A banca de avaliação pelas valiosas sugestões informadas.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte ou contribuíram de alguma forma para esta dissertação de mestrado.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

RESUMO

Inovações a partir da exploração de corantes naturais aumentaram consideravelmente devido a malefícios à saúde humana e animal, ocasionados com uso de colorantes sintéticos. No campo da histologia as pesquisas são voltadas principalmente para a descoberta de um corante natural substituto da eosina. Plantas ácidas como cajá (*Spondias Mombin L.*) e pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*) que apresentam composição rica em carotenoides e são usadas como corantes na cultura popular, podem apresentar potencial coloração em tecidos biológicos, além de que suas cascas geralmente são descartadas e poucas utilizadas na indústria. Nessa perspectiva, o objetivo deste estudo é obter os corantes extraídos das cascas do Pequi e do Cajá, e verificar a biocompatibilidade dos colorantes em tecidos animais. Foi realizado um estudo experimental em que 5 kg da casca do pequi e 5 kg do cajá, foram desidratados, em seguida, as cascas foram trituradas, após uma semana o material foi colocado em um Rotaevaporador onde as misturas do pó do cajá e pequi foram separadas do etanol, com testes elaborados a melhor concentração para extrato do pequi foi definida em 25% e do cajá em 20%. Foram selecionados tecidos do coração, pulmão, fígado e rim provenientes de outra pesquisa previamente aprovada (506/18 CEUA- UFPI). Os materiais foram corados em consonância com seu respectivo grupo, Grupo 1: controle positivo, coloração com Hematoxilina e eosina; Grupo 2: coloração dos tecidos com o extrato do cajá unicamente; Grupo 3: coloração dos tecidos com o extrato do pequi unicamente. Os grupos 2 e 3 tiveram três subgrupos com bases em testes de concentrações: o extrato com etanol absoluto, extrato com etanol 70%, e etanol 70% e adição de ácido acético e alúmen de potássio. A análise histológica ocorreu por meio da avaliação do corte sob microscopia de luz e os resultados registrados por uma análise qualitativa dos tecidos, foi realizado também uma análise quantitativa do material. As estruturas foram escolhidas e classificadas em boa, quando permitiu apreciação suficiente de uma estrutura e ruim quando houve dificuldade na apreciação. Após a obtenção dos resultados quantitativos, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste (teste t), considerado o nível de significância de 95%. Os resultados mostraram que os extrato das cascas do cajá e do pequi, nas concentrações de 20% e 25% respectivamente em concentrações hidroalcoólicas de 70% foram capazes de gerar coloração e permitir a visualização da arquitetura dos tecidos, com o tom amarelado, principalmente do cajá, corando o citoplasma dos tecidos. O ácido acético e o alúmen de potássio não mostraram melhora na coloração. Diferentes concentrações devem ser testadas, a inclusão dos extratos com a hematoxilina também deve ser testada para verificação da usabilidade opcional dos extratos pela eosina.

Palavras-chave: Coloração e Rotulagem. Histologia. Extratos Vegetais. Anacardiaceae Malpighiales

ABSTRACT

Innovations from the exploration of natural dyes have increased considerably due to harm to human and animal health, caused by the use of synthetic dyes. In the field of histology, research is mainly aimed at discovering a natural dye substitute for eosin. Acidic plants such as cajá (*Spondias Mombin L.*) and pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*), which have a rich composition in carotenoids and are used as dyes in popular culture, may show potential coloration in biological tissues, in addition to their bark being usually discarded and few used in industry. In this perspective, the objective of this study is to obtain the dyes extracted from the bark of Pequi and Cajá, and to verify the biocompatibility of the dyes in animal tissues. An experimental study was carried out in which 5 kg of pequi peel and 5 kg of cajá were dehydrated, then the peels were crushed. After a week the material was placed in a Rotaevaporator where the mixtures of cajá and pequi powder were separated from ethanol, with tests elaborated, the best concentration for pequi extract was defined in 25% and cajá in 20%. Tissues from the heart, lung, liver and kidney from another previously approved research (506/18 CEUA-UFPI) were selected. The materials were stained in accordance with their respective group, Group 1: positive control, staining with Hematoxylin and Eosin; Group 2: tissue staining with cajá extract only; Group 3: tissue staining with pequi extract only. Groups 2 and 3 had three subgroups based on concentration tests: absolute ethanol extract, 70% ethanol extract, and 70% ethanol and addition of acetic acid and potassium alum. The histological analysis took place through the evaluation of the section under light microscopy and the results recorded by a qualitative analysis of the tissues, a quantitative analysis of the material was also carried out. The structures were chosen and classified as good, when they allowed sufficient appreciation of a structure, and bad when there was difficulty in appreciating it. After obtaining the quantitative results, the analysis of variance test (ANOVA) was applied with post-test (*t test*), considering the significance level of 95%. The results showed that the extract of the cajá and pequi peels, at concentrations of 20% and 25% respectively, at 70% hydroalcoholic concentrations were able to generate color and allow the visualization of the tissue architecture, with a yellowish tone, especially of the cajá, staining the tissue cytoplasm. Acetic acid and potassium alum showed no improvement in color. Different concentrations must be tested, the inclusion of extracts with hematoxylin must also be tested to verify the usability option of extracts by eosin.

Keywords: Coloring and Labeling. Histology. Vegetable Extracts. Anacardiaceae Malpighiales.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia com aspecto visual do fruto cajá (*Spondias mombin L*) 18
- Figura 2.** Fotografia com aspecto visual pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) 19
- Figura 3.** Fotografia dos pós obtidos das cascas dos frutos após desidratação 21
- Figura 4.** Fotografia dos Funis de decantação com a mistura de cada pó com etanol 96% 21
- Figura 5.** Fotografia do processo de separação do etanol e os extratos brutos pelo uso do rotaevaporador 22
- Figura 6.** Fotografias do processo de centrifugação dos extratos 23
- Figura 7.** Fotografias do processo de filtração dos extratos 24
- Figura 8.** Fotomicrografia de cortes do tecido pulmonar corados de acordo com os grupos experimentais 27
- Figura 9.** Pontuação dos componentes de tecido pulmonar conforme grupos 28
- Figura 10.** Fotomicrografia de cortes do tecido renal corados de acordo com os grupos experimentais 29
- Figura 11.** Fotomicrografia de túbulos renais corados de acordo com os grupos experimentais 30
- Figura 12.** Pontuação dos componentes de tecido pulmonar conforme grupos 30
- Figura 13.** Fotomicrografia de cortes do muscular estriado cardíaco corados de acordo com os grupos experimentais 31
- Figura 14.** Pontuação dos componentes de tecido pulmonar conforme grupos 32

Figura 15. Fotomicrografia de cortes do tecido hepático de acordo com os grupos experimentais

32

Figura 16. Pontuação dos componentes de tecido hepático conforme grupos

33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 Corantes: definição e histórico	12
3.2 Corantes Histológicos	13
3.3 Corantes Naturais	15
3.4 Utilização de plantas como corantes naturais histológicos	16
3.5 Cajá (<i>Spondias Mombin L.</i>)	17
3.6 Pequi (<i>Caryocar Brasiliense Camb.</i>)	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Caracterização do estudo	21
4.2 Aspectos éticos	21
4.3 Preparação do extrato	21
4.4 Amostra e preparação dos tecidos	24

4.5 Grupos experimentais	24
4.6 Método de coloração	25
4.7 Análise dos dados	25
4.8 Análise estatística	26
5 RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1	49

1 INTRODUÇÃO

Corantes são compostos orgânicos coloridos capazes de se ligarem seletivamente aos componentes do tecido (VEUTHEY; HERRERA; DODERO, 2014). São utilizados para colorir uma variedade de substratos como, por exemplo, têxteis, couro, papéis, e cabelo, nos quais são completamente ou pelo menos parcialmente solúveis (SURYAWANSHI *et al.*, 2017).

Na prática histológica existem dois tipos de corantes: os sintéticos produzidos através de reações químicas e os corantes naturais obtidos de fontes orgânicas (SAIKI; THITIPRAMOTE, 2011). Os corantes sintéticos são eficientes, mas são perigosos para a saúde humana e animal. Pesquisas indicam que, a longo prazo, o contato com esse material pode ocasionar problemas respiratórios, alergias na pele e neoplasias (AYADI *et al.*, 2016; BORDOLOI *et al.*, 2017; HASAN *et al.*, 2014).

O estudo de novos corantes naturais, ecologicamente corretos, necessita ser incentivado, além do que, como muitos países em desenvolvimento não podem mais arcar com o custo cada vez maior dos corantes sintéticos, o uso de corantes naturais e com boa relação custo-benefício é uma opção viável economicamente e ambientalmente melhor (SURYAWANSHI *et al.*, 2017).

As plantas produzem muitas cores que podem ser utilizadas como corantes naturais (SAIKI; THITIPRAMOTE, 2011). O Brasil, por possuir uma rica diversidade da flora mundial, se caracteriza como fonte incalculável de possibilidades para o uso econômico de seus elementos, capaz de gerar benefícios socioeconômicos (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2018; KOLLMANN; PEIXOTO, 2014) com o desenvolvimento de novos bioprodutos, inclusive novos corantes (ZANI *et al.*, 2013).

Dentre as potencialidades nacionais está a cajazeira (*Spondias Mombin l.*), uma árvore frutífera da família *Anacardiaceae* nativa das Américas, Ásia e África tropicais (SILVA; MARTINS; OLIVEIRA, 2009; TIBURSKI *et al.*, 2011). No Brasil é encontrado especialmente nas regiões Norte e Nordeste (BRITO *et al.*, 2018; SACRAMENTO; SOUZA, 2009).

O seu fruto denominado cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá possui um formato ovóide com mesocarpo pouco carnoso, casca fina e lisa, coloração amarelo alaranjado, com um sabor agri-doce e excelente aroma (MARTINS *et al.*, 2019; MOURA NETO *et al.*, 2015; SILVINO; SILVA; SANTOS, 2017; VALE; COSTA; MIRANDA, 2014).

O Cajá desempenha importante papel no agronegócio (BRITO *et al.*, 2018) devido às suas diversas possibilidades de uso, excelentes características nutricionais e alto potencial de processamento industrial (FREITAS *et al.*, 2017) utilizado principalmente na preparação de refrescos, sorvetes, geleias e licores (MARTINS *et al.*, 2019; MOURA NETO *et al.*, 2015).

Outra potencialidade é o pequizeiro (*Caryocar brasiliense Camb.*), uma árvore com altura de 6 a 10 m, com tronco tortuoso de 0,30 a 0,40 m de diâmetro (CARLOS *et al.*, 2014). Ocorre em vários estados brasileiros, com predominância no cerrado (MELO NETO; FERREIRA; FÜRSTENAU, 2018).

Seu fruto chamado de pequi constitui-se por um exocarpo de coloração marrom-esverdeada, mesocarpo externo formado por uma polpa branca e mesocarpo interno a porção comestível do fruto, de coloração amarelo-claro a alaranjado escuro (SILVA *et al.*, 2018). O endocarpo espinhoso do pequi protege a semente comestível, que é revestida por um tegumento fino e marrom (MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2013; SOUSA *et al.*, 2011).

O pequi possui grandes valores econômicos e de subsistência para comunidades que vivem no cerrado (SANTOS *et al.*, 2013). Eles podem ser consumidos frescos ou como geleias, licores, cremes e óleos, também são utilizados na medicina popular no tratamento de doenças respiratórias (PINTO *et al.*, 2016) ou na fabricação de produtos cosméticos (PIANOVSKI *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Ambos os frutos, pequi e cajá, possuem alta quantidade de compostos fenólicos que explicam o número de pesquisas realizadas na área farmacêutica e nutracêutica atualmente (BEMFEITO *et al.*, 2020; GEÖCZE *et al.*, 2021; MADUKA *et al.*, 2014; OLADUNJOYE *et al.*, 2021; SABIU; O'NEILL; ASHAFI, 2016). Esses frutos também apresentam altas concentrações de carotenoides principalmente em suas cascas, o que pode conferir boa coloração em tecidos (EGBUJO; ADISA; YAHAYA, 2008; KRAMELL *et al.*, 2019), algo que ainda não foi investigado na literatura.

Existem apenas menções da utilização popular da casca do pequi (CARLOS *et al.*, 2014) e casca do cajá (AYOKA *et al.*, 2008) na coloração de peças de roupas. Nesse âmbito, um estudo de investigação das potencialidades da casca do pequi e do cajá na coloração de tecidos biológicos é tecnologicamente viável, pela carência de novas descobertas na área da coloração histológica, bem como pela possibilidade do aumento no aproveitamento industrial da casca do fruto das espécies, ocasionalmente removida durante processamento e descartada como resíduo (MATTIETTO; LOPES; MENEZES,

2010; SOUZA *et al.*, 2018). Além também de uma necessidade de um produto regional natural que possa competir com os altos preços de corantes importados convencionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver corantes extraídos da casca do Pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*) e do Cajá (*Spondias Mombin l.*), e verificar a biocompatibilidade dos colorantes em tecidos animais.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da inclusão de mordente com ácido acético nos extratos na biocompatibilidade nos tecidos;
- Analisar a absorção e a distribuição dos extratos nos tecidos cardíacos, hepáticos, pulmonares e renais, assim como transformações estruturais com microscópio óptico;
- Investigar o tempo um minuto para a coloração nos tecidos biológicos em cada uma das soluções estudadas;
- Avaliar a estabilidade das cores ocasionadas pelos extratos após a análise histológica;
- Testar qual dos extratos é biocompatível com tecido investigado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Corantes: definição e histórico

Um corante pode ser descrito como uma substância colorida que possui afinidade com o substrato no qual é aplicado (SURYAWANSHI *et al.*, 2017). Esse elemento faz parte de um grupo de materiais chamados colorantes que são caracterizados por absorverem luz na região do visível a olho nu, com comprimento de onda entre 350 nm a 760 nm (PICCOLI; SCALIANTE; MACHADO, 2015; PRIETO; BUITRAGO, 2014).

Ao longo da história, os corantes foram utilizados para várias aplicações práticas, que acompanharam a evolução do *homo sapiens*, sua presença em amostras arqueológicas fornece informações cruciais sobre o modo de viver nos tempos passados (KRAMELL *et al.*, 2019; STASIAK; KOCH; GŁOWNIAK, 2014).

Antigas culturas peruanas usaram vários tipos de corantes orgânicos naturais como índigo e ácido carmínico, para criar padrões ornamentais altamente complexos em seus têxteis, revelando conhecimento de uma ampla gama de habilidades para extrair e processar corantes (STASIAK; KOCH; GŁOWNIAK, 2014). No Egito antigo, esses materiais foram utilizados para pintar os lábios e bochechas, manchar as unhas com hena, revestir os olhos e sobrancelhas, além de serem utilizados em rituais religiosos e de mumificação (CHAUDHRI; JAIN, 2014).

Na antiguidade clássica, os povos desenvolveram técnicas de uso de corantes, principalmente para tingir tecidos. Os romanos se tornaram exímios extratores de corantes de cor púrpura provenientes de moluscos do mediterrâneo. Deve-se destacar que esta técnica havia sido exaustivamente usada pelos fenícios, entretanto foram os romanos que aprimoraram a técnica de criação em cativeiro dos moluscos, extração e preparação do corante (MELLO; SUAREZ, 2012).

Nas monarquias europeias as cores das roupas eram associadas ao poder aquisitivo, as cores dos nobres eram aquelas cujos corantes eram muito difíceis de serem obtidos. Com as grandes navegações vieram novas descobertas na utilização de plantas como corantes (OLIVEIRA; MARTINS; APPELT, 2009).

Até a virada do século XIX, todos os corantes ainda eram obtidos de fontes naturais, originários de plantas, líquenes, insetos e moluscos (STASIAK; KOCH; GŁOWNIAK, 2014). Durante a revolução industrial, corantes naturais passaram a ser quimicamente sintetizados, com a descoberta da síntese de um corante, em 1856, por William Henry Perkin. Este pesquisador, tentando produzir a quinina a partir da

oxidação da alitoluidina, conseguiu obter um corante de cor púrpura, conhecido por mauveína, o qual passou rapidamente a ser produzido em larga escala (MELLO; SUAREZ, 2012).

Atualmente a produção total de corantes no mundo é estimada em 800.000 toneladas por ano (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013). Essa indústria desenvolve um importante papel na economia do mundo, visto que os corantes são utilizados em várias atividades fabris, como também no campo da saúde, onde os corantes histológicos, têm papel imprescindível no diagnóstico e patologias (STASIAK; KOCH; GŁOWNIAK, 2014).

3.2 Corantes Histológicos

Os corantes histológicos são geralmente usados para adicionar cor aos tecidos animais, vegetais, micróbios e esporos para torná-los opticamente distintos. Esta técnica de rotulagem visual é conhecida como coloração (SURYAWANSHI *et al.*, 2017).

A coloração é um processo comumente utilizado no diagnóstico médico, onde o corante é aplicado na borda posterior e anterior dos tecidos da amostra (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2016), para serem examinados visualmente as regularidades das formas celulares e distribuições teciduais, visualizando a condição das regiões celulares (HE *et al.*, 2012).

Nos estudos biológicos, a coloração é usada para marcar células e sinalizar ácidos nucleicos, proteínas ou a eletroforese em gel para auxiliar no exame microscópico. Em alguns casos, vários métodos de coloração múltipla são usados, como coloração diferencial, dupla coloração ou a coloração múltipla (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2016).

Nesse âmbito, a coloração tem sido amplamente utilizada em histopatologia e pesquisas para fornecer informações valiosas sobre estruturas celulares e morfológicas dos tecidos, não apenas por ser de fácil execução, mas também por seu custo econômico relativamente baixo (SURYAWANSHI *et al.*, 2017; VEUTHEY; HERRERA; DODERO, 2014).

O diagnóstico de muitas doenças, especialmente oncológicas, depende da avaliação de cortes histológicos por um patologista (HE *et al.*, 2012; KUMAR; SRIVASTAV; SRIVASTAVA, 2015). Na pesquisa básica e translacional, a interpretação das seções histológicas é a base para as conclusões científicas. A precisão e a eficiência desse processo de diagnóstico visual são determinadas por vários fatores (ARÉVOLA; CRUZ-ROA, 2014; BRUNYÉ *et al.*, 2017).

Quatro desses fatores são comumente considerados: primeiro, a amostra de tecido original deve obedecer a certos padrões e, então, os procedimentos de fixação e coloração devem ser padronizados e otimizados, constituindo assim o segundo fator. Terceiro, são consideradas as propriedades ópticas do microscópio de diagnóstico, as características da aquisição da imagem e o armazenamento de dados que devem ser calibrados para obter uma quantidade máxima de informações. Por fim, para patologia digital, a calibração do monitor pode afetar a eficácia diagnóstica (KATHER *et al.*, 2015; RASMUSSEN; RUDBECK, 2015; TAYLOR; LEVENSON, 2006).

Ao contrário da imuno-histoquímica, o corante histológico, não utiliza anticorpos para identificar moléculas específicas e, portanto, não possui a especificidade inerente de uma interação antígeno-anticorpo (SAIKI; THITIPRAMOTE, 2011; VEUTHEY; HERRERA; DODERO, 2014).

Na histologia moderna, uma combinação de diferentes técnicas de coloração é usada para melhorar a eficácia do processo de coloração. Como uma forma de melhorar as manchas histológicas, várias manchas foram modificadas e combinadas com outras para melhorar sua eficácia (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2016).

Grande parte dos corantes histológicos são obtidos com base em tecnologias químicas de produção industrial, concentradas principalmente em países industrializados. (ISHUNINA; MOSPANOVA; ARKHIPOVA, 2017). A coloração nuclear mais procurada, a hematoxilina, é obtida da árvore nativa da América central *Haematoxylon campechianum*; é um exemplo de um corante natural que é amplamente utilizado (DAPSON; HOROBIN; KIERNAN, 2010).

De forma adversa, a eosina, seu contra-corante é um corante sintético, resumidamente a combinação de hematoxilina e eosina fornecem aos tecidos cores em azul escuro para núcleos e rosa ou laranja para o citoplasma (CARDIFF; MILLER; MUNN, 2014).

A eosina pertence ao grupo xanteno, estes corantes não são apenas eficientes, mas também têm efeitos deletérios que são perigosos para a saúde humana e animal (SURYAWANSHI *et al.*, 2017). Além do que, a exposição frequente a esses produtos químicos afeta a saúde do trabalhador de laboratório (SUDHAKARAN; HALLIKERI; BABU, 2018).

A crescente percepção de que alguns corantes sintéticos histológicos podem ser prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, tem levado ao crescente interesse na busca por substâncias naturais produtoras de corantes (FAN *et al.*, 2018; SHAKERI *et al.*, 2018).

Além disso, devido à grave ameaça da globalização ecológica, degradação ambiental e homogeneização cultural, é crucial pesquisar novas utilizações de plantas, e para preservar os *habitats naturels* das plantas, especialmente onde as mesmas ainda não estão completamente extintas.

3.3 Corantes Naturais

Corantes naturais têm sido usados em quase todas as culturas e quase todos os períodos, em muitos itens do cotidiano, incluindo alimentos, cosméticos e decoração. (KRAMELL *et al.*, 2019). Antes da descoberta de corantes sintéticos, os colorantes obtidos de plantas eram utilizados em abundância em todo o mundo, posteriormente foram substituídos gradualmente (FAN *et al.*, 2018; HASAN *et al.*, 2014; SHAKERI *et al.*, 2018).

Entretanto, no início do século XXI, principalmente devido ao crescente interesse da opinião pública acerca da segurança dos corantes sintéticos, unidos a inquirições de sustentabilidade, os pigmentos extraídos de fontes naturais estão voltando a assumir um papel importante (CAI; SUN; CORKE, 2005; YUSUF; SHABBIR; MOHAMMAD, 2017; WATHON *et al.*, 2019).

Os corantes naturais podem ser obtidos de plantas, animais ou insetos e podem ser classificados em três grupos principais: os heterociclos, com estrutura tetrapirrólica, que compreende as clorofilas presentes em vegetais, o heme e as bilinas encontradas em animais (SENGE *et al.*, 2014); o segundo grupo é composto pelas substâncias de estrutura isoprenóides, representadas pelos carotenoides, encontrados em animais e principalmente em vegetais (LANGI *et al.*, 2018). No terceiro, estão os heterociclos contendo oxigênio, como os flavonóides, que são encontrados exclusivamente em vegetais (ASIF; KHODADADI, 2013).

Existem ainda outros dois grupos de corantes: as betalaínas, que são compostos nitrogenados, pigmentos vacuolares e atóxicos que substituem as antocianinas em algumas plantas e fungos (CAI; SUN; CORKE, 2005), e os taninos, que são polifenóis, encontrados geralmente na parte externa de várias plantas, funcionando como um mecanismo de defesa contra pragas e predadores (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006).

Alguns corantes naturais além de dar tons únicos e elegantes também fornecem proteção a raios Ultravioletas (UV), antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória fluorescente e funções repelentes de insetos a fibras e tecidos (MORAGA *et al.*, 2013; RATHER *et al.*, 2017; SAIVARAJ; CHANDRAMOHAN, 2018).

A proteção a raios UV ocasionou uma série de estudos e desenvolvimento de tecnologias relacionadas a corantes naturais como fotossensibilizadores em células solares (MAIAUGREE *et al.*, 2015; KUMARA *et al.*, 2017; RICHHARIYA *et al.*, 2017; SHALINI *et al.*, 2015). Os pigmentos vegetais exibem estrutura eletrônica que interage com a luz solar e altera os comprimentos de onda que são transmitidos ou refletidos pelo tecido da planta (SHALINI *et al.* 2015). Este processo leva à ocorrência de pigmentação da planta, no qual cada pigmento é descrito a partir do comprimento de onda da absorvância máxima (λ_{max}) e da cor percebida pelos seres humanos (RICHHARIYA *et al.*, 2017; SHALINI *et al.* 2015).

Seus efeitos benéficos à saúde (quando ingeridos ou em contato com o corpo humano) relacionados às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, proporcionaram também recentemente uma designação de pesquisas e desenvolvimento de tecnologias nas áreas biociências e biotecnologia (ADEEL *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2015; TULI *et al.*, 2015), principalmente na designação de corantes a base de plantas no campo da histologia (EGBUJO; ADISA; YAHAYA, 2008; PERIS *et al.*, 2013; SURYAWANSHI *et al.*, 2017).

3.4 Utilização de plantas como corantes naturais histológicos

Após muitas controvérsias, o uso de plantas medicinais começa a ter apoio científico em todos os recantos do planeta. O Brasil e outros países, com apoio da Organização Mundial de Saúde, começaram a resgatar a medicina popular, em que o estudo das plantas medicinais ressurgiu, muitas delas têm uso milenar (BEZERRA *et al.*, 2015).

Tendo em vista que o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo e um dos que mais produzem resíduos agroindustriais, vêm crescendo a busca de alternativas para a utilização da matéria orgânica gerada, sendo a produção de corantes naturais uma possível alternativa (BATAGLION *et al.*, 2015).

Corantes naturais à base de plantas são amplamente utilizados em histopatologia, como por exemplo o carmin e hematoxilina (ALTURKISTANI; TASHKANDI; MOHAMMEDSALEH, 2016). A combinação hematoxilina-eosina, é a coloração mais utilizada na histologia. Em decorrência da eosina ser um produto sintético vários estudos estão sendo realizados com plantas naturais de modo a encontrar resultados satisfatórios comparados ao corante sintético (EGBUJO; ADISA; YAHAYA, 2008; PERIS *et al.*, 2013; SUDHAKARAN; HALLIKERI; BABU, 2018; SURYAWANSHI *et al.*, 2017).

Sudhakaran, Hallikeri e Babu (2018) pesquisaram sobre a eficácia dos extratos do gengibre (*Zingiber officinale*) e açafrão (*Curcuma longa*) como corantes histológicos em tecidos biológicos, confrontando nível de intensidade na coloração e especificidade. Foi observado que o gengibre apresentou boa intensidade de coloração e especificidade ao citoplasma do tendão de ratos, dessa forma os autores concluíram que o extrato do gengibre se mostrou próximo ao desfecho da eosina na literatura e rotina médica.

Em outro estudo realizado com extrato de *Hibisco sabdariffa* foi investigado sua ação como colorante celular substituto para hematoxilina e eosina na morfologia da pele e tecido conjuntivo. Os resultados mostram uma coloração nitroso-azulada com aparência citoplasmática rosa-claro comparável à coloração de rotina (hematoxilina-eosina) para a morfologia da pele e tecido conjuntivo (AGBEDE *et al.*, 2017).

A inclusão de plantas na investigação ocorre na composição fotoquímica do fruto, especialmente pelas substâncias antocianinas e carotenoides. As antocianinas são derivadas de sais flavílicos, solúveis em água, que na natureza estão associados a moléculas de açúcar, responsáveis por uma variedade de cores atrativas de frutas, flores e folhas que variam do vermelho ao azul (WALLACE; GIUSTI, 2015; SMERIGLIO *et al.*, 2016).

Os carotenoides são abundantes em diversas frutas dos biomas brasileiros, como a laranja, limão, tangerina, uva, pêssego entre outras (BOUKROUFA; BOUTEKEDJIRET; CHEMAT; 2017; MURGA *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2019). São substâncias químicas tetraterpênicas que compreendem pigmentos amplamente difundidos na natureza, responsáveis pelas cores laranja, amarela e vermelha das frutas e hortaliças (NISAR *et al.*, 2015; SAINI; KEUM, 2018).

3.5 Cajá (*Spondias Mombin L.*)

O gênero *Spondia* pertencente à família *Anacardiaceae* (ordem: *Sapindales*), compreende cerca de 20 espécies e tem importância econômica, ecológica e social, pois certas espécies são utilizadas na agricultura e na indústria para alimentação humana e animal.

Algumas espécies ocorrem no Brasil (SANTOS; ALMEIDA, 2019), como a cajazeira (*Spondias Mombin L.*), uma árvore ereta decídua, que cresce até 15 a 20 m de altura, com um tronco de 60 a 75 cm de largura. Pode ser encontrada em outros locais das Américas tropicais, Índias Ocidentais, partes da África e na Ásia tropical (AWOGBINDIN, *et al.*, 2014; NWIDU *et al.*, 2018).

O seu fruto é conhecido na região nordeste do Brasil principalmente pelo nome de cajá, apresenta a forma ovóide com 3 e 5 cm de comprimento, oblonga e plana na base, tendo casca fina e lisa, com uma cor amarelo-laranja (Figura 1), com sabor ácido e tem uma grande semente fibrosa branca (FREITAS *et al.*, 2018; LOURENÇO *et al.*, 2018).



Figura 1. Fotografia com aspecto visual do fruto cajá (*Spondias Mombin* l).

Fonte: Fadimu, Idowu e Ipinlaye (2014).

O cajá é um fruto sazonal e perecível, que, apesar de ser consumido cru, precisa ser processado em produtos industriais como geleias de frutas, sucos ou sorvetes, são encontrados durante todo o ano (CARVALHO *et al.*, 2019).

O crescimento dos frutos é caracterizado pela rápida divisão e alongamento, com um aumento irreversível de peso, diâmetro, e comprimento, que são influenciados por fatores genéticos e ambientais, como temperatura, radiação solar e precipitação. No final da maturação, ocorre mudanças nas características nutricionais e sensoriais, como mudanças na cor, textura, sabor e aroma, transformando-os em produtos aceitáveis e produtos comercialmente atraentes (SILVA *et al.*, 2018).

Todas as partes da fruta são relatadas como úteis e ricas em beta-criptoxantina, luteína, flavonóides e compostos fenólicos. O extrato de sua polpa e casca mostrou efeitos anti-inflamatórios em um estudo experimental com a diminuição de células inflamatórias e edemas (LOURENÇO *et al.*, 2018).

A sua casca, que corresponde a 10-15% da fruta, apresenta grande quantidade de compostos fenólicos e carotenoides, tendo sido alvo de investigação por pesquisadores na verificação de propriedades antioxidantes. (FREITAS *et al.*, 2018; MITCHELL; DALY, 2015).

Todavia, por melhor que seja o método da extração das cascas aplicado pelas indústrias na produção de produtos secundários do cajá, sempre são observadas perdas

nutricionais devido à remoção da casca no processamento, uma vez que os carotenoides se concentram em camadas mais externas (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010).

Durante o processamento, a casca desintegra-se pelo atrito das escovas entre o fruto e a peneira, e é descartada como resíduo, sem valor comercial, além de apresentar custos para seu descarte e ser potencialmente um causador de prejuízos ao meio ambiente (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010). Por conter sete tipos de carotenoides, esse resíduo pode ser transformado em ingredientes para utilização e aproveitamento em outros ramos da indústria como alimentícia, farmacêutica e de corantes (GIUFFRIDA *et al.*, 2015).

3.6 Pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*)

O fruto do pequizeiro (*Caryocar Brasiliense Camb.*), conhecido popularmente como, pequi, pequiá, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, é encontrado em todo o cerrado brasileiro (DAMIANI *et al.*, 2013). Sua frutificação ocorre de setembro a fevereiro nas áreas que compreendem o cerrado (VERA *et al.*, 2005).

A produção é maior em períodos de seca e, na presença de chuvas, há irregularidade de frutificação (LIMA *et al.*, 2007). O fruto é constituído pelo exocarpo ou pericarpo de coloração esverdeada ou marrom esverdeada, o endocarpo, que é espinhoso, protege a semente, ou amêndoa, que é revestida por uma polpa de cor intensa, que varia de amarelo-claro para laranja-escuro (Figura 2) (GEÖCZE *et al.*, 2013).

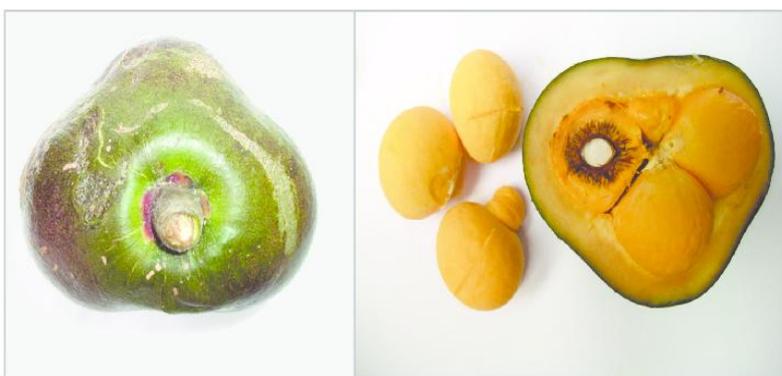


Figura 2. Fotografia com aspecto visual pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*).

Legenda: A. Epicarpo. B. Fruto cortado, possível ver a região endocarpo e epicarpo.

Fonte: Cardoso *et al.* (2013).

O consumo e o uso do pequi ainda estão restritos à população local do cerrado, onde é explorado, na sua grande maioria, provenientes de atividade extrativista (MOURA; CHAVES; NAVES, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2012). Não climatéricos, o fruto

apresenta uma atividade respiratória extremamente alta que diminui durante o seu amadurecimento, assim como diminui a produção de etileno (ALMEIDA *et al.*, 2019).

O pequi apresenta alto valor energético e nutricional, por ser fonte de lipídios, proteínas, vitaminas A (β -caroteno) e C, e sais minerais, o que o torna importante na alimentação das populações da região do cerrado (RODRIGUES *et al.*, 2009). Apresenta propriedades sensoriais, como cor, aroma, sabor diferenciados e muito agradáveis, amplamente utilizado como ingrediente básico na elaboração de pratos típicos da culinária regional. Além de servir de matéria-prima para agroindústrias regionais de conservas, temperos, licores e congelados (FERREIRA *et al.*, 2009).

Durante o processamento do pequi, a casca é removida para acessar o interior comercialmente valioso, o que gera uma quantidade excessiva de resíduos e contamina o ambiente. Esse desperdício poderia ser evitado, se tais fossem utilizados para outros fins (RESENDE; TERRONES; RESENDE, 2011; SOUZA *et al.*, 2018).

Curiosamente, esteróides, triterpenos, flavonóides, taninos e saponinas foram identificados nas cascas de pequi (RESENDE; TERRONES; RESENDE, 2011; SOUZA *et al.*, 2018). Biazotto *et al.* (2019) investigaram compostos bioativos de frutas brasileiras subaproveitadas, encontraram que o maior teor de carotenoides foi registrado no pequi com total de 36 (10,156.21 μ g/100g), superior a todas as frutas investigadas.

Portanto, o aproveitamento estratégico da casca do pequi é necessário, visto a quantidade de princípios ativos, principalmente carotenoides em relação a outras plantas. Recentemente pesquisas mostram a utilização da casca como ração para coloração de gema em aves (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e para tingimento artesanal (SILVA NETO; COSTA, 2010). Contudo, o campo de corantes e tinturas a partir da casca do pequi segue subexplorado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do estudo

Estudo experimental com abordagem qualitativa e quantitativa do tipo transversal.

4.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram iniciados somente após o parecer favorável emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), comprometendo-se a contemplar as normas éticas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei nº 11.794, de 8/10/08, Lei nº 9.605, de 12/02/98 e Resolução normativa nº 38, de 17/04/18). Para a realização deste estudo, os animais utilizados foram provenientes de outra pesquisa realizada anteriormente e aprovada no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí sob o número de parecer 506/18 CEUA-UFPI (anexo 1).

4.3 Preparação do extrato

Cinco quilos das cascas do pequi e cinco quilos das cascas do cajá adquiridos em um mercado do Estado do Piauí, na cidade de Teresina foram desidratados na estufa à 60° C por 4 dias. Após a desidratação, as cascas foram trituradas no liquidificador Philco Double Inox 900W com copo metálico para obtenção do pó (Figura 3). Após este processo, o material foi levado para o funil de decantação, onde cada pó foi misturado com etanol absoluto em proporção de 1:1, 1:2, 1:4 (Figura 4).



Figura 3. Fotografia dos pós obtidos das cascas dos frutos após desidratação.
Legenda: A: pó do cajá, B: pó do pequi.

Fonte: Laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia/CCS – UFPI.



Figura 4. Fotografia dos Funis de decantação com a mistura de cada pó com etanol 96%. **Legenda:** Seta vermelha indica mistura entre o etanol e pó do cajá; a seta amarela indica mistura entre etanol e pó do pequi.

Fonte: Laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia/CCS – UFPI.

Após uma semana o material foi colocado em um Rotaevaporador a 100°C com pressão de 600 mmHg onde as misturas do pó do cajá e do pequi foram separadas do etanol em um processo de evaporação (Figura 5) para obtenção do extrato bruto.



Figura 5. Fotografia do processo de separação do etanol e os extratos brutos pelo uso do rotaevaporador.

Legenda: Extrato do cajá (A) e extrato do pequi (B).

Fonte: Laboratório de Análises clínicas do Departamento de Farmácia – UFPI.

Com base em levantamento da literatura sobre alguns corantes à base de plantas naturais (EGBUJO; ADISA; YAHAYA, 2008; PERIS *et al.*, 2013; SURYAWANSHI *et al.*, 2017), as concentrações dos extratos 5, 10, 20 e 80 g de cada extrato foi dissolvido em volume final de 100 ml de etanol absoluto, 100 ml de fração volumétrica hidroalcoólica em 70 %, 100 ml fração volumétrica hidroalcoólica em 70% com ácido acético (gradual para manter o pH das soluções em 5) e alúmen de potássio para funcionar como mordente na concentração de 1%. Separadamente para fazer as concentrações de 0,05, 0,1, 0,2 g e 0,8g / ml (10%, 20%, 25%, 80%; p/v), respectivamente. Com testes piloto elaborados a melhor concentração para extrato do pequi foi em 25% e do cajá em 20%.

Para mistura do ácido acético e alúmen de potássio as soluções foram utilizadas uma centrífuga de laboratório, para possibilitar maior homogeneidade das colorações. A velocidade foi ajustada em 2000 rpm com tempo de centrifugação de 10 minutos (Figura 6).



Figura 6. Fotografias do processo de centrifugação dos extratos.

Legenda: A - Centrífuga para mistura de soluções com ácido acético e alúmen de potássio. B - Tubos com solução misturada ácido acético e alúmen de potássio.

Fonte: Laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia/CCS – UFPI.

Todas as soluções foram filtradas por papel de filtro *Whatman* e armazenados (Figura 7). O pH de todas as soluções foi aferido com Phmetro Medidor de bancada, com faixa pH 0-14 e com braço articulado.



Figura 7. Fotografias do processo de filtração dos extratos.

Legenda: A. Solução filtrada com papel filtro Whatman. B. Armazenamento dos extratos em frasco de vidro Âmbar.

Fonte: Laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia/CCS – UFPI.

4.4 Amostra e preparação dos tecidos

Foram selecionados os seguintes tecidos para essa pesquisa: rim, fígado, pulmão, coração de camundongod BALBC acondicionados em frascos contendo formol a 10% no laboratório de Histotécnicas do Departamento de Morfologia/CCS – UFPI, provenientes de outra pesquisa 506/18 CEUA- UFPI.

Após retirada dos órgãos dos frascos cada peça foi desidratada em etanol com porcentagens crescentes (50%, 70%, 80%, 90%) por períodos de 1h e finalmente em etanol absoluto 100% durante 8h. Após a desidratação a peça foi diafanizada em xilol, permanecendo em parafina por 4h em estufa a 58°C para, então, ser emblocada para a realização dos cortes histológicos. Posteriormente foram realizados cortes semi-seriados com 5µm de espessura em um micrótomo distendidos em água a 45°C e pescados em lâminas albuminizadas, no qual cada lâmina foi corada em consonância com seu respectivo grupo.

4.5 Grupos experimentais

- Grupo 1: controle positivo, coloração com Hematoxilina e eosina;
- Grupo 2: coloração dos tecidos com o extrato do cajá (25%) unicamente;
- Grupo 3: coloração dos tecidos com o extrato do pequi (20%) unicamente.

Os grupos 2 e 3 tiveram três subgrupos com bases em testes de concentrações. Dessa forma, os grupos 2A e 3A foi utilizado o extrato com etanol absoluto, os grupos 2B e 2B foi usado o extrato com etanol 70%, e grupos 2C e 3C com etanol 70% e adição de ácido acético e alúmen de potássio conforme quadro 1.

Grupo	subgrupos		
Grupo 1	G1 – controle positivo		
Grupo 2 (cajá)	G2A - extrato em etanol absoluto	G2B - extrato em etanol 70%	G2C - extrato com etanol 70% e adição de ácido acético e alúmen de potássio
Grupo 3 (pequi)	G3A - extrato em etanol absoluto	G3B - extrato em etanol 70%	G3C - extrato com etanol 70% e adição de ácido acético e alúmen de potássio

4.6 Método de coloração

As secções foram desparafinadas em 3 frações de xilol e hidratadas através de soluções graduadas de álcool (100%, 90%, 80% e 70%). Posteriormente, foram lavados em água corrente por 1 minuto, e corados em consonância com seu grupo, em seguida, as lâminas foram mergulhadas em água destilada (10 vezes).

O tempo de imersão das lâminas nos extratos foi de 1 min. Posteriormente as secções foram desidratadas em graus ascendentes de álcool, clareadas em xilol e montadas em um composto de montagem sintética. Durante todo método de coloração foi mantido temperatura ambiente dentro da faixa de 25° C a 30° C.

4.7 Análise dos dados

O material foi examinado em microscópio trinocular com objetivas planacromáticas e com uma câmera digital resolução de 2592 x 1944 pixels acoplada ao microscópio, que realizou a captura das imagens. As fotomicrografias foram obtidas em aumento de 100X e 400X.

A análise histológica ocorreu por meio da avaliação do corte sob microscopia de luz e os resultados registrados por uma análise qualitativa dos tecidos em coloração, com auxílio do *software* Leica Application Suite Image®, com análise da morfologia dos tecidos conforme é descrito na literatura (KUŞÇULU; ASLAN, 2019).

Foi realizado também uma análise quantitativa do material, no qual 5 áreas de 3 lâminas foram analisadas em cada grupo com respectivo tecido investigado. As estruturas foram escolhidas e classificadas em boa (pontuação 1), quando permitiu apreciação suficiente de uma estrutura de tecido; e ruim (pontuação 0) quando houve dificuldade na apreciação ou não foi possível identificar uma estrutura de tecido particular.

As estruturas escolhidas são referidas a seguir:

Quadro 2. Componentes selecionados dos tecidos para análise histológica.

Tecido	Componente selecionados			
Pulmão	Arquitetura em geral do tecido	Bronquíolos	Alvéolos	Ducto alveolar
Rim	Arquitetura em geral do tecido	Glomérulos	Túbulos contorcidos	Cápsula de Bowman
Fígado	Arquitetura em geral do tecido	Capilares sinusóides	Espaço de disse	Hepatócitos
Coração	Arquitetura em geral do tecido	Núcleo da fibra	Discos intercalares	Disposição das fibras

4.8 Análise estatística

Após a obtenção dos resultados quantitativos, os dados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação e à distribuição amostral com o teste *Shapiro-Wilk*, seguido teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste (teste t). Foi considerado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$), utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1.

5 RESULTADOS

Com a obtenção dos extratos pelo método descrito acima, os compostos apresentaram o pH em média de 4,6 no cajá, e 4,9 no pequi, o que mostra um pH levemente ácido. Em todas as colorações utilizadas foi possível observar a arquitetura do tecido pulmonar utilizado, embora os extratos dos frutos com etanol bruto, tenham apresentado maior dificuldade de visualização de estruturas, como é possível ver na Figura 8, através do lúmen do bronquíolo.

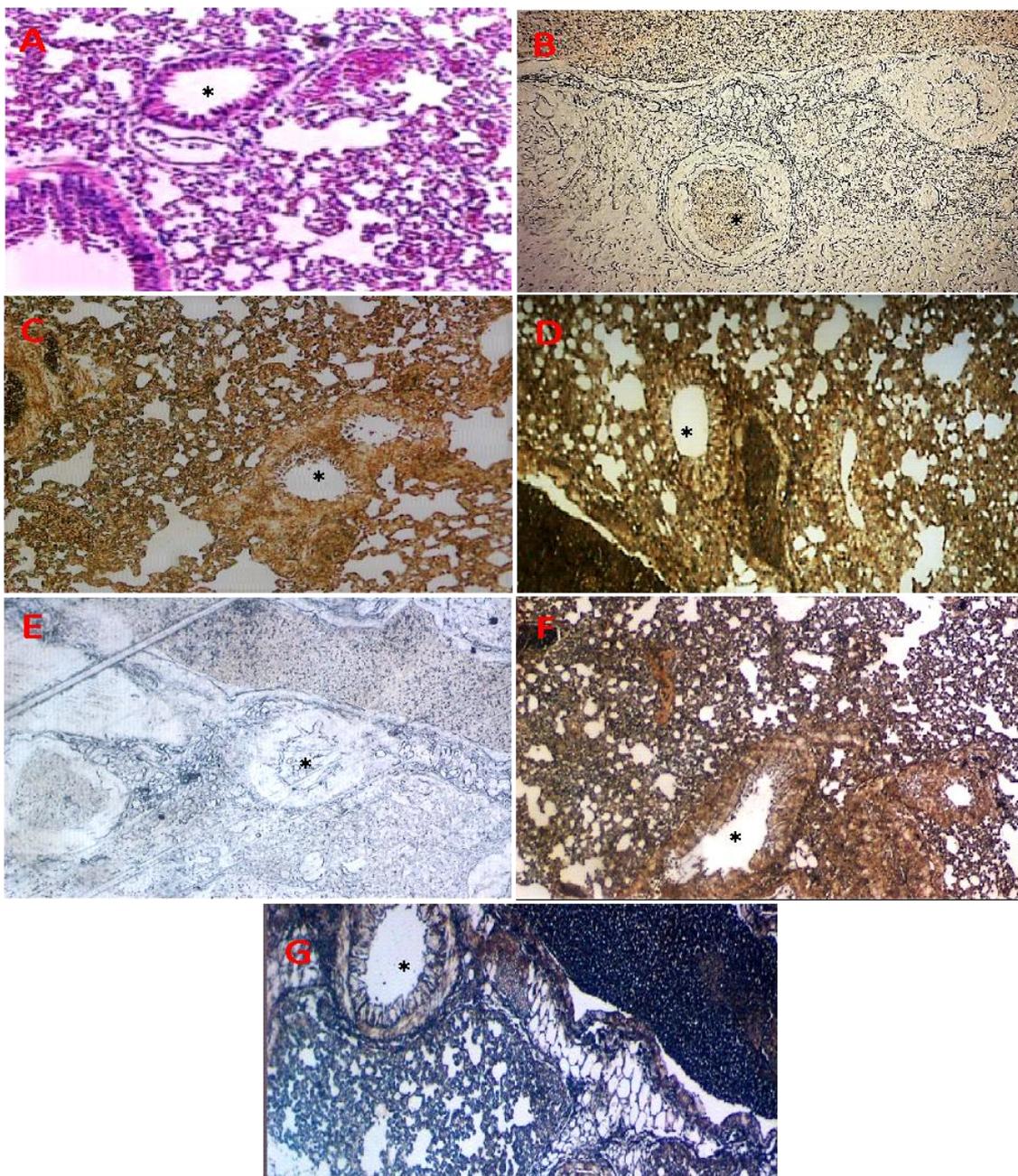


Figura 8. Fotomicrografia de cortes do tecido pulmonar corados de acordo com os grupos experimentais. **Legenda:** A - coloração do com hematoxilina e eosina (G1). B - Coloração do extrato do cajá em etanol absoluto (G2A). C - Coloração G2B do extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70% (G2B). D - Coloração do cajá com adição de ácido acético e alúmen de potássio (G2C). E - Coloração do pequi em etanol absoluto (G3A). F - Coloração do pequi em solução hidroalcoólica em 70% (G2C). G - Coloração do pequi com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica o lúmen do bronquíolo. Aumento em 400x. em etanol absoluto

Nos grupos G2B e G3B, houve melhor qualidade de coloração em tons de mais forte do amarelo no epitélio cúbico do bronquíolo. A adição de alúmen de potássio e ácido acético não resultou em melhorias da imagem, entretanto resultou uma coloração

marrom-azulada nas estruturas do tecido pulmonar, descaracterizando a coloração inicial buscada.

Assim como é verificado nas fotomicrografias, na análise estatística os resultados foram uniformes. A pontuação dos extratos hidroalcoólicos em 70 % do pequi e cajá, revelaram valores próximos aos da hematoxilina e eosina. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 9).

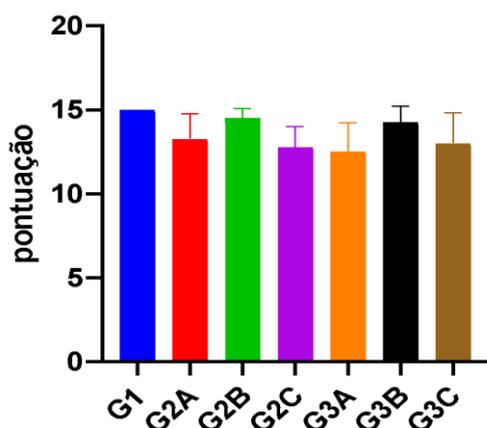


Figura 9. Pontuação dos componentes de tecido pulmonar conforme grupos. **Legenda:** G1 – Hematoxilina e eosina. G2A - extrato do cajá em etanol absoluto. G2B - extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70%. G2C - extrato do cajá em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. G3A - extrato do pequi em solução hidroalcoólica em 70%. G3B - extrato do pequi em etanol absoluto. G3C - extrato do pequi em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica $p < 0,05$ pelo teste t.

Na coloração dos glomérulos e túbulos contorcidos do tecido renal houve biocompatibilidade da coloração. A cor gerada pelo extrato do cajá foi amarelada e opaca, enquanto a do pequi mostrou aspecto amarelo esverdeado. Mesmo em etanol absoluto foi possível identificar glomérulos e túbulos no tecido, com menor qualidade (Figura 10).

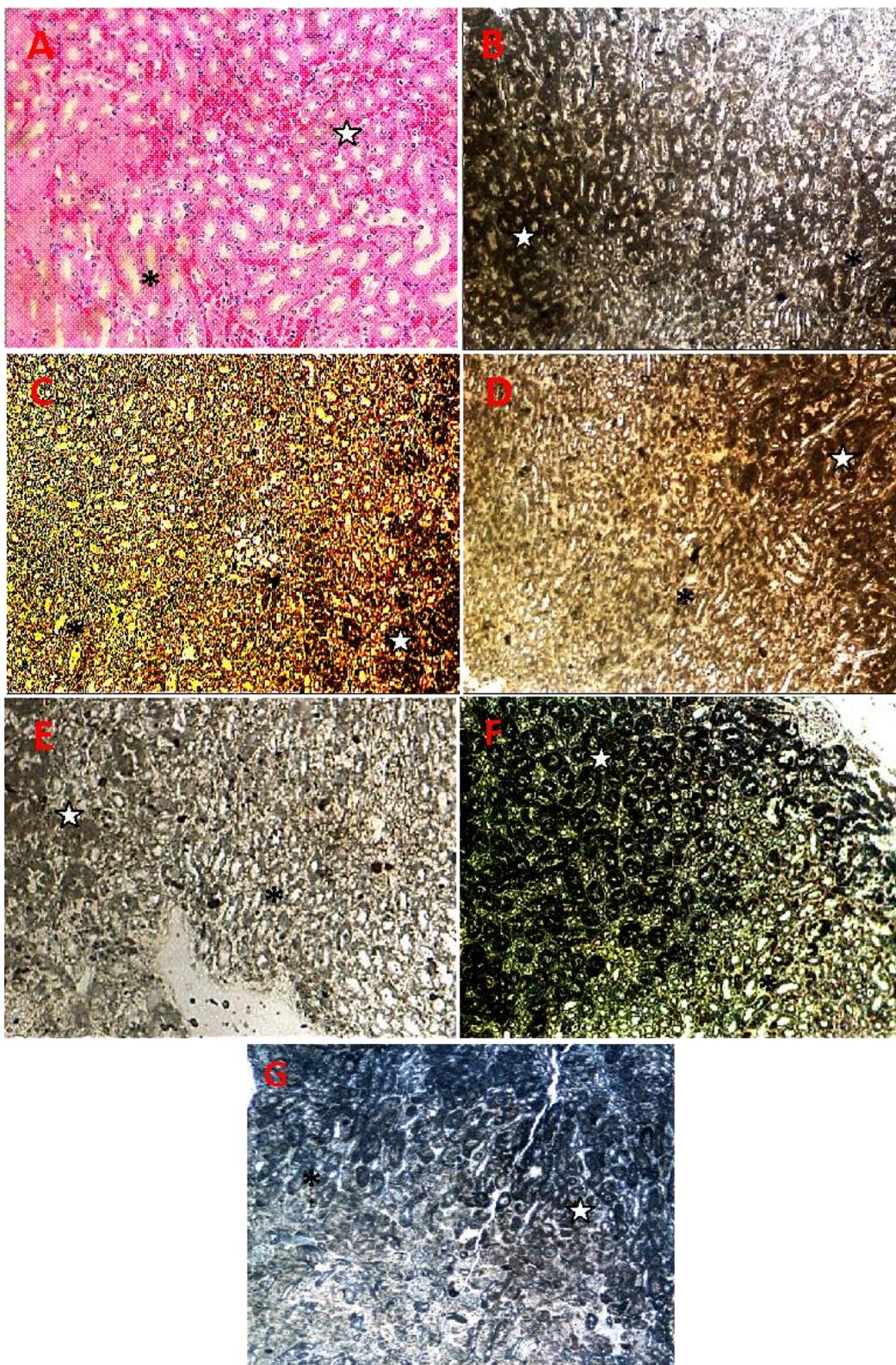


Figura 10. Fotomicrografia de cortes do tecido renal corados de acordo com os grupos experimentais. **Legenda:** Legenda: A - coloração do com hematoxilina e eosina (G1). B - Coloração do extrato do cajá em etanol absoluto (G2A). C - Coloração G2B do extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70% (G2B). D - Coloração do cajá com adição de ácido acético e alúmen de potássio (G2C). E - Coloração do pequi em etanol absoluto (G3A). F - Coloração do pequi em solução hidroalcoólica em 70% (G2C). G - Coloração do pequi com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica tubos contorcidos. Estrela indica glomérulos. Aumento em 100x.

Na imagem ampliada de túbulos renais distais e proximais, dos extratos em fração hidroalcoólica 70%, é possível verificar mitocôndrias, nessa ampliação é possível observar a persistência coloração do tom amarelo do cajá. No pequi existe um maior desarranjo dos túbulos (Figura 11).

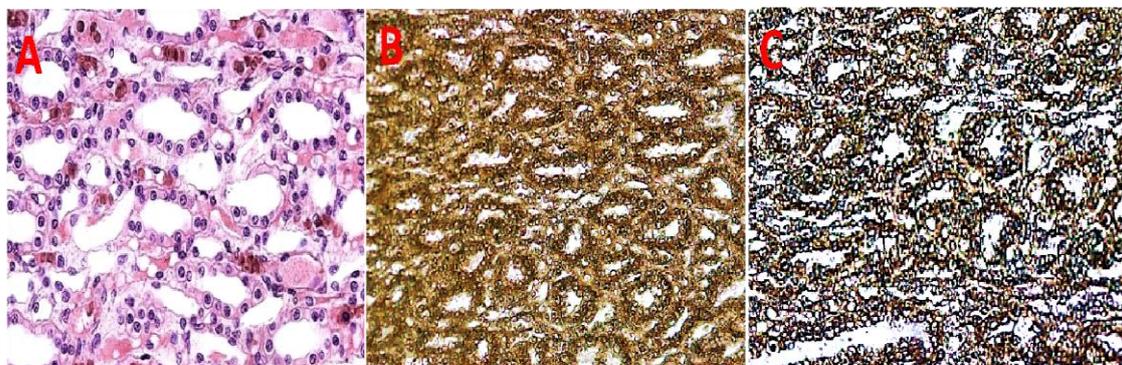


Figura 11. Fotomicrografia de túbulos renais corados de acordo com os grupos experimentais. **Legenda:** A - coloração do com hematoxilina e eosina (G1). B - Coloração do extrato do cajá em solução com etanol absoluto (G2A). C - Coloração B do extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70% (G2B). D - Coloração do pequi em solução hidroalcoólica em 70% (G3B). Aumento em 400x.

Na comparação estatística houve diferença significativa entre G1 e G2A e G3A, além disso G2B e G2C apresentaram pontuações maiores significativamente em comparação ao G2A (Figura 12). O que releva boa qualidade na coloração ocasionada pelo G2B e G3 e pior qualidade do G2A.

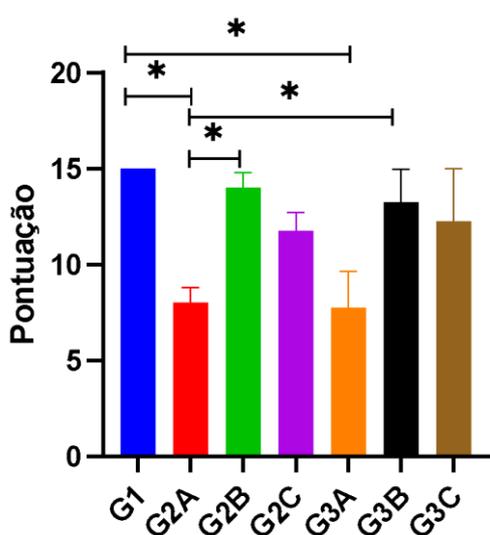


Figura 12. Pontuação dos componentes de tecido renal conforme grupos. **Legenda:** G1 – Hematoxilina e eosina. G2A - extrato do cajá em etanol absoluto. G2B - extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70%. G2C - extrato do cajá em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. G3A - extrato do

pequi em solução hidroalcoólica em 70%. G3B - extrato do pequi em etanol absoluto. G3C - extrato do pequi em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica $p < 0,05$ pelo teste t

O músculo estriado cardíaco é mostrado na figura 13 O G2B apresentou tom de marrom-amarelado mais forte em relação a outras colorações. A dificuldade em identificar núcleos de discos intercalares foi comum em todos os grupos de colorações experimentais.

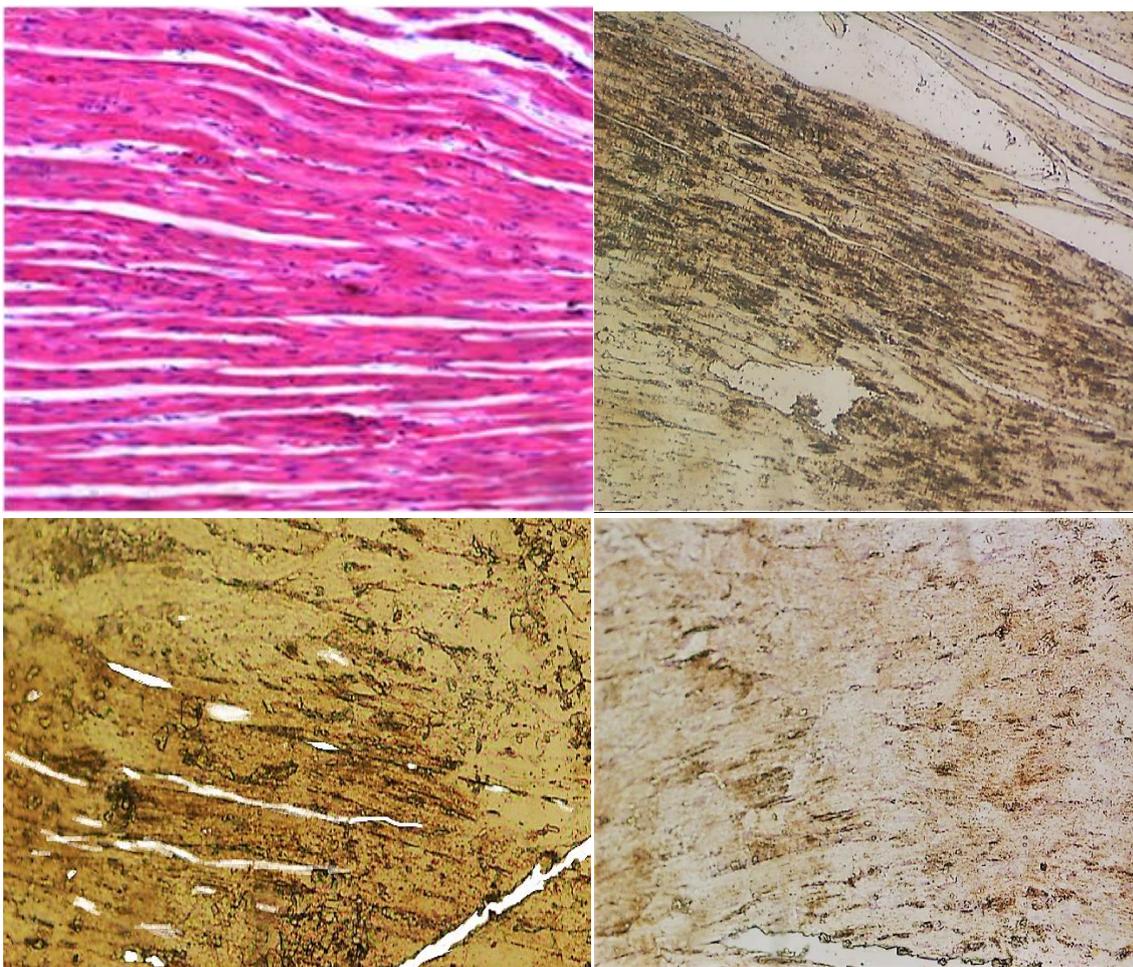


Figura 13. Fotomicrografia de cortes do muscular estriado cardíaco corados de acordo com os grupos experimentais. **Legenda:** A - coloração do com hematoxilina e eosina (G1). B - Coloração do extrato do pequi em solução hidroalcoólica em 70% (G2B). C - Coloração G2B do extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70% (G3B). D - Coloração do pequi com adição de ácido acético e alúmen de potássio (G3C). Aumento em 400x.

Na figura 14 foi verificado diferença significativa entre a G1 e G2A ($p < 0,05$). Nas demais comparações não houve diferença significativa. Novamente os valores do G2B e G3B bem próximos aos valores do grupo controle.

Na visualização da veia centrolobular para análise do tecido hepático, o grupo G2B mostrou coloração em tom mais amarelo, no G3B um marrom-amarelado. Com etanol absoluto a coloração ficou em escuro com menor biocompatibilidade.

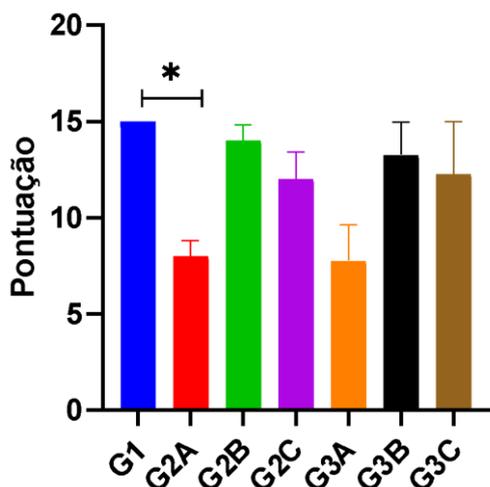


Figura 14. Pontuação dos componentes de tecido muscular cardíaco conforme grupos. **Legenda:** G1 – Hematoxilina e eosina. G2A - extrato do cajá em etanol absoluto. G2B - extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70%. G2C - extrato do cajá em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. G3A - extrato do pequi em solução hidroalcoólica em 70%. G3B - extrato do pequi em etanol absoluto. G3C - extrato do pequi em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica $p < 0,05$ pelo teste t.

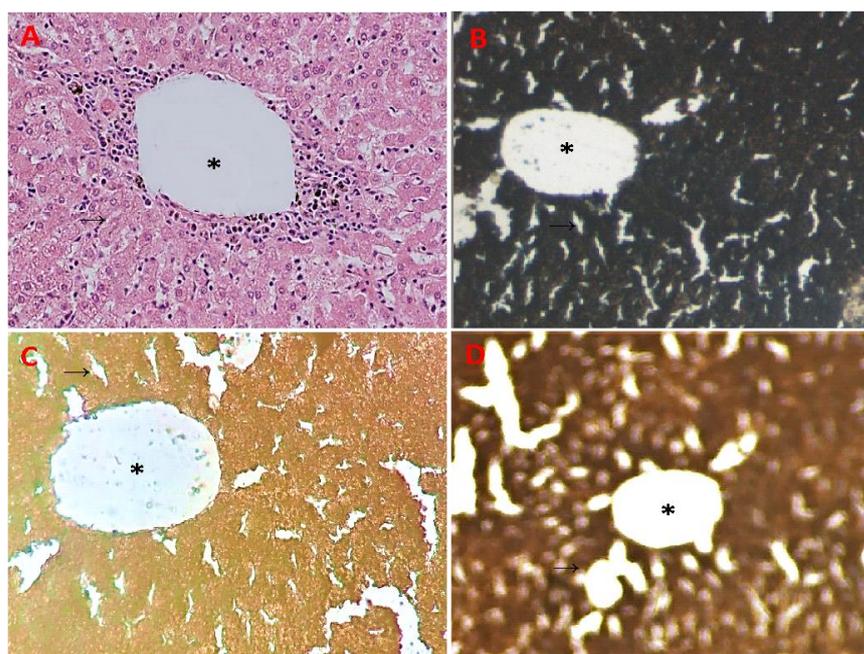


Figura 15. Fotomicrografia de cortes do tecido hepático de acordo com os grupos experimentais. **Legenda:** A - coloração do com hematoxilina e eosina (G1). B - Coloração do extrato do cajá em solução com etanol absoluto (G2A). C - Coloração B do extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70% (G2B). D - Coloração do pequi

em solução hidroalcoólica em 70%. * indicam a veia centro lobular. As setas indicam capilares sinusóides. Aumento em 400x.

Houve diferença significativa dos tecidos corados do grupo controle em relação aos submetidos à coloração com extrato das cascas das frutas em etanol absoluto (Figura 16). As pontuações do tecido hepático foram menores em comparação ao grupo controle, com bases dos tecidos anteriores.

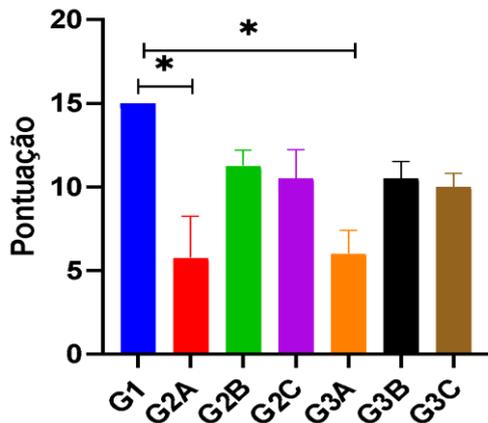


Figura 16. Pontuação dos componentes de tecido hepático conforme grupos. **Legenda:** G1 – Hematoxilina e eosina. G2A - extrato do cajá em etanol absoluto. G2B - extrato do cajá em solução hidroalcoólica em 70%. G2C - extrato do cajá em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. G3A - extrato do pequi em solução hidroalcoólica em 70%. G3B - extrato do pequi em etanol absoluto. G3C - extrato do pequi em solução hidroalcoólica com adição de ácido acético e alúmen de potássio. * indica $p < 0,05$ pelo teste t.

6. DISCUSSÃO

Foi verificado que os extratos das cascas do cajá e do pequi, nas concentrações de 25% e 20%, respectivamente, em concentrações hidroalcoólicas de 70% foram capazes de gerar coloração e permitir a visualização da arquitetura dos tecidos, com o tom amarelado, principalmente o cajá, corando o citoplasma da célula.

Não houve coloração de núcleos, o que era esperado pelas substâncias serem ácidas. Além disso, a coloração experimental de núcleo tende a ser menos efetiva em investigações de corantes experimentais. Em circunstâncias normais, os corantes tendem a ser enriquecidos na superfície do tecido, enquanto o núcleo do tecido frequentemente mostra uma coloração pobre (LI *et al.*, 2018).

Nessa pesquisa o pH dos extratos ficaram na faixa de 4,6 e 4,9, que possibilitou a coloração de estruturas básicas como citoplasma, fibras musculares cardíacas. O pH ideal para a coloração apropriada da eosina é de aproximadamente 4,5. A intensidade da coloração cai significativamente acima de um pH de 5, enquanto a coloração escurece abaixo de um pH de 4. Nesse sentido os extratos dessa pesquisa, assim como do estudo de Sudhakaran, Hallikeri e Babu (2018), possuem a característica de coloração devido à capacidade de seus fenóis de liberar íon hidrogênio dos grupos hidroxila. A adição de ácido acético não resultou em melhorias de coloração quando adicionado com alúmen de potássio nos extratos.

Além da acidez, a coloração amarela fornecida aos tecidos testados se deve a composição de carotenoides presentes em ambos os frutos. A presença de carotenoides, principalmente zeaxantina, anteraxantina e luteína fornece a coloração presente no pequi (NASCIMENTO-SILVA; MENDES; SILVA, 2020). No cajá os principais carotenoides são: β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, α e β caroteno (TIBURSKI *et al.*, 2011).

A zeaxantina e luteína podem apresentar compatibilidade em diferentes tecidos, ambas são utilizadas na indústria para produção de corantes (MARTINS *et al.*, 2012). A zeaxantina é usada como aditivo alimentar e corante na indústria de alimentos, o pigmento confere uma coloração amarelada à pele e gema de ovo das aves, e zeaxantina é preferida a outros carotenoides por aumentar a pigmentação em aves e peixes devido à sua capacidade de se depositar uniformemente na carne e nos ovos. Este carotenoide é pelo menos 1,5 vezes mais potente que a luteína. A avaliação da zeaxantina na área cosmética, principalmente na proteção solar, está em estudo devido à sua função natural como protetor de células da fotossensibilização (CASAROLI-MARANO *et al.*, 2015; SAJILATA; SIN-GHAL; KAMAT, 2008).

A aplicação do etanol absoluto não apresentou melhores resultados na coloração dos tecidos animais que a fração com etanol a 70%, entretanto, os carotenoides é melhor absorvido em soluções com etanol e insolúvel em água (MEZZOMO; FERREIRA, 2016), a hipótese é que a presença de outros compostos, como proteínas, nas cascas dos frutos podem ter afetado essa absorção em etanol absoluto, o que pode ser bases a pesquisas futuras com isolamento de carotenoides dos frutos para verificação da biocompatibilidade.

Em testes a solução com água destilada sem qualquer fração de etanol não apresentou bons resultados. Em outra pesquisa de Udonkanget *al.* (2018), que utilizou extratos de frutas com antocianinas com principal colorante, a mistura somente com água destilada foi eficaz na coloração de tecidos. Isso pode mostrar que colorantes com antocianinas somente água destilada pode ser usada, inverso ao carotenoides das cascas do pequi e cajá.

O tempo de 1 minuto utilizado neste estudo para coloração foi menor que diversos estudos de coloração histológica, como os 20 minutos utilizados Saiki e Thitipramote (2011) com extrato do Jamelão, 10 minutos usados por Pereira, 2020, com extrato de eucalipto na coloração de tecido conjuntivo, ou 15 a 30 minutos definidos por Alshamar e Dapson (2021) com extrato da Roselle de *Hibiscus Sabdariffa* para coloração celular.

Como potencial limitação desse estudo pode ser citado o número de tecidos utilizados. Em pesquisas futuras é necessário utilizar outros tipos de tecidos animais e mais amostras. Outra possível limitação é a não inclusão de um grupo dos extratos com hematoxilina, mas justifica-se visto que esse é o primeiro estudo investigando os extratos como colorantes, era necessário primariamente verificar qual a ação das soluções nos tecidos, para futura junção a outros corantes naturais ou convencionais para corar núcleo.

7 CONCLUSÃO

Os extratos do cajá em solução hidroalcoólica a 70% mostraram capacidade de coloração de tecidos e, mostrando que podem ser viáveis para serem usados em rotina histológica visando identificar componentes celulares teciduais, principalmente com um tom de cor mais forte e sem diferença significativa a hematoxilina e eosina. O extrato com pequi apresentou capacidade semelhante, mas com tonalidade no tecido renal e muscular cardíaco. A inclusão de ácido acético e o alúmen de potássio não resultaram melhora na coloração, diferentes concentrações devem ser testadas. Em pesquisas futuras a inclusão dos extratos com a hematoxilina também deve ser testada.

REFERÊNCIAS

ADEEL, S.; ZIA, K. M.; ABDULLAH, M.; REHMAN, F. U.; SALMAN, M.; ZUBER, M. Ultrasonic assisted improved extraction and dyeing of mordanted silk fabric using neem bark as source of natural colourant. **Natural product research**, v. 33, n. 14, p. 1-13, 2018.

AGBEDE, M. B. *et al.* The use of Hibiscus sabdariffa extract as nuclear stain for skin morphology and connective tissue with eosin counterstain. **Sokoto Journal of Medical Laboratory Science**, v. 2, p. 28-32, 2017.

ALMEIDA, R. R.; CAETANO, L. R.; ALMEIDA, V. F. R.; NASCIMENTO, L. A. J.; CAMPOS, L. Efeito da radiação ultravioleta C na qualidade e armazenamento pós-colheita de pequi. **Nativa**, v. 7, n. 1, p. 29-36, 2019.

ALSHAMAR, H. A.; DAPSON, R. W. Use of roselle extracted from Hibiscus sabdariffa for histological staining: a critical review and rational stain formulation. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 96, n. 2, p. 94-101, 2021.

ALTURKISTANI, H. A.; TASHKANDI, F. M.; MOHAMMEDSALEH, Z. M. Histological stains: a literature review and case study. **Global journal of health science**, v. 8, n. 3, p. 72, 2016.

ASIF, M.; KHODADADI, E. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Archives of Advances in Biosciences**, v. 4, n. 3, 2013.

ARÉVALO, J.; CRUZ-ROA, A. Histopathology image representation for automatic analysis: A state-of-the-art review. **Revista Med**, v. 22, n. 2, p. 79-91, 2014.

AWOGBINDIN, I. O.; TADE, O. G.; METIBEMU, S. D.; OLORUNSOGO, O. O.; FAROMBI, E. O. Assessment of Flavonoid content, free radical scavenging and hepatoprotective activities of Ocimum gratissimum and Spondias mombin in rats treated with Dimethylnitrosamine. **Archives of Basic and Applied Medicine**, v. 2, n. 1, p. 45-54, 2014.

AYADI, I.; SOUISSI, Y.; JLIASSI, I.; PEIXOTO, F.; MNIF, W. Chemical synonyms, molecular structure and toxicological risk assessment of synthetic textile dyes: a critical review. **Journal of Developing Drugs**, v. 5, n. 151, p. 2, 2016.

AYOKA, A. O. *et al.* Medicinal and economic value of Spondias mombin. **African Journal of Biomedical Research**, v. 11, n. 2, 2008.

BATAGLION, G. A. *et al.* Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. **Food chemistry**, v. 180, p. 280-287, 2015.

BEMFEITO, C. M. *et al.* Nutritional and functional potential of pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp and pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel flours. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 10, p. 3920-3925, 2020.

BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, supl. 2, p. 875-880, 2015.

BIAZOTTO, K. R. *et al.* Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1860-1876, 2019.

BRITO, S. A. *et al.* Evaluation of gastroprotective and ulcer healing activities of yellow mombin juice from *Spondias mombin* L. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0201561, 2018.

BORDOLOI, B.; JAISWAL, R.; SIDDIQUI, S.; TANDON, A. Perigos para a saúde de manchas especiais. **Revista Saudita de Patologia e Microbiologia**, v. 2, n. 5, p. 175-178, 2017.

BOUKROUFA, M.; BOUTEKEDJIRET, C.; CHEMAT, F. Development of a green procedure of citrus fruits waste processing to recover carotenoids. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 3, p. 252-262, 2017.

BRUNYÉ, T. T.; MERCAN, E.; WEAVER, D. L.; ELMORE, J. G. Accuracy is in the eyes of the pathologist: the visual interpretive process and diagnostic accuracy with digital whole slide images. **Journal of biomedical informatics**, v. 66, p. 171-179, 2017.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 370-376, 2005.

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 6, p. pdb.prot073411, 2014.

CARDOSO, L. M.; REIS, B. D. L.; HAMACEK, F. R.; SANT'ANA, H. M. P. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3-14, 2013.

CARLOS, L.; VENTURIN, N.; MACEDO, R. L. G.; HIGASHIKAWA, E. M.; GARCIA, M. B.; FARIAS, E. Crescimento e nutrição mineral de mudas de pequi sob efeito da omissão de nutrientes. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 13-21, 2014.

CARVALHO, J. S.; FRANÇA, P. R. L.; MELO, A. H. F.; PETERSEN, M. T. N.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 18-27, 2019.

CASAROLI-MARANO, R. P. *et al.* Potential role of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for cell-based therapy of the ocular surface. **Journal of clinical medicine**, v. 4, n. 2, p. 318-342, 2015.

CHAUDHRI, S. K.; JAIN, N. K. History of cosmetics. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 3, n. 3, 2014.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. **Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet**, v. 1, p. 1-25, 2006.

DAMIANI, C. *et al.* Perfil de ácidos graxos e fatores antinutricionais de amêndoas de pequi crua e torrada. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 71-78, 2013.

DAPSON, R.; HOROBIN, R. W.; KIERNAN, J. Hematoxylin shortages: their causes and duration, and other dyes that can replace hemalum in routine hematoxylin and eosin staining. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 1, p. 55-63, 2010.

EGBUJO, E. C.; ADISA, O. J.; YAHAYA, A. B. Estudio de los Efectos de Tinción de la Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en Cortes Histológicas de Testículo. **International Journal of Morphology**, v. 26, n. 4, p. 927-930, 2008.

FADIMU, O. Y.; IDOWU, O. T. H.; IPINLAYE, S. J. Studies on the dormancy and germination of stony fruits of hog plum (*Spondias mombin*) in response to different pre-soaking seed treatments. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 57-62, 2014.

FAN, Y.; ZHAO, Y.; LIU, A.; HAMILTON, A.; WANG, C.; LI, L.; YANG, L. Indigenous knowledge of dye-yielding plants among Bai communities in Dali, Northwest Yunnan, China. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 74, 2018.

FERREIRA, *et al.* Marine bioinvasions in the Brazilian coast: brief report on history of events, vectors, ecology, impacts and management of non-indigenous species.

In: **Biological invasions in marine ecosystems**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 459-477, 2009.

FREITAS, B. S.; CAVALCANTE, M. D.; CAGNIN, C.; SILVA, R. M. D.; PLÁCIDO, G. R.; OLIVEIRA, D. E. Physical-chemical characterization of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) foam-mat drying at different temperatures. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 430-435, 2018.

FREITAS, R. V. D. S.; SOUZA, P. A. D.; COELHO, E. L.; SOUZA, F. X. D.; BESERRA, H. N. B. R. Storage of mombin fruits coated with cassava starch and PVC film. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 244-249, 2017.

GEÖCZE, K. C. *et al.* Caryocar brasiliense Camb. fruits from the Brazilian Cerrado as a rich source of carotenoids with pro-vitamin A activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 103943, 2021.

GEÖCZE, K. C. *et al.* Essential oils from pequi fruits from the Brazilian Cerrado ecosystem. **Food research international**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2013.

GIUFFRIDA, D.; MENCHACA, D.; DUGO, P.; DONATO, P.; CACCIOLA, F.; MURILLO, E. Study of the carotenoid composition in membrillo, guanabana toreta, jobo and mamey fruits. **Fruits**, v. 70, n. 3, p. 163-172, 2015.

HASAN, M. M.; HOSSAIN, M. B.; AZIM, A. Y. M. A.; GHOSH, N. C.; REZA, M. S. Application of purified curcumin as natural dye on cotton and polyester. **International Journal of Engineering & Technology**, v. 14, n. 05, p. 17-23, 2014.

HE, L.; LONG, L. R.; ANTANI, S.; THOMA, G. R. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 107, n. 3, p. 538-556, 2012.

ISHUNINA, T. A.; MOSPANOVA, A. A.; ARKHIPOVA, A. G. The use of extracts of dahlia, rose and peony flowers for histological staining. **Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya**, n. 3, p. 221-226, 2017.

KATHER, J. N.; WEIS, C. A.; MARX, A.; SCHUSTER, A. K.; SCHAD, L. R.; ZÖLLNER, F. G. New colors for histology: optimized bivariate color maps increase perceptual contrast in histological images. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145572, 2015.

KOLLMANN, L. J. C.; PEIXOTO, A. L. Notes on the distribution and new records for four species of Begonia from Brazilian Atlantic Forest. **Rodriguésia**, v. 65, n. 1, p. 193-200, 2014.

KRAMELL, A. E.; ALTARES, M. G.; PÖTSCH, M.; KLUGE, R.; ROTHER, A.; HAUSE, G.; CSUK, R. Mapping Natural Dyes in Archeological Textiles by Imaging Mass Spectrometry. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2331, 2019.

KUMAR, R.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, S. Detection and classification of cancer from microscopic biopsy images using clinically significant and biologically interpretable features. **Journal of medical engineering**, v. 2015, 2015.

KUMARA, N. T. R. N.; LIM, A.; LIM, C. M.; PETRA, M. I.; EKANAYAKE, P. Recent progress and utilization of natural pigments in dye sensitized solar cells: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 78, p. 301-317, 2017.

KUŞÇULU, N. G.; ASLAN, H. G. Evaluation of an extract of the Punica granatum flower as a biological stain of rat tissues: a preliminary study. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 1, p. 581-585, 2019.

LANGI, P.; KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.; PROESTOS, C. Carotenoids: From plants to food and feed industries. In: Microbial Carotenoids. **Methods in Molecular Biology**, 2018. p. 57-71, 2018.

LI, Y. *et al.* Hematoxylin and eosin staining of intact tissues via delipidation and ultrasound. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

LIMA, A. de *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 695-698, 2007.

LOURENÇO, M. A. M.; BRAZ, M. G.; AUN, A. G.; PEREIRA, B. L. B.; FIGUEIREDO, A. M.; SILVA, R. A. C.; AZEVEDO, P. Spondias mombin supplementation attenuated cardiac remodelling process induced by tobacco smoke. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 3996-4004, 2018.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 450-457, 2013.

MADUKA, H. C. C. *et al.* Phytochemical, antioxidant and microbial inhibitory effects of Spondias mombin leaf and stem bark extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 14-17, 2014.

MAIAUGREE, W.; LOWPA, S.; TOWANNANG, M.; RUTPHONSAN, P.; TANGTRAKARN, A.; PIMANPANG, S.; AMORNKITBAMRUNG, V. A dye

sensitized solar cell using natural counter electrode and natural dye derived from mangosteen peel waste. **Scientific reports**, v. 5, p. 15230, 2015.

MARTINEZ, R. M.; BALBINOT, D. T. L.; ZARPELON, A. C., FERRARI, L. D.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 4, p. 494-504, 2015.

MARTINS, C. C.; SILVA, G. Z. D.; DURIGAN, L. D.; VIEIRA, R. D. Pregerminative treatments of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) seeds. **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 363-370, 2019.

MARTINS, D. S. *et al.* New lutein-based dyes for ophthalmic surgery use. **Retina**, v. 32, n. 7, p. 1328-36, 2012.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 156-164, 2010.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S. Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. **Journal of Chemistry**, v. 2016, 2016.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. A revision of *Spondias* L.(Anacardiaceae) in the Neotropics. **PhytoKeys**, n. 55, p. 1, 2015.

MORAGA, Á. R.; ARGANDOÑA, J.; MOTA, B.; PÉREZ, J.; VERDE, A.; FAJARDO, J.; GÓMEZ, L. G. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 287-296, 2013.

MOURA NETO, L. G. D.; ROCHA, É. M. D. F. F.; AFONSO, M. R. A.; Rodrigues, S.; COSTA, J. Physicochemical and sensory evaluation of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) atomized powder. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 244-252, 2015.

MOURA, N. F.; CHAVES, J.; NAVES, R. V. Caracterização física de frutos de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb) do cerrado. **Revista Árvore**, v. 37, p. 905-912, 2013.

MURGA, L. V.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; ALONSO, B. O. Fruits and vegetables in the Brazilian Household Budget Survey (2008–2009): carotenoid content and assessment of individual carotenoid intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 88-96, 2016.

MELO NETO, A. B.; FERREIRA, A. P. M.; FÜRSTENAU, C. R. Efeito do extrato das folhas de Caryocar brasiliense (Pequi) sobre a atividade das ectonucleotidasas do soro de ratos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 38, 2018.

MELLO, V. M.; SUAREZ, P. A. Z. As formulações de tintas expressivas através da história. **Revista virtual de química**, v. 4, n. 1, p. 2-12, 2012.

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R.; MENDES, N. S. R.; SILVA, F. A. Nutritional composition and total phenolic compounds content of pequi pulp (Caryocar brasiliense Cambess.). **Journal of bioenergy and food science**, v. 7, n. 2, p. 2812019, 2020.

NISAR, N.; LI, L.; LU, S.; KHIN, N. C.; POGSON, B. J. Carotenoid metabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 68-82, 2015.

NWIDU, L. L. *et al.* In vitro anti-cholinesterase and antioxidant activity of extracts of Moringa oleifera plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 71, 2018.

OLADUNJOYE, A. O. *et al.* Effect of thermosonication on quality attributes of hog plum (Spondias mombin L.) juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 70, p. 105316, 2021.

OLIVEIRA, J. S.; MARTINS, M. M.; APPELT, H. R. Trilogia: Química, Sociedade e Consumo. **Química e Sociedade**, v. 20, n. 3, p. 140-144, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. J. F. D.; VOIGTEL, S. D. S.; NICOLAU, S. A.; ARAGAKI, S. Biodiversity and family agriculture in Joanópolis, São Paulo State, Brazil: economic potential of the local flora. **Hoehnea**, v. 45, n. 1, p. 40-54, 2018.

OLIVEIRA, M. C. D.; SILVA, D. M. D.; MARCHESIN, W. A.; ATTIA, Y. A. E. W.; LIMA, S. C. O.; OLIVEIRA, H. C. Pequi peel flour in diets for Japanese quail. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 38, n. 1, p. 101-106, 2016.

PEIXOTO, F. P.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Corantes têxteis: uma revisão. **Holos**, v. 5, p. 98-106, 2013.

PERIS, C. S. *et al.* Color variation assay of the anthocyanins from acai fruit (Euterpe oleracea): a potential new dye for vitreoretinal surgery. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 8, p. 746-753, 2013.

PIANOVSKI, A. R. *et al.* Use of pequi oil (Caryocar brasiliense) in cosmetics emulsions: development and evaluate of physical stability. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

PICCOLI, K. R.; SCALIANTE, M. H. N. O.; MACHADO, N. R. C. F. Catalisadores suportados em zeólita nay na degradação de corante têxtil. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1553-1558, 2015.

PINTO, L. C. L. *et al.* Traditional knowledge and uses of the Caryocar brasiliense Cambess.(Pequi) by “quilombolas” of Minas Gerais, Brazil: subsidies for sustainable management. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 511-519, 2016.

PRIETO, G. A.; BUITRAGO, B. A. Microencapsulación de colorantes naturales presentes en la fresa (Fragaria vesca). **Avances: Investigacion en Ingeniería**, v. 11, n. 1, p. 76-82, 2014.

RASMUSSEN, O. F.; RUDBECK, L. Immunohistochemistry: A Dako Perspective. In: **Handbook of Practical Immunohistochemistry**. Springer, New York, NY, 2015. p. 57-67.

RATHER, L. J. *et al.*, Colorful and semi durable antioxidant finish of woolen yarn with tannin rich extract of Acacia nilotica natural dye. **Dyes and Pigments**, v. 139, p. 812-819, 2017.

RESENDE, G. A. A.; TERRONES, M. G. H.; RESENDE, D. M. L. C. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de Caryocar brasiliense Camb. (Pequi). **Bioscience Journal**, v.27, n.3, p.460-472, 2011.

RIBEIRO, I. C. D. O. *et al.* Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against Staphylococcus spp. and Escherichia coli from cattle. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 32, 2018.

RIBEIRO, M. C. *et al.* Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oil. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 386-392, 2012.

RICHHARIYA, G.; KUMAR, A.; TEKASAKUL, P.; GUPTA, B. Natural dyes for dye sensitized solar cell: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 705-718, 2017.

RODRIGUES, L. J. *et al.* Caracterização do desenvolvimento de pequi (Caryocar brasiliense) temporão do sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, p. 260-265, 2009.

SABIU, S.; O'NEILL, F. H.; ASHAF, A. O. T. Kinetics of α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential of Zea mays Linnaeus (Poaceae), Stigma maydis aqueous extract: An in vitro assessment. **Journal of ethnopharmacology**, v. 183, p. 1-8, 2016.

SACRAMENTO, C. K. do; SOUZA, F. X. de. Cajá. In. SANTOS-SEREJO, J. A. dos; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. da S. **Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p 83- 105, 2009.

SAIKI, P.; THITIPRAMOTE, N. Extraction of natural histological dye from black plum fruit (*Syzygium cumini*). **Journal of the Microscopy Society of Thailand**, v. 4, n. 1, p. 13-15, 2011.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90-103, 2018.

SAIVARAJ, S.; CHANDRAMOHAN, G. Antimicrobial activity of natural dyes obtained from *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn barks. **World Scientific News**, v. 98, p. 221-227, 2018.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KAMAT, M. Y. The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 7, n. 1, p. 29-49, 2008.

SANTOS, P. R. P.; CARVALHO, R. B. F.; COSTA JÚNIOR, J. S.; FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 161-168, 2013.

SANTOS, V.; ALMEIDA, C. The complete chloroplast genome sequences of three *Spondias* species reveal close relationship among the species. **Genetics and molecular biology**, v. 42, n. 1, p. 132-138, 2019.

SENGE, M.; RYAN, A.; LETCHFORD, K.; MACGOWAN, S.; MIELKE, T. Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis. **Symmetry**, v. 6, n. 3, p. 781-843, 2014.

SHAKERI, A.; SOHEILI, V.; KARIMI, M.; HOSSEININIA, S. A.; BAZZAZ, B. S. M. Biological activities of three natural plant pigments and their health benefits. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1 p. 356–361, 2018.

SHALINI, S. *et al.* Review on natural dye sensitized solar cells: Operation, materials and methods. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 1306-1325, 2015.

SILVA NETO, S. P.; COSTA, C. J; **Importância econômica, social e ambiental do pequiizeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em:

<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/279/>>. Acesso em: 20 jan. 2021.

SILVA, A. P. R.; ROCHA, W. M.; FERNANDES, D. M.; FINZER, J. R. D. Production of Pequi Powder by Drying Pulp. **Agricultural Sciences**, v. 9, n. 08, p. 1047, 2018.

SILVA, E. F.; MARTINS, L. S. S.; OLIVEIRA, V. R. Diversity and genetic structure in caja tree (*Spondias mombin* L.) populations in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 171-181, 2009.

SILVINO, R.; SILVA, G.; SANTOS, O. V. Qualidade nutricional e parâmetros morfológicos do fruto cajá (*Spondias Mombin* L.). **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 2, p. 03-11, 2017.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 8, p. 1265-1286, 2016.

SOUSA, A. G. O.; FERNANDES, D. C.; ALVES, A. M.; FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2319-2325, 2011.

SOUZA, M. D. C.; GIUSTOLIN, T. A.; ALVARENGA, C. D.; COSTA, J. N. D. J.; ASPIAZÚ, I. Aqueous extract of pequi fruit to control *Spodoptera frugiperda* in corn. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

STASIAK, N.; KOCH, W. K.; GŁOWNIAK, K. Modern industrial and pharmacological applications of indigo dye and its derivatives: a review. **Acta Pol Pharm**, v. 71, n. 71, p. 215-221, 2014.

SUDHAKARAN, A.; HALLIKERI, K.; BABU, B. Natural stains *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) and *Curcuma longa* L.(turmeric)–A substitute to eosin. **AYU**, v. 39, n. 4, p. 220, 2018.

SUN, Y. *et al.* Flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity of fresh eating citrus fruits, using the coupled in vitro digestion and human intestinal HepG2 cells model. **Food chemistry**, v. 279, p. 321-327, 2019.

SURYAWANSHI, H.; NAIK, R.; KUMAR, P.; GUPTA, R. *Curcuma longa* extract–Haldi: A safe, eco-friendly natural cytoplasmic stain. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 21, n. 3, p. 340, 2017.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON, Richard M. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology**, v. 49, n. 4, p. 411-424, 2006.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O. E.; PACHECO, S. Propriedades nutricionais da polpa de mombin (*Spondias mombin* L.) amarela. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2326-2331, 2011.

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 4669-4678, 2015.

UDONKANG, M. I. *et al.* Spectrophotometry, physiochemical properties, and histological staining potential of aqueous and ethanol extracts of beetroot on various tissues of an albino rat. **Biomedicine hub**, v. 3, n. 3, p. 1-10, 2018.

VALE, I.; COSTA, L. G. S.; MIRANDA, I. S. Indicated species to restoration of riparian forests in subwatershed of Peixe-Boi river, para state/Especies indicadas para a recomposicao da floresta ciliar da sub-bacia do Rio Peixe-Boi, para. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 3, p. 573-583, 2014.

VERA, Rosângela *et al.* Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 71-79, 2005.

VEUTHEY, T.; HERRERA, G.; DODERO, V. I. Dyes and stains: from molecular structure to histological application. **Frontiers in Bioscience**, v. 19, n. 1, p. 91-112, 2014.

YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. **Natural products and bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 123-145, 2017.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 5, p. 620-622, 2015.

WATHON, M. H.; BEAUMONT, N.; BENOHOUD, M.; BLACKBURN, R. S.; RAYNER, C. M. Extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* skin waste as a sustainable source of natural colorants. **Coloration Technology**, v. 135, n. 1, p. 5-16, 2019.

ZANI, L. B.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; ROCHA, L. D.; CORTE, V. B. A utilização e o potencial das sementes florestais. **Natureza on line**, v. 11, n. 3, p. 118-124, 2013.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Histopatologia e proteômica de proliferação e morte celular em camundongos Balb/c infectados com Leishmaniose (L.) infantum chagasi*", registrada nº 506/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. AIRTON MENDES CONDE JUNIOR do Departamento de Morfologia/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **28/09/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Novembro/ 2018 à Maio/ 2020
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo isogênico/ Balb/c
Nº de Animais	54
Peso/ Idade	20g-30g/ 6-8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Setorial da UFPI.

Teresina, 01 de Outubro de 2018.
Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura
Profa. Dra. Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura
Vice- Coordenadora da CEUA/UFPI