



GUIA PRÁTICO:
**Técnicas de
Citogenética
com ênfase
em Cactáceas**

Organizadores

Lânia Isis Ferreira Alves
José Achilles de Lima Neves
Enoque Medeiros Neto
Pollyana Karla da Silva
Leonardo Luiz Calado
Leonardo Pessoa Felix
Fabiane Rabelo da Costa Batista

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DO SEMIÁRIDO



GUIA PRÁTICO: Técnicas de Citogenética com ênfase em Cactáceas

Organizadores

Lânia Isis Ferreira Alves
José Achilles de Lima Neves
Enoque Medeiros Neto
Pollyana Karla da Silva
Leonardo Luiz Calado
Leonardo Pessoa Felix
Fabiane Rabelo da Costa Batista



Governo do Brasil
Presidência da República
Luiz Inácio Lula da Silva

**Ministério da Ciência,
Tecnologia e Inovação**
Luciana Santos

**Instituto Nacional do
Semiárido**
Diretora Mônica Tejo
Cavalcanti

Projeto Gráfico e Capa
Wedsley Melo
Chateaubriand Linhares de
Almeida

Edição de imagens
Felipe Lavorato

Fotos
Felipe Lavorato, José Achilles
L. Neves e Lânia I. F. Alves

Organizadores
Lânia Isis Ferreira Alves
José Achilles de Lima Neves
Enoque Medeiros Neto
Pollyana Karla da Silva
Leonardo Luiz Calado
Leonardo Pessoa Felix
Fabiane Rabelo da Costa
Batista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Guia prático [livro eletrônico] : técnicas
de citogenética com ênfase em cactáceas /
organizadores Lânia Isis Ferreira Alves...[et
al.]. -- 1. ed. -- Campina Grande, PB :
Instituto Nacional do Semiárido, 2024.
PDF

Outros organizadores: José Achilles de Lima
Neves, Enoque Medeiros Neto, Pollyana Karla da
Silva, Leonardo Luiz Calado, Leonardo Pessoa
Felix, Fabiane Rabelo da Costa Bastista.

Bibliografia.
ISBN 978-85-64265-95-0

1. Cactos 2. Cactos - Cultivo 3. Cactos -
Cultura I. Alves, Lânia Isis Ferreira. II. Neves,
José Achilles de Lima. III. Medeiros Neto, Enoqu.
IV. Silva, Pollyana Karla da. V. Calado, Leonardo
Luiz. VI. Felix, Leonardo Pessoa. VII. Batista,
Fabiane Rabelo da Costa.

24-222481

CDD-583.56

Índices para catálogo sistemático:

1. Cactos e suculentas : Botânica 583.56

Tábata Alves da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9253


Os cactos são o símbolo natural do semiárido brasileiro e estão presentes em diversas expressões artísticas, notadamente na xilogravura, mas também na música, nos cordéis, etc. Além disso, a beleza dessas plantas, de arquitetura singular e flores surpreendentes, faz delas uma das nossas plantas nativas mais cultivadas como ornamentais, tanto nas grandes cidades, inclusive nas floriculturas e nas mãos de colecionadores, quanto, e principalmente, nos jardins e quintais dos sertanejos. Não é à toa que as cactáceas são das poucas famílias de plantas que praticamente qualquer pessoa reconhece, mesmo quando estão sem flor.

O Instituto Nacional do Semiárido tem muito apropriadamente dado suporte para a publicação de duas obras sobre as cactáceas do Nordeste que merecem destaque entre os trabalhos sobre a Botânica do Semiárido. Primeiro foi o excelente livro Cactário Guimarães Duque: Espécies da Coleção Botânica do INSA, com identificação taxonômica feita pelo Eng. Agr. Erton Almeida. Este guia amplamente ilustrado, permite que qualquer pessoa sem familiaridade com a Botânica conheça a diversidade de cactos da região, o nome comum e o nome científico das espécies, os locais onde ocorrem, o nível de ameaça de extinção, etc, contribuindo assim para divulgar a beleza da nossa flora e estimulando a sua conservação. Agora, o INSA apresenta um manual de técnicas de citogenética aplicadas às cactáceas, organizado por uma equipe de especialistas no assunto, que certamente terá papel importante no desenvolvimento de novos estudos nessa área.

À primeira vista, pode parecer que um manual de técnicas citogenéticas exclusivamente dedicado às cactáceas seja um trabalho excessivamente especializado, mas na verdade não é. Como destacado no primeiro capítulo do livro, as cactáceas exigem atenção especial para coleta das plantas na natureza, cultivo, herborização e identificação das espécies analisadas. Afora isso, a obtenção de material vegetal para análise citogenética exige alguns cuidados específicos, que são didaticamente explicados no capítulo 2.

Nos capítulos 3 e 4 os autores exploram muito bem as distintas possibilidades de preparação de lâminas e de coloração dos cromossomos. Aqui eles apresentam tanto os métodos clássicos, que são geralmente mais simples e que podem ser aplicados mesmo em laboratórios pouco equipados, quanto a coloração CMA/DAPI, que exige microscopia de fluorescência, mas simplifica muito a análise e uma observação mais detalhada da estrutura





dos cromossomos. Embora tenham experiência com os métodos cito-moleculares mais modernos, os autores deixaram de lado essas técnicas, que podem trazer diversas informações adicionais sobre a organização dos cromossomos, mas são também mais dispendiosas, exigem uma aparelhagem mais extensa e tomam muito tempo para produzir bons resultados.

Nos capítulos 5 e 6 eles detalham como deve ser feita a análise dos dados obtidos, utilizando recursos digitais que facilitam muito o trabalho e permitem uma melhor comparação de dados entre espécies diferentes. O capítulo 7 é dedicado aos cuidados necessários ao manuseio correto do microscópio - o equipamento central de um laboratório de citogenética. O fotomicroscópio é tão importante que até pouco tempo atrás, em alguns laboratórios, só o professor responsável podia manusear livremente esse equipamento.

Por fim, nos capítulos 8 a 10, os autores apresentam como preparar as principais soluções usadas na citogenética, quais os cuidados necessários ao fazer uso dessas soluções e as possíveis causas de eventuais insucessos com o uso desses protocolos.

Um aspecto que merece destaque especial neste trabalho são as ilustrações que acompanham todos os capítulos. Especialmente no preparo das soluções, os autores se esmeraram de tal maneira na qualidade das ilustrações, que elas quase dispensam explicações adicionais. A partir do capítulo 3 em diante todo o texto tem caráter mais geral, se aplicando não apenas às cactáceas mas também à análise de qualquer outra espécie vegetal. Isso é particularmente importante, devido à escassez de livros didáticos sobre esse tema no Brasil.

Portanto, estão de parabéns tanto os autores, pela iniciativa e dedicação na elaboração deste trabalho, quanto o INSA, por possibilitar essa publicação, demonstrando o seu interesse em investir amplamente no desenvolvimento da pesquisa no Semiárido brasileiro.

Marcelo Guerra

Departamento de Botânica
Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1. Coleta e documentação botânica	8
2. Obtenção e processamento de raízes para citogenética	10
2.1 <i>Coleta de raízes</i>	10
2.2 <i>Pré-tratamento</i>	13
2.3 <i>Fixação e armazenamento</i>	15
3. Preparação cromossômica	18
3.1 <i>Técnica de esmagamento seguida por coloração</i>	19
3.2 <i>Técnica de coloração seguida por esmagamento</i>	20
3.3 <i>Técnica de dissociação de células meristemáticas por sonicação (DCMS)</i>	22
4. Coloração das lâminas	25
4.1 <i>Coloração convencional – Giemsa e hematoxilina</i>	26
4.2 <i>Dupla coloração CMA/DAPI</i>	27
5. Caracterização citogenética	30
5.1 <i>Determinação do número, tamanho cromossômico e padrões de bandas</i>	30
5.2 <i>Tipos e partes funcionais do cromossomo</i>	36
5.3 <i>Como descrever o cariótipo</i>	39
6. Apresentação de dados e softwares úteis na citogenética	40
6.1 <i>Prancha de figuras</i>	40
6.2 <i>Cariograma</i>	43
6.3 <i>Ideograma</i>	45
6.4 <i>Tabela</i>	49
7. Componentes, cuidados e limpeza do fotomicroscópio	50
7.1 <i>Componentes básicos</i>	51
7.2 <i>Cuidados e limpeza</i>	52





8. Preparo de soluções	56
8.1 <i>Agentes antimitóticos</i>	58
8.2 <i>Fixadores</i>	60
8.3 <i>Ácidos e mix de enzimas</i>	62
8.4 <i>Corantes acéticos e fluorescentes</i>	65
8.5 <i>Soluções tampão</i>	74
8.6 <i>Meio de montagem para fluorocromos</i>	78
9. Potencial de risco químico das substâncias utilizadas	80
10. Obtenção de bons resultados: problemas e possíveis soluções	82
11. Princípios essenciais para convivência no laboratório	88
12. Bibliografia consultada	90
13. Anexos	93
Anexo 1 <i>Livros indicados para o aprofundamento teórico-prático em citogenética vegetal</i>	93
Anexo 2 <i>Mapa mental das etapas envolvidas no preparo de lâmina usando a técnica de esmagamento seguido por coloração (Guerra e Souza, 2002)</i>	94
Anexo 3 <i>Mapa mental das etapas da preparação de lâmina usando a técnica coloração com hematoxilina acética 1% seguida por esmagamento (Guerra e Souza, 2002)</i>	95
Anexo 4 <i>Mapa mental das etapas de preparação de lâminas usando a técnica de dissociação de células meristemáticas por sonicação - DCMS</i>	96
Anexo 5 <i>Registros de números cromossômicos (2n) e padrões de bandas heterocromáticas em Cactaceae</i>	97
Anexo 6 <i>Exemplos detalhados de cálculos necessários para a preparação de soluções químicas</i>	103
14. Glossário	106
15. Quiz: Desafie-se com um teste sobre nosso Guia	115

1. Coleta e documentação botânica

Uma das fases mais importantes do estudo citogenético é a obtenção de material vegetal (incluindo sementes ou frutos) de procedência conhecida (local de coleta) e corretamente identificado. Esses dados são fundamentais para a posterior publicação das informações citogenéticas, bem como para o histórico de registro e referências sobre a vegetação de uma determinada região.



Figura 1. Coleta em campo de cactos.

Para isso, são realizadas expedições organizadas para esse fim (Fig. 1). Além de mudas e sementes para cultivo, germinação e análise citogenética posterior, devem ser coletadas espécimes para a confecção de exsicatas que serão tombadas e depositadas em herbário.



Figura 2. Material de coleta em campo.

É de fundamental importância que os materiais de coleta, a saber, caderno de campo, prensas de madeira, tesouras de poda, podão, facão, sacos plásticos, fita crepe, luvas protetoras, jornais em quantidade suficiente, aparelho de GPS e máquina fotográfica ou celular com câmera de alta qualidade,



Figura 3. Exemplar de exsicata de *Melocactus* sp.

um contato prévio com um taxonomista que tenha experiência nesse grupo de plantas. Essa recomendação se estende não apenas aos cactos, mas a qualquer outro táxon. O site da Flora e Funga do Brasil - Re flora (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/>) fornece diversas informações taxonômicas e indica especialistas para uma variedade de famílias de plantas, incluindo Cactaceae.

sejam previamente organizados para o processamento e documentação do material no campo (Fig. 2).

Todo material vegetal a ser analisado citogeneticamente necessita de identificação botânica correta, que deve ser feita por um taxonomista, especialista no grupo em estudo. Nomes vernaculares (populares) não são aceitos em publicações científicas, por serem extremamente variáveis de uma região para outra e, em muitos casos, até dentro de uma mesma região.

Antes de iniciar qualquer trabalho de citogenética com representantes da família Cactaceae no Brasil, é recomendável estabelecer

Para que seja realizada uma identificação correta das plantas, é fundamental que determinadas características úteis ao reconhecimento da espécie pelo taxonomista permaneçam na exsicata. Particularmente para a família Cactaceae, onde as plantas são bastante volumosas e, portanto, impossíveis de serem inseridas na sua totalidade, é fundamental que determinadas partes das plantas sejam incluídas. Para o gênero *Melocactus*, por exemplo, é fundamental que a base, a porção mediana e o cefálio (estrutura encontrada no ápice de indivíduos adultos, onde surgem as flores e alta concentração de tricomas) sejam inseridos na exsicata (Fig. 3). Além disso, informações sobre o ambiente, altura da planta, cor das flores e dos frutos também devem ser incluídas nas anotações do caderno de campo.

As exsicatas constituem o material testemunho da identificação botânica; portanto, aumentam consideravelmente a credibilidade dos resultados citogenéticos. Além disso, as experiências vivenciadas durante as excursões de coleta em campo possibilitam, ao mesmo tempo, a obtenção de material vegetal e uma melhor compreensão sobre os aspectos ecológicos e diversificados das espécies analisadas.

2. Obtenção e processamento de raízes para citogenética

2.1 Coleta de raízes

Para obtenção de bons resultados, a escolha e processamento das raízes são etapas importantes na análise citogenética vegetal, independente da técnica que se deseja aplicar. As raízes ideais para esse tipo de procedimento são raízes jovens (Fig. 4), pois possuem tecido com intensa atividade mitótica (tecido meristemático). Ao retirar a planta do vaso, essas raízes podem ser facilmente

identificadas por terem cor mais intensamente esbranquiçada na sua extremidade ou ponta (ver detalhe Fig. 4) e pela facilidade de se desprender da planta. As raízes são retiradas com o auxílio de uma pinça de aço inoxidável, lavadas em água destilada, secas rapidamente em papel absorvente e, então, colocadas em tubo de 2 mL contendo solução antimitótica suficiente para cobri-las. Ao chegar ao laboratório, o antimitótico deve ser trocado.



Figura 4. Raízes jovens - detalhe da ponta da raiz.

Para obtenção de raízes jovens de cactos, alguns cuidados especiais são necessários, tais como:

- Manter as espécies terrícolas ou saxícolas que se deseja analisar em vasos com substrato composto por areia lavada grossa (pedrisco) e pouca matéria orgânica (Fig. 5);
- Antes da coleta, produzir estresse hídrico de 8 a 10 dias e, após esse período, regar as plantas ao entardecer para coletar as raízes no dia seguinte pela manhã;
- Remover a planta do vaso com cuidado, preferencialmente usando luvas protetoras (Fig. 6). Isso evita não apenas acidentes com os espinhos ou irritação da pele por gloquídios, mas também danos ao vegetal.
- No momento da coleta, usar pulverizador de água (se possível com pressão) para remoção da areia (Fig. 6) e facilitação do acesso às raízes, garantindo, com isso, que as raízes coletadas sejam, de fato, material apropriado ao interesse do estudo, ao invés de plantas invasoras, que frequentemente crescem junto no mesmo vaso.



Figura 5. Cactos cultivados em vaso.



Figura 6: Remoção da areia com o auxílio de um pulverizador de água e luvas.

2.2 Pré-tratamento

Nas células meristemáticas de raízes não pré-tratadas, ou seja, sem o uso de agentes antimitóticos (Fig. 7A-B), observamos, por meio da análise microscópica, as fases completas do ciclo celular: interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase (ver Fig. 8A). Durante a metáfase, os cromossomos se alinham no plano equatorial da célula devido à ação do fuso mitótico, composto por microtúbulos ligados aos centrômeros, os quais os mantêm unidos. Isso torna desafiadora a definição da morfologia cromossômica. Por outro lado, nas raízes pré-tratadas com agentes antimitóticos, observa-se, nas células meristemáticas radiculares, apenas a fase de interfase e duas subfases da mitose: prófase e metáfase (Fig. 8B). Essa ausência das demais subfases é resultado da ação dos agentes antimitóticos, os quais despolimerizam as fibras do fuso, bloqueando o ciclo mitótico na metáfase e ocasionando uma maior contração e espalhamento dos cromossomos.



Figura 7. Agentes antimitóticos utilizados na citogenética vegetal. A. Reagentes antimitóticos que estão na forma de pó; B. Soluções de uso e estoque. O detalhe em "B" mostra as informações importantes a ter no rótulo.

Assim, com a configuração altamente condensada e isolada dos cromossomos metafásicos (Fig. 8B), torna-se mais viável a contagem e a análise detalhada de sua morfologia, assim como dos padrões de organização dos blocos de heterocromatina constitutiva (HC). Os antimitóticos rotineiramente utilizados são: 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M e colchicina 0,2%. Além desses, outros antimitóticos também são usados na citogenética vegetal, como α -bromonaftaleno, trifuralina e orizalina. Em cactáceas, o pré-tratamento tem sido realizado com sucesso com 8HQ a 4 °C por 24 horas. Contudo, colchicina 0,2% e orizalina a 4 °C por 4 horas também produzem bons resultados. **Atenção:** nessa etapa, deve-se evitar o contato do 8HQ com o ácido acético, uma vez que este último altera as propriedades antimitóticas do 8HQ. É importante lembrar que as raízes devem ficar mergulhadas no antimitótico (Fig. 9).

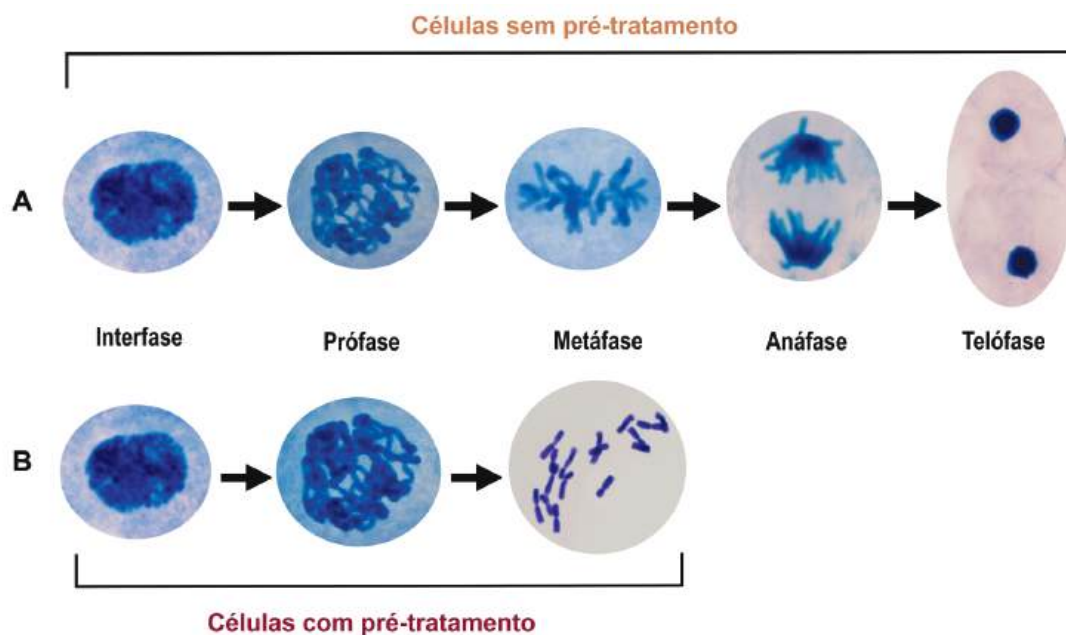


Figura 8. Fases do ciclo mitótico de *Allium cepa* (Cebola). **A.** Fases observadas em raízes sem pré-tratamento. **B.** Fases observadas em raízes pré-tratadas com antimitóticos.



Figura 9. Raízes em 8HQ (solução de pré-tratamento).

2.3 Fixação e armazenamento

A fixação é uma das etapas mais críticas na análise citogenética. Se feita corretamente, garante a estabilidade da morfologia e estrutura dos componentes bioquímicos intra e extracelulares, sem causar distorções na estrutura dos cromossomos. O fixador, além de conservar as raízes por longos períodos, prepara a célula para a entrada dos corantes, entre outras substâncias importantes para o sucesso das etapas subsequentes à fixação.

Mesmo existindo vários fixadores (Carnoy, metanol, álcool isopropílico 80%, etanol 50%, Líquido de Bouin), o Carnoy é o mais utilizado em citogenética vegetal. Jean Baptiste Carnoy (1836 – 1899), um padre belga e um dos pioneiros da biologia celular, desenvolveu fixadores altamente eficazes para a preservação de tecidos vegetais, incluindo a solução 3:1, conhecida como Carnoy em sua homenagem. Essa solução é composta por uma mistura de três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial (Fig. 10).

O Álcool absoluto (etanol ou metanol) é essencial na solução de Carnoy, realizando a fixação por desidratação e coagulação de proteínas, prevenindo a autólise e a putrefação dos tecidos. O metanol é considerado um fixador superior ao etanol devido à sua capacidade de penetrar nas células de forma mais rápida, conferindo-lhe maior agilidade na fixação. Apesar de ambos serem eficazes, o etanol é mais comumente utilizado em laboratórios de citogenética vegetal devido à menor toxicidade. O ácido acético, embora não fixe diretamente, desempenha um papel crucial na mitigação de efeitos adversos causados pelo álcool, evitando o enrugamento celular, amolecendo os tecidos, destruindo proteínas, e tornando o DNA acessível a corantes ou sondas, além de facilitar a aderência dos cromossomos à superfície da lâmina de vidro.

As raízes de cactáceas são fixadas em Carnoy por 2 horas em temperatura ambiente (TA), e a cada meia hora, os tubos de fixação são agitados por 30 segundos, manualmente, ou, por meio de homogeneizador de amostra (Fig. 11).

Atenção: (1) Esse fixador deve ser preparado e utilizado logo em seguida; (2) Raízes muito grossas devem ser perfuradas com a ponta da seringa ou cortadas ao meio; (3) O volume do fixador deve ser de 10 a 20 vezes maior que o material a ser fixado; (4) Os tecidos tendem a liberar água durante a fixação, sendo recomendada a troca da solução fixadora por outra, após 2 horas de fixação.

Importante: todas as fixações devem estar devidamente identificadas (nome da espécie e data) com etiqueta marcada com grafite e colocada junto ao material fixado (Fig. 11, ver detalhe).



Figura 10. Reagentes usados no preparo do Carnoy: etanol ou metanol absoluto e ácido acético glacial.



Errado



Correto



Figura 11. Raízes sendo misturadas com auxílio de um homogeneizador de amostra: Detalhe destaca como identificar corretamente os microtubos.

Decorrido o tempo de fixação na temperatura ambiente, as raízes de cactáceas podem ser estocadas em freezer, a -20°C , no próprio fixador por um longo período de tempo (Fig. 12).



Figura 12. Fixações armazenadas em freezer (-20°C).


3. Preparação cromossômica

Na citogenética vegetal, são utilizadas diversas técnicas, com variações, para a confecção de lâminas, podendo ou não envolver o uso de nitrogênio líquido (Anexo 1). Três desses procedimentos serão aqui descritos e ilustrados:

1. Técnica de esmagamento seguida de coloração, conforme descrito por Guerra e Souza (2002) – consiste no esmagamento do material vegetal, seguido pelo congelamento em nitrogênio líquido para a remoção das lamínulas. Esta técnica é amplamente utilizada, tanto com o uso de corantes convencionais quanto fluorescentes. Contudo, ela pode ser dispendiosa devido ao custo e à disponibilidade limitada do nitrogênio líquido no laboratório.

2. Técnica de coloração seguida por esmagamento (Guerra e Souza, 2002) – utilizada na confecção de lâminas temporárias, esta técnica dispensa o uso de nitrogênio líquido. Apresenta a vantagem de ser de baixo custo, tornando-se acessível a qualquer laboratório equipado com uma lupa (estereomicroscópio) e um microscópio óptico comum. Inicialmente, é realizada uma hidrólise em ácido clorídrico (HCl) 5N (lê-se: cinco normal) à temperatura ambiente ou a 1N (lê-se: um normal) sob fervura, seguida de coloração com hematoxilina acética 1% ou orceína acética 2%.


3. Dissociação de células meristemáticas por sonicação (DCMS): um novo protocolo para a preparação de lâminas de cromossomos metafásicos em plantas - este método, além de combinar algumas das vantagens das técnicas mencionadas anteriormente, proporciona maior praticidade, eficiência no tempo de preparação e otimização do número de lâminas necessárias para preparações cromossômicas. Isso se deve à capacidade de armazenamento de suspensões de células metafásicas mitóticas, sem comprometer a qualidade celular e permitindo uma repetibilidade fácil do processo.



Para uma compreensão mais aprofundada de cada etapa das técnicas de preparação cromossômica mencionadas anteriormente e descritas detalhadamente abaixo, foram criados esquemas ilustrativos que podem ser encontrados nos Anexos 2, 3 e 4.

3.1 Técnica de esmagamento seguida por coloração (ver Anexo 2):

1. Retire as raízes do fixador e lave-as duas vezes em água destilada (5 minutos cada lavagem), utilizando microtubos de 2,0 mL para esta e demais etapas.
2. Enxugue as raízes rapidamente com papel filtro.
3. Nesta etapa, dependendo do tipo de coloração aplicada, as raízes podem ser hidrolisadas ou digeridas antes de prosseguir para a etapa 4. Para coloração convencional, siga as instruções em A. Para coloração diferencial, siga as instruções em B:
 - A. Hidrólise: mergulhe as raízes em uma solução de HCl 5N à temperatura ambiente (TA) por 20 a 30 minutos.
 - B. Digestão enzimática: mergulhe as raízes em uma solução enzimática (celulase 2% / pectinase 20%) e deixe por 60 minutos na estufa a 37 °C em câmara úmida. **Atenção:** A digestão enzimática pode ser realizada com o conjunto de enzimas celulase 2% / pectinase 20% ou com celulase 3% / pectoliase 1%, sendo este último mais eficiente, pois a pectoliase ataca não apenas a pectina, mas também outras estruturas de carboidratos nas paredes celulares das plantas, sendo considerada uma superenzima. No entanto, a pectoliase é mais cara em comparação com a pectinase.
4. Lave as raízes novamente em água destilada por três vezes (5 minutos cada lavagem).

- 
5. Com o auxílio de um estereomicroscópio (lupa), transfira uma raiz para a lâmina e adicione uma gota de ácido acético 45%. Remova a coifa e as capas mais externas da raiz, deixando apenas o meristema, e corte o tecido meristemático em pedaços pequenos (maceração).
 6. Cubra com uma lamínula e bata cuidadosamente com uma agulha de ponta rombuda diretamente sobre os fragmentos de meristema. Verifique o espalhamento ao microscópio e esmague o material colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, pressionando-o com cuidado para evitar que a lamínula deslize.
 7. Congele o conjunto lâmina-lamínula em nitrogênio líquido por 2 minutos e, com o auxílio de um bisturi ou lâmina de barbear, retire rapidamente a lamínula.
 8. Seque a lâmina à temperatura ambiente (a lâmina pode ser disposta em suporte de madeira ou outra superfície que permita a secagem do material a ser corado para posterior coloração convencional ou diferencial (ver item 4.1 e 4.2, respectivamente). **Atenção:** é indicado realizar a coloração diferencial apenas após três dias de envelhecimento da lâmina, pois observações indicam que a desidratação das células parece melhorar a estabilidade dos corantes fluorescentes, e, portanto, ajuda na melhor definição das bandas.

3.2 Técnica de coloração seguida por esmagamento (ver Anexo 3):

A hematoxilina acética solução 1% e Orceína acética solução 2% são os corantes utilizados nessa técnica. No entanto, será descrito apenas o procedimento de coloração com hematoxilina, por ser mais prático. Com o auxílio de uma pinça e seringas:

1. Retire as raízes do fixador.




2. Lave as raízes duas vezes em água destilada por cinco minutos; enxugue-as rapidamente com papel absorvente.
3. Hidrolise as raízes em HCl 5N por 20 minutos.
4. Lave as raízes três vezes em água destilada por cinco minutos e seque-as rapidamente.
5. Transfira as raízes para um microtubo de 1,5 mL e adicione duas ou três gotas de hematoxilina solução 1%. Mantenha o microtubo fechado por 20 minutos.
6. Para o preparo da lâmina, coloque uma raiz na lâmina e adicione uma gota de ácido acético solução 45%.
7. Retire a coifa e as camadas de células do tecido diferenciado, procurando manter apenas o tecido meristemático.
8. Fragmente esse tecido o máximo possível e cubra-o com uma lamínula.
9. Bata ligeiramente com uma seringa com agulha de ponta rombuda, procurando espalhar em uma única camada todo o tecido meristemático fragmentado.
10. Controle a qualidade da lâmina no microscópio. Caso visualize que o material meristemático ainda está muito aglomerado, dê mais algumas leves batidas com a seringa de ponta rombuda. Em seguida, pressione firmemente o conjunto lâmina/lamínula/tecido meristemático esmagado entre o papel filtro dobrado.
11. **Atenção:** essa etapa do esmagamento é crítica, pois mantém os cromossomos e núcleos interfásicos em um mesmo plano, além de proporcionar o espalhamento final dos cromossomos. O esmagamento deve ser feito com bastante cuidado para evitar o deslizamento da lamínula sobre a lâmina, o que pode provocar o “enrolamento” das células com consequente amontoamento dos cromossomos.

12. Selecione as melhores lâminas ao microscópio, selando-as com esmalte incolor e fotografando-as em seguida. Com o uso dessa técnica, os cromossomos e núcleos interfásicos coram de marrom e a lâmina permanece em condições de ser fotografada por um período de um a dois dias.

3.3 Técnica de dissociação de células meristemáticas por sonicação-DCMS (ver Anexo 4):

Esse procedimento tem respondido muito bem ao preparo de lâminas permanentes de cactos e de outras espécies.

1. Retire as raízes do fixador Carnoy armazenadas no freezer com a ajuda de uma pinça.
2. Lavagem:
 - Coloque as raízes selecionadas em um microtubo de 1,5 mL e adicione água destilada ou Milli-Q (água ultrapura).
 - Lave as raízes por duas vezes, cinco minutos cada.
 - Para a troca de água, utilize uma seringa de 5mL.
3. Corte das pontas das raízes:
 - Transfira as raízes lavadas para uma lâmina e, com o auxílio de uma lupa, corte as pontas das raízes com um estilete (tecido meristemático).
 - Remova o excesso de água das pontas das raízes usando papel filtro e transfira-as para outro microtubo de 0,5 mL.
4. Digestão enzimática:
 - Adicione 10 μ L de enzima (celulase 3% /pectoliase 1%) nas pontas de raízes presentes no microtubo, usando a micropipeta de 10 μ L.

- 
- Incube por 60 minutos na estufa a 37 °C.
 - Para essa etapa, deixe o microtubo em uma espécie de câmara úmida para incubação.

5. Preparação do fixador: 3:1 (metanol: ácido acético)

- Faltando 15 minutos para completar o tempo da digestão enzimática, prepare o fixador e guarde-o no freezer à -20 °C até aplicação.
- Para a quantidade de raízes mencionada (2-3 raízes), prepare 100 µL do fixador (50 µL para lavagem e 50 µL para embeber as raízes).

6. Lavagem com fixador:

- Após completar o tempo da digestão enzimática, remova a enzima com a ajuda de papel filtro cortado em tiras finas.
- Adicione 50 µL do fixador (metanol: ácido acético) no microtubo. Em seguida, remova o fixador usando a seringa de 1 mL e acrescente os 50 µL restantes de fixador, embebendo as raízes nessa solução (utilize uma micropipeta de 200 µL).

7. Sonicação:

- Leve o microtubo contendo as pontas de raízes para o banho ultrassônico.
- Realize a sonicação por 40 - 60 segundos.
- Observe se houve completa dissociação celular, ou seja, a obtenção da suspensão celular.

8. Armazenamento da suspensão celular:

- Após o processo de sonicação e obtenção da suspensão celular, os microtubos contendo a suspensão podem ser armazenados no freezer por até 6 meses ou usados para confecção imediata da lâmina.

9. Preparação imediata da lâmina:

- Aplique 10 μ L da suspensão de células por lâmina e deixe secar ao ar livre.

10. Fixação da suspensão celular na lâmina:

- Após a secagem completa, mergulhe rapidamente as lâminas em ácido acético a 60%, mantenha em frasco Borel de 25mL.
- Coloque as lâminas em uma placa de ferro e incube por 20-30 minutos em uma estufa a 37 °C.

11. Coloração da lâmina (ver detalhes no item 4.0):

- Ao final desse tempo, as lâminas com a preparação cromossômica (uma vez secas) podem ser coradas com coloração convencional ou diferencial (ver 4.1 Coloração convencional).
- **Atenção:** se for utilizar coloração convencional, antes de corar com Giemsa ou hematoxilina, hidrolise as lâminas com HCl 5N por 20 minutos. Para coloração diferencial, não é necessário essa etapa.





4. Coloração das lâminas

A escolha do corante dependerá do objetivo e material a ser analisado, bem como da disponibilidade de recursos do laboratório. Alguns corantes coram os cromossomos indistintamente (Ex.: Giemsa, hematoxilina, orceína acética e carmim acético), sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição do DNA ou de proteínas, conhecida como *coloração convencional*. Outros corantes coram distintivamente (Ex.: cromomicina A₃ e 4',6'-diamino-2-fenil-indol), ou exclusivamente, um determinado tipo de cromatina por meio de fluoróforos ou fluorocromos, coloração conhecida como *coloração diferencial*.

Em nossa análise cromossômica de cactáceas, usamos mais frequentemente a dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI, que revelam não apenas o número, mas também a morfologia e a localização da heterocromatina constitutiva. CMA (cromomicina A₃) destaca regiões ricas em GC (guanina-citosina), enquanto DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) destaca regiões ricas em AT (adenina-timina), servindo como contracorante em técnicas de bandeamento cromossômico, FISH e GISH. Embora a coloração com fluorocromos ofereça detalhes precisos, é importante notar que a coloração convencional com Giemsa ou hematoxilina é uma alternativa acessível, eficiente e fácil quando não se dispõe de um microscópio de fluorescência.

A seguir, será detalhadamente descrita a coloração convencional com Giemsa e hematoxilina, bem como a coloração diferencial com CMA/DAPI.

4.1 Coloração convencional

Coloração com Giemsa – Coloque 1 mL de solução estoque Giemsa em um frasco plástico porta-lâminas com ranhuras de 40 mL, complete com água destilada e, em seguida, mergulhe as lâminas previamente preparadas com hidrólise em HCl 5N como descrito no item 3.1. **Atenção:** o tempo de coloração varia de acordo com o tamanho dos cromossomos e com a concentração e qualidade do corante. Espécies com cromossomos pequenos podem precisar de 10 a 20 minutos, como no caso das cactáceas, enquanto espécies com cromossomos grandes, como cebola (*Allium cepa*), coram bem com 5 minutos ou menos (ver Guerra e Souza, 2002). Ao retirar as lâminas da solução corante, lave-as com um jato de água destilada para retirar o excesso de corante, e seque em seguida com uma bomba de ar.

Coloração com hematoxilina acética 1% - é realizada em lâminas previamente preparadas com hidrólise em HCl 5N (ver item 3.1), que após secas, deve-se colocar uma gota de hematoxilina acética 1% e cobrir com uma lamínula 20 X 20 mm. Cheque as lâminas ao microscópio, retire a lamínula com um jato de água destilada e seque com uma bomba de ar.

Montagem da lâmina permanente - Após secagem das lâminas coradas com Giemsa ou hematoxilina, adicione uma gota de meio de montagem (Entellan®), cubra o material com lamínula 22 X 22 mm, deixando, em seguida o meio endurecer. As lâminas assim preparadas podem ser estocadas por longos períodos.

Na figura 13, no exemplo que se segue, podemos observar células de representantes de cactáceas obtidas por meio da técnica de esmagamento, seguida de coloração com Giemsa.

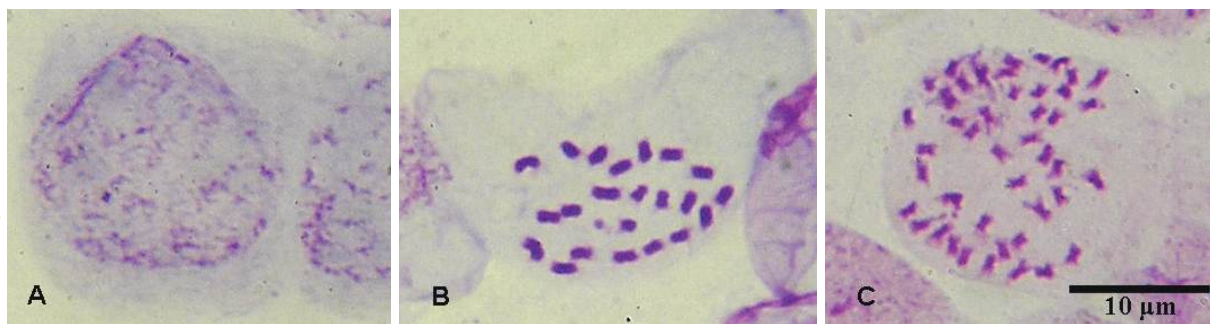


Figura 13. Células de espécies de Cactaceae coradas com Giemsa. **A.** Núcleo interfásico semireticulado (*Arrojadoa rhodantha*), **B.** *A. rhodantha* ($2n = 22$), **C.** *Tacinga inamoena* ($2n = 44$). (Fotos: Lânia Alves).

4.2 Dupla coloração CMA/DAPI

Para a coloração CMA/DAPI, utilize as lâminas previamente selecionadas e armazenadas por três dias à temperatura ambiente. Para a seleção, seque as lâminas (se necessário), corando-as com DAPI/glicerol (1 µg/mL). Após escolher as melhores lâminas, remova a coloração com Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 30 minutos, seguido de etanol 100% por 2 horas ou de um dia para o outro.

Atenção: testes realizados nos laboratórios de citogenética da UFPE e UFPB com vários grupos de plantas mostraram que a descoloração não é necessária (Jéssica Aguiar e Angeline Santos, com. Pess., 18 de agosto de 2022).

Portanto, após o envelhecimento por três dias, a lâmina pode ser corada com CMA e montada com meio de montagem tampão McIlvaine/glicerol (1:1) contendo DAPI. **Atenção:** O meio de montagem tampão McIlvaine/glicerol (1:1) apresenta na sua composição $MgCl_2$ para garantir a estabilidade do CMA na lâmina.

Nesse caso, a dupla coloração com CMA/DAPI pode ser simplificada, pois o meio de montagem já contém esse fluorocromo. No entanto, em caso de dúvida, siga o protocolo padrão depois da etapa de envelhecimento das lâminas por três dias, conforme descrito a seguir:

Coloração com CMA (0,5 mg/mL) – Aplique 10 µL de CMA nas células na lâmina. Cubra com uma lamínula 22 x 22 mm. Incube as lâminas em câmara úmida, em local escuro, à temperatura ambiente por 60 minutos. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada. Seque a lâmina rapidamente com uma bomba de ar.

Coloração com DAPI (1 µg/mL) – Aplique 10 µL de DAPI nas células na lâmina. Cubra com uma lamínula 22 x 22 mm. Incube as lâminas em câmara úmida, em local escuro, à temperatura ambiente por 30 minutos. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e seque rapidamente com bomba de ar.

Montagem de lâminas semipermanentes – Após coradas e secas, coloque uma gota de meio de montagem McIlvaine/glicerol (1:1), cubra com uma lamínula 22 x 22 mm e comprima ligeiramente entre duas folhas de papel de filtro para remover o excesso de meio. Passe base (esmalte incolor) nas bordas da lamínula. Guarde em caixa escura por, pelo menos, três dias antes de analisá-la ao microscópio.

Descoloração de lâmina – As lâminas para descorar devem ser colocadas em um frasco plástico porta-lâminas com ranhuras ou jarro de Coplin contendo fixador Carnoy 3:1 por 30 minutos. Após o tempo transcorrido, troque o fixador por etanol absoluto, deixando por 2 horas ou *overnight* (de um dia para outro). Depois de seca, a lâmina deve ser corada normalmente.

Na Figura 14 podemos observar células de cactáceas coradas com CMA/DAPI (visualizados em amarelo e azul, respectivamente), para exemplificar o método de coloração com fluorocromos. Observa-se que, nas figuras com regiões mais fortemente coradas com CMA, no DAPI, forma-se *gap* (lacuna) (ver inserto Fig. 14 F). Ou seja, não há a marcação do DAPI nas regiões terminais (ver Fig. 14 D, E), assim como essa marcação também não está presente nas regiões

pericentroméricas (Fig. 14 G, H) quando marcadas mais fortemente com o CMA (ou simplesmente CMA⁺; ver Quadro 1). Embora não tenha sido ilustrado aqui, o contrário também ocorre, ou seja, regiões fortemente coradas com DAPI formam gaps no CMA (para ter uma ideia dos diversos tipos de padrões de bandeamento encontrados em vegetais, consulte: Guerra, 2000; Barros - Silva e Guerra, 2010).

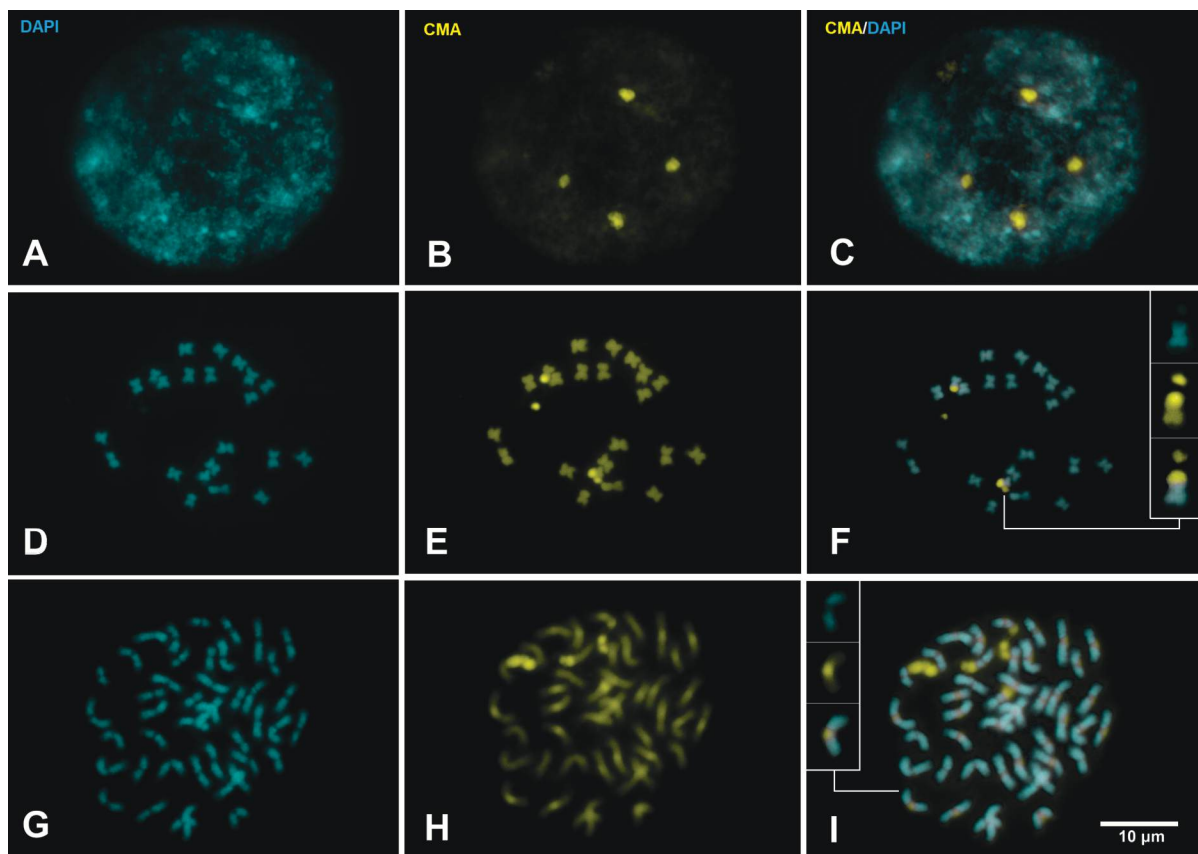


Figura 14. Células coradas com dupla coloração CMA/DAPI: A, D, G, células coradas com **DAPI**; B, E, H, células coradas com **CMA**; C, F, I, sobreposição de **CMA/DAPI**. A-C. Núcleo interfásico semireticulado (*Pilosocereus catingicola* subsp. *salvadorensis*). D-I. Espécies de Cactaceae com $2n = 22$ e 44 , respectivamente, os números mais frequentemente observados na família. D-F. *Epiphyllum phyllanthus* ($2n = 22$); G-I. *Pilosocereus catingicola* subsp. *salvadorensis* ($2n = 44$). Insertos em "F" e "I" destacam um cromossomo com banda no CMA e gap no DAPI. (Fotos: Lânia Alves).


5. Caracterização citogenética

Na citotaxonomia clássica, a evolução e a diversificação cariotípica de Cactaceae são investigadas com o auxílio de técnicas de coloração convencional por microscopia de campo claro, bem como por meio de técnicas de coloração diferencial por microscopia de fluorescência. No Anexo 5, encontram-se registros detalhados dos números cromossômicos ($2n$) e padrões de bandas heterocromáticas em Cactaceae, os quais representam uma contribuição significativa para a compreensão da evolução cariotípica desse grupo de plantas a nível do Brasil, abrangendo cerca de 54% dos gêneros e 24% das espécies.

O uso de corantes convencionais e fluorescentes possibilita determinar a variabilidade cromossômica numérica, a fórmula cariotípica, o número e a posição de satélites, a estrutura e a organização heterocromática em cromossomos mitóticos e meióticos, permitindo o reconhecimento de possíveis híbridos e seus parentais.

5.1 Determinação do número, tamanho cromossômico e padrões de bandas

a) Número cromossômico ($2n$) - para a determinação segura do número cromossômico, é preciso realizar a contagem cromossômica em pelo menos 5 a 10 metáfases, anotando os números encontrados em cada um dos indivíduos. Estas devem estar bem espalhadas e visualizadas em aumento de 100x no microscópio de campo claro e, posteriormente, confirmada por meio de uma imagem fotográfica da metáfase em softwares que podem ser usados para contagem e medição de cromossomos, além de edição de imagens, como o **ImageJ®**, ferramenta de domínio público (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), destinado a processamento de imagens, ou qualquer outra versão mais atualizada de programas similares.

Para a contagem cromossômica, abra a figura da célula fotografada na objetiva de 100x; em seguida, clique em 'Multi-point' , localizado na barra de ferramentas

do **ImageJ®**. Com isso, é possível contar os cromossomos clicando em cima de cada um deles. Veja abaixo na Figura 15.

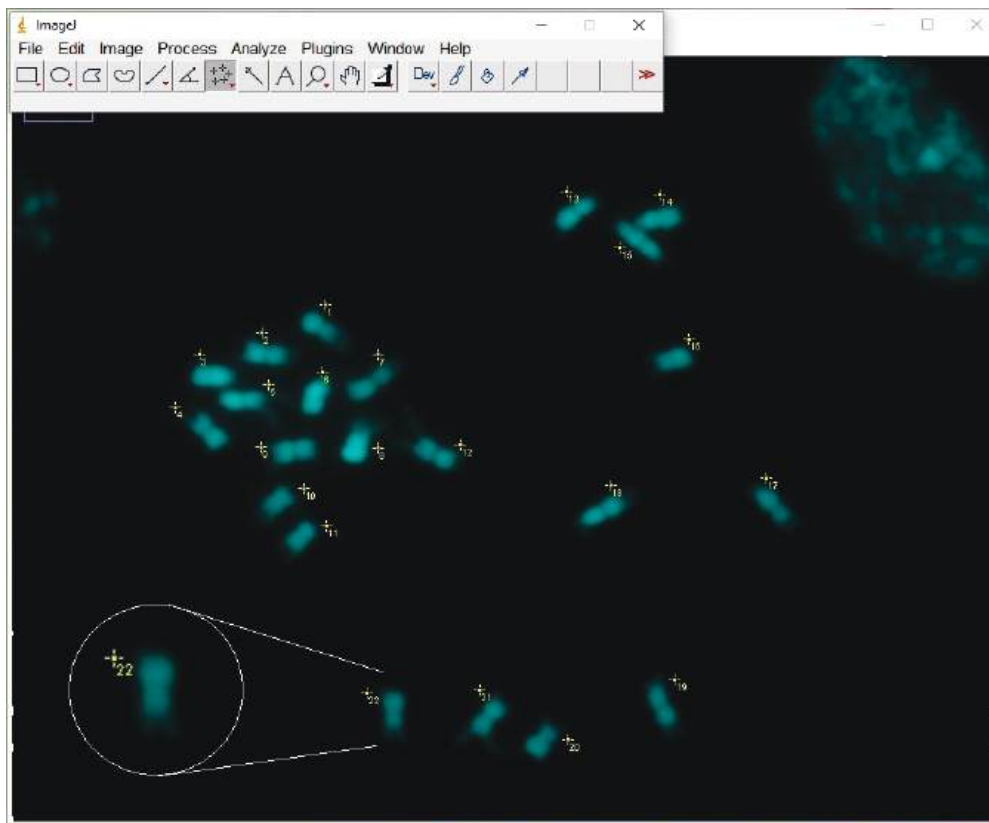




Figura 15. Contagem cromossômica de *Tacinga braunii* com o software ImageJ ($2n = 22$).

b) Tamanho cromossômico (μm) – Determina-se inicialmente a localização do centrômero, a partir do qual são realizadas medições do braço curto (c) e do braço longo (l) dados em micrômetros (μm). O programa ImageJ® também pode ser usado, desde que corretamente calibrado a partir de imagem de escala fotografada em objetiva de 100x (ideal para visualização dos cromossomos). Esta escala é proveniente da lâmina micrométrica do microscópio, item que normalmente acompanha o equipamento em questão, e é dividida em partes de 0,01 mm, correspondente a 10 μm entre extremidades (ver Figura 16A e 16B). Como procedimento padrão, após abrir a figura da escala 100x pelo programa, medir os

espaçamentos entre as barras ($=10\ \mu\text{m}$) da escala usando a ferramenta “Straight”  (ver Figura 16). Em seguida, realizar a calibração através da barra do Menu por intermédio da aba *Analyze* → *Set Scale*. Ao digitar o número 10 (equivalente a $10\ \mu\text{m}$) em *known distance* → “Global” (V) → OK, a calibração estará completa. O próximo passo é abrir a imagem desejada para fazer as medições cromossômicas em ' μm ', usando a ferramenta  (Straight). Em seguida, pressionar “Ctrl + M” ou selecionar *Analyze* → *Measure*. Você obterá as medições listadas no *Results* (ver Figura 18).

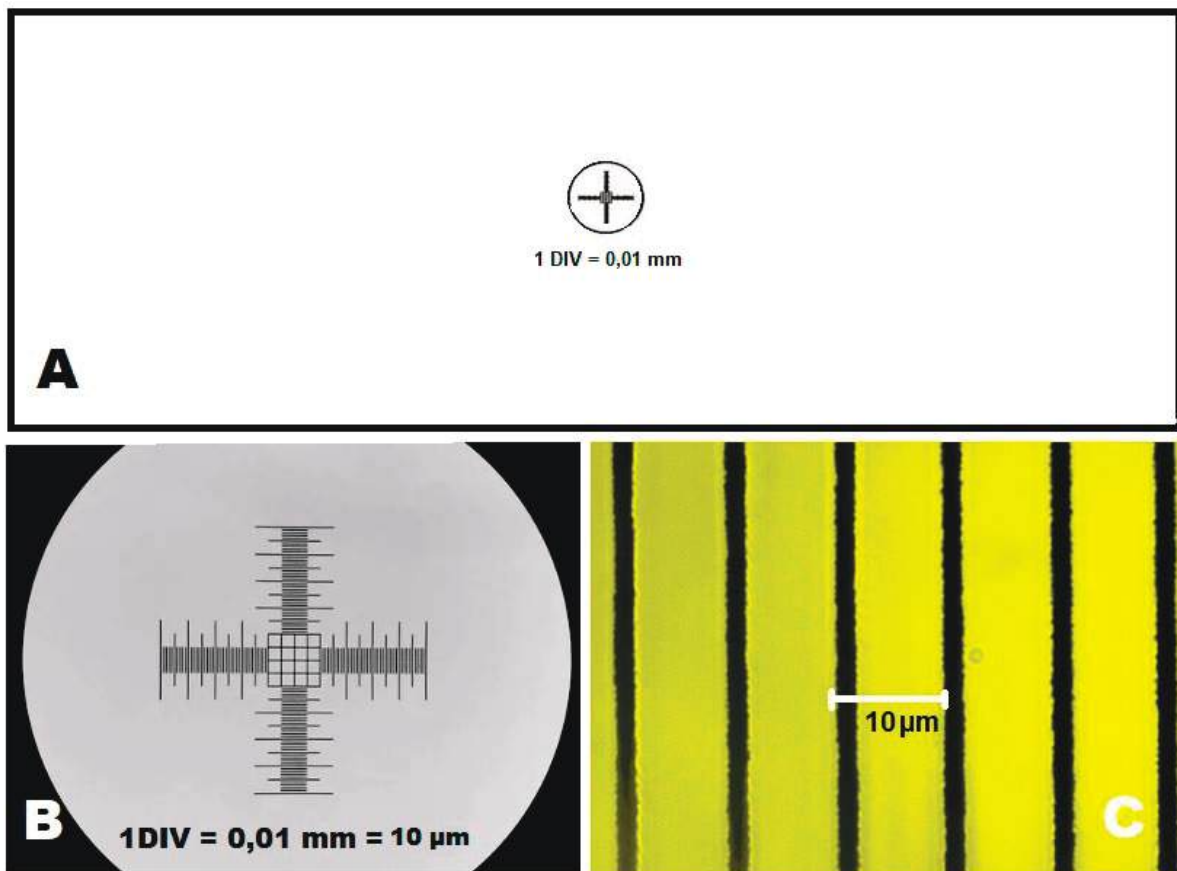


Figura 16. Modelo ilustrativo da lâmina micrométrica do microscópio (A); Escala da lâmina micrométrica fotografada em objetiva de 10x (B); Ampliação da escala com uma objetiva de 100x (C).

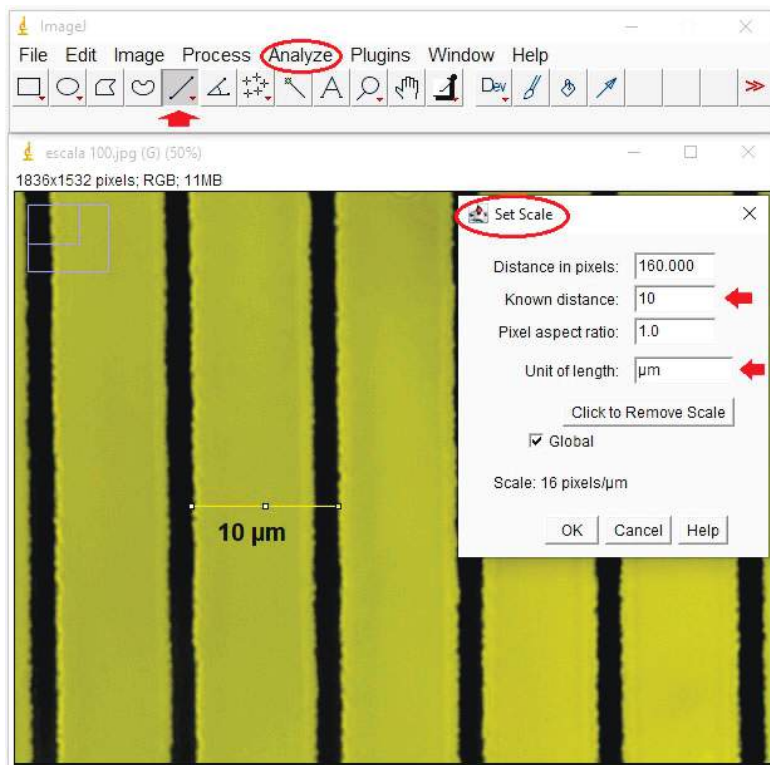
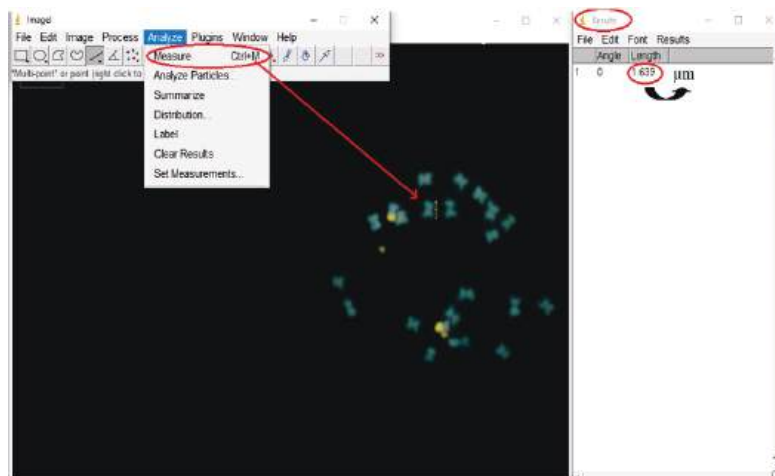


Figura 17. Imagem da escala fotografada na objetiva de 100x aberta pelo ImageJ para calibração. Seta vermelha aponta na barra a ferramenta *Straight* usada para medir. Setas vermelha da caixa “Set Scale” apontam para *Known distance* e *Unit of length* indicando o valor de calibração inserido (= 10) e unidade desejada (micra = μm), respectivamente. A barra branca mede a distância de fora para dentro entre as barras pretas, correspondendo a 10 μm .

Figura 18. Célula metafásica de *Epiphyllum phyllanthus* usada na Representação dos últimos passos para medição dos cromossomos em μm . Seta vermelha aponta a função “Measure” ou “Ctrl+M” que calcula o tamanho do cromossomo mensurado em μm . Os valores resultantes aparecem ao lado na caixa “Results” (circulados em vermelho).



c) Padrões de bandas heterocromáticas (CMA/DAPI) – As regiões heterocromáticas podem ser visualizadas *in situ*, ou seja, diretamente nos cromossomos, por formarem blocos fortemente corados com Giemsa após o uso da técnica de bandeamento C (bandas C) ou com os fluorocromos CMA e DAPI (bandas CMA/DAPI). A localização dessas regiões, diferencialmente coradas, auxilia em uma melhor compreensão de como os genomas estão organizados e, muitas vezes, contribuem para esclarecer os limites taxonômicos entre espécies e gêneros. Regiões da cromatina coradas mais fortemente com DAPI, regiões DAPI+, apresentam sequências repetidas em tandem ricas em adenina e timina (AT). Por outro lado, regiões coradas, preferencialmente, com CMA (ou CMA+) são sequências repetidas em tandem, ricas em guanina e citosina (GC) (ver Fig. 19; Quadro 1). Adicionalmente, outras regiões, podem ser mapeadas fisicamente no cromossomo, a exemplo dos sítios de DNA ribossomais, através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas marcadas com fluorocromos (Ex.: FITC, Cy3 e Rodamina), que permitem sua visualização e localização.

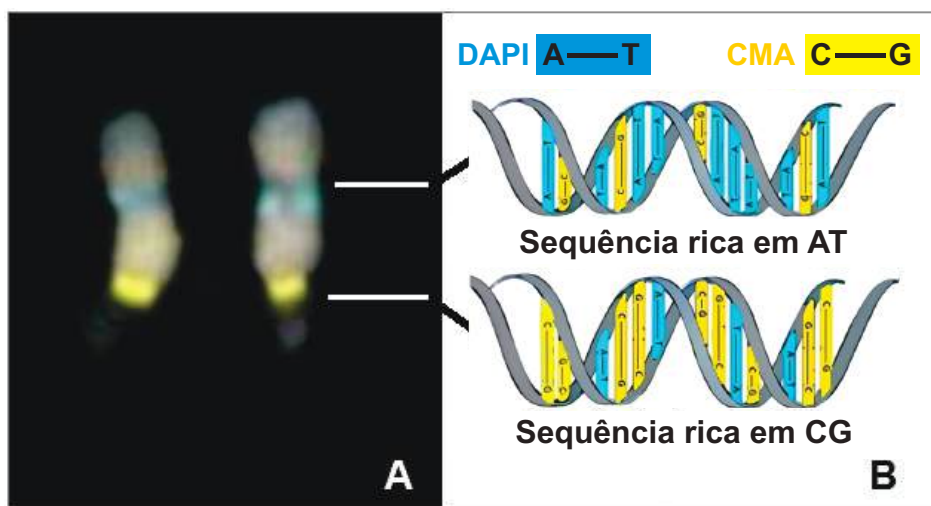


Figura 19. Bandas heterocromáticas diferencialmente coradas (*Neomarica-Iridaceae*). **A.** Cromossomos homólogos destacando-se nas regiões fortemente coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul). **B.** Representação esquemática das sequências ricas em AT (adenina-timina) e sequências ricas em CG (citosina-guanina). (Fonte: Lânia Alves).



Quadro 1. Possíveis padrões de bandas heterocromáticas observados nos cariótipos de plantas.

Tipos de bandas heterocromáticas	Significado	Ocorrência nos cariótipos
CMA ⁺ /DAPI ⁻	Banda mais (+) fortemente corada com CMA (rica em GC), e não corada (-) para essa mesma posição com DAPI.	comum
CMA ⁻ /DAPI ⁺	Banda mais (+) fortemente corada com DAPI (rica em AT), e não corada (-) para essa mesma posição com CMA.	comum
CMA ⁺ /DAPI ⁰	Banda mais (+) fortemente corada com CMA (rica em GC), e neutra (0) para essa mesma posição com DAPI.	Menos frequente
CMA ⁰ /DAPI ⁺	Banda mais (+) fortemente corada com DAPI (rica em AT), e neutra (0) para essa mesma posição com CMA.	raro
CMA ⁰ /DAPI ⁰	Banda neutra (0), região dos cromossomos coradas uniformemente com DAPI e CMA.	raro
CMA ⁰ /DAPI ⁻	Banda neutra (0) com CMA, e não corada (-) para essa mesma posição com DAPI.	raro
CMA ⁻ /DAPI ⁰	Banda neutra (0) com DAPI, e não corada (-) para essa mesma posição com CMA.	raro
C-CMA ⁺	Banda mais (+) fortemente corada com CMA (rica em GC), mas observadas após bandeamento C, seguida da dupla coloração CMA/DAPI.	Comumente visualizada após bandeamento - C

Quadro 1. Continua...

Tipos de bandas heterocromáticas	Significado	Ocorrência nos cariótipos
C-DAPI ⁺	Banda mais (+) fortemente corada com DAPI (rica em AT), mas observadas após bandeamento C, seguida da dupla coloração CMA/DAPI.	Comumente visualizada após bandeamento - C
F-DAPI ⁺	Banda mais fortemente corada com DAPI, considerada falsa banda DAPI (F-DAPI), pois só é observada após FISH.	Comumente visualizada após FISH

Nota: Para mais detalhes, consulte Barros-Silva e Guerra (2010); Barros-Silva e Guerra (2023).

5.2 Tipos e partes funcionais do cromossomo

Para as descrições dos cariótipos analisados, é importante conhecer os **tipos cromossômicos** e as **partes funcionais dos cromossomos**, independentemente da técnica ou coloração utilizada.

a) Tipos cromossômicos e fórmula cariotípica (FC) - Os tipos cromossômicos, de acordo com a nomenclatura proposta por Guerra (1986), podem ser definidos de acordo com a posição do centrômero, no qual os valores de *r* (razão entre os braços cromossômico) e *ic* (índice centromérico) indicam os limites de variação para cada tipo. **M** = Metacêntrico (centrômero em posição mediana); **SM** = Submetacêntrico (centrômero pouco deslocado da região mediana); **A** = Acrocêntrico (centrômero próximo de um dos extremos do cromossomo, braços cromossômicos visivelmente de tamanho distintos); **T** = Telocêntrico (centrômero situado na extremidade, resultando em um único braço). Logo, a fórmula cariotípica (FC) é dada a partir da determinação dos tipos cromossômicos: **FC = M+SM+A+T**. Observe através da Figura 19, que quanto maior o valor de *r* ou menor o *ic* dos cromossomos do cariótipo, maior será o número de tipos acrocêntricos e/ou telocêntricos na fórmula cariotípica.

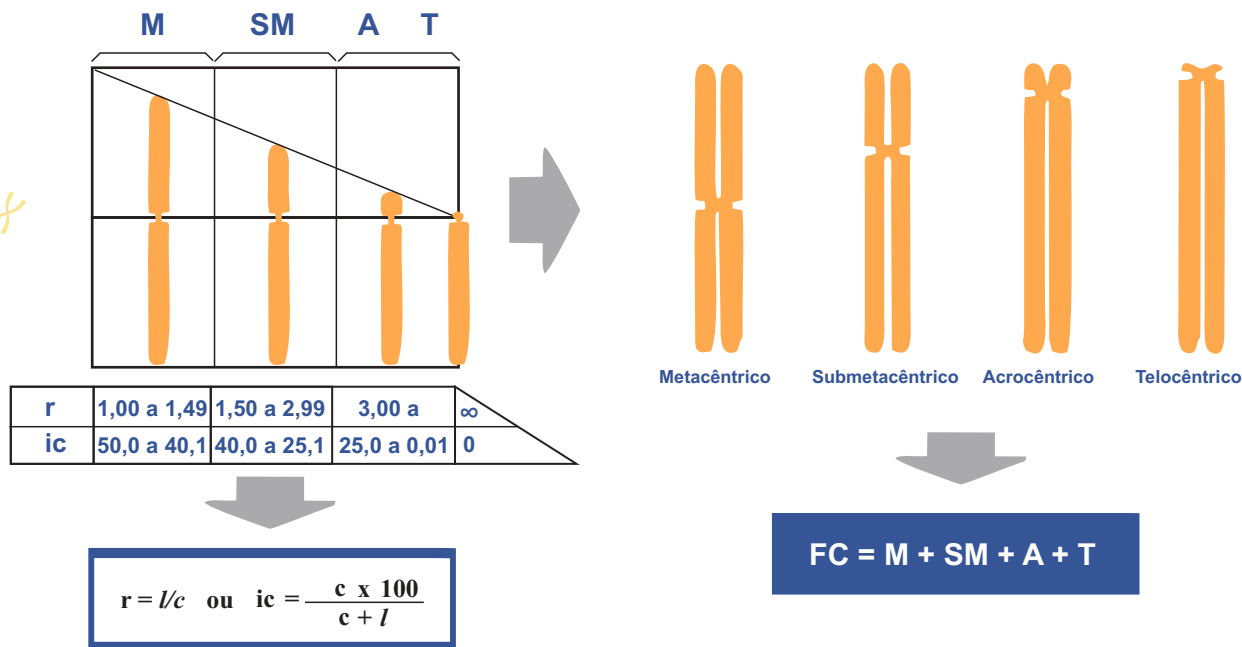


Figura 20. Tipos cromossômicos (M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, A = acrocêntrico e T = telocêntrico) obtidos a partir da razão entre os braços cromossômicos (r) ou do índice centromérico (ic). **FC** = Fórmula cariotípica, determinada pelos tipos cromossômicos (Fonte: Guerra, 1988).

b) Partes funcionais do cromossomo - cada cromossomo metafásico do cariótipo é sempre formado por duas cromátides-irmãs, cada uma das quais constituídas por uma única molécula de DNA, associada a proteínas e RNA:

As cromátides-irmãs são cópias idênticas de um mesmo cromossomo, unidas através do centrômero (construção primária), que é visualizado como uma região delgada e fracamente corada. O centrômero, que tem a função de assegurar a segregação ordenada durante a divisão celular, divide o cromossomo em dois braços cromossômicos de tamanhos distintos, denominados **braços curtos (c)** e **longos (l)**. Em alguns cromossomos do cariótipo, é possível observar uma segunda região cromossômica mais fracamente corada, chamada **construção secundária (Cs)**, onde ocorrem RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolos) contendo genes para os RNAr (RNA ribossomal). Ligada a essa região, pode-se observar uma pequena porção cromossômica conhecida como a região do **satélite (sat)**. Nos terminais

cromossômicos fica a região denominada de **telômero (t)**, que desempenha um papel fundamental na estabilidade cromossômica ao protegê-los contra a perda progressiva de material genético durante a replicação celular.

Além dessas regiões funcionais mencionadas anteriormente, existem outras regiões cromossomicamente importantes para a descrição cariotípica, como a região **pericentromérica (pe)** - em torno do centrômero; **região proximal (p)** - próxima ao centrômero; a **região intercalar** ou **intersticial (i)** - porção intermediária dos braços cromossômicos; e a **região terminal** ou **telomérica (t)** - porção terminal dos braços cromossômicos (Fig. 21).

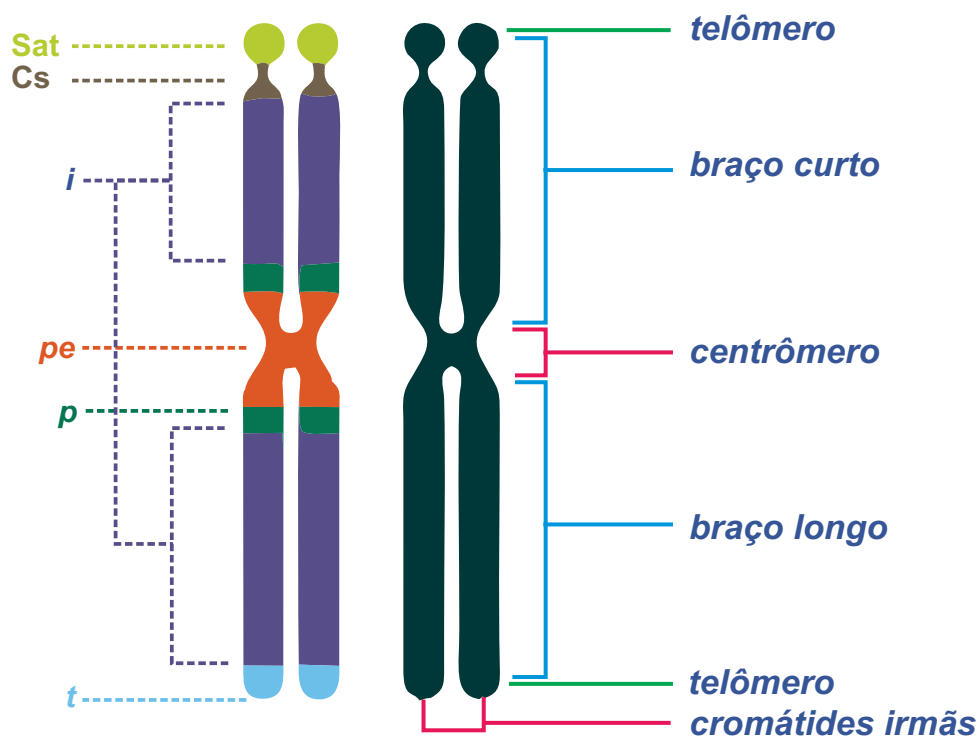


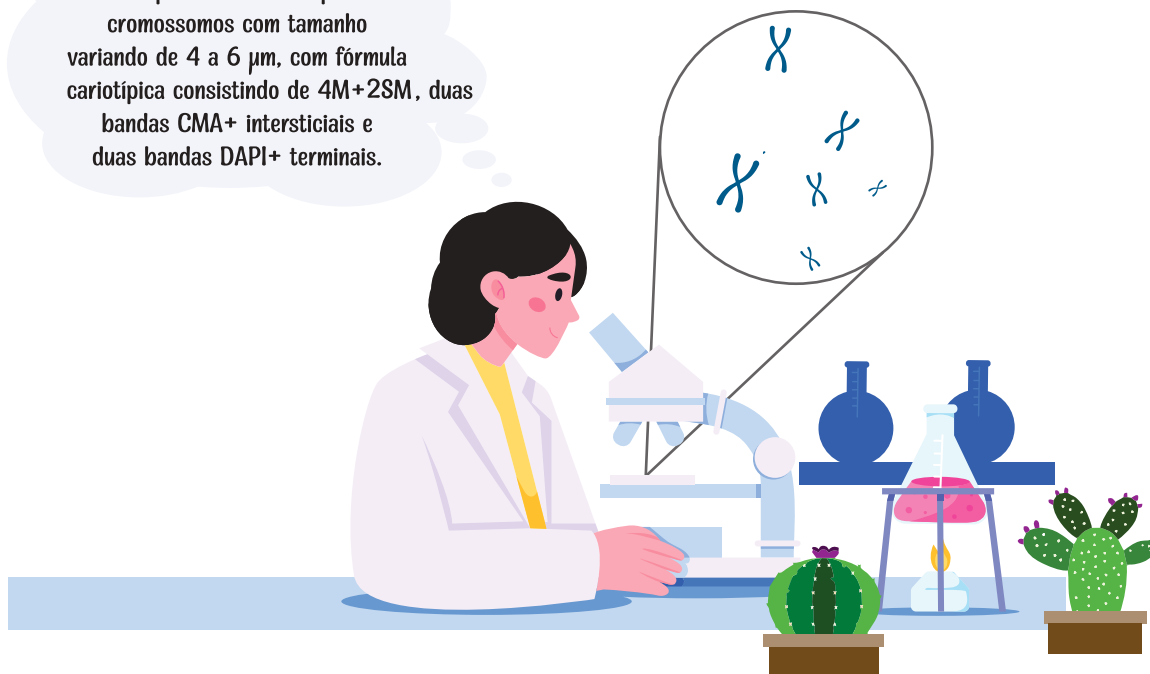
Figura 21. Partes funcionais do cromossomo. Visão geral (à direita): cromátides irmãs, braço curto, braço longo, telômero e centrômero. Visão detalhada (à esquerda): **Sat** = satélite, **Cs** = constricção secundária, **i** = região intercalar ou intersticial, **pe** = região pericentromérica, **p** = proximal e **t** = terminal ou telomérica.

5.3 Como descrever o cariótipo

De modo geral, o cariótipo deve ser descrito a partir das informações das análises citogenéticas aplicadas, através das quais serão apontadas todas as características visualizadas, desde o tipo de núcleo interfásico, à presença ou ausência de regiões ricas em GC ou AT, ou ainda sítios de DNA ribossomais. A descrição cariotípica pode-se iniciar, por exemplo, com simples informações de número, tamanho cromossômico, fórmula cariotípica (FC), padrões de bandas heterocromáticas e regiões peculiares. Outras informações podem ser obtidas por meio de técnicas mais refinadas e sensíveis, como a FISH e suas variantes, permitindo a obtenção de dados sobre o mapeamento físico de genes ribossomais, sequências teloméricas, centroméricas e demais sequências de DNA repetitivo ou sequências de cópia única.

Exemplo meramente ilustrativo:

O cariótipo com $2n = 6$ apresenta cromossomos com tamanho variando de 4 a 6 μm , com fórmula cariotípica consistindo de $4M+2SM$, duas bandas CMA+ intersticiais e duas bandas DAPI+ terminais.




6. Apresentação de dados e softwares úteis na citogenética


Os resultados obtidos por quaisquer técnicas aqui citadas são geralmente apresentados sob a forma de **figuras, kariogramas, ideogramas e tabelas**, permitindo assim uma melhor visualização e organização das principais características kariotípicas. Além do ImageJ®, que possui recursos úteis para contagem e medições cromossômicas, anteriormente apresentado, recomenda-se o uso de outros softwares de edição de imagens, como Adobe Photoshop® e Drawid®, para aprimoramento de cores, contrastes de imagens e criação de representações gráficas, buscando uma visualização mais clara do kariótipo. Esses programas são interessantes para a construção de pranchas gráficas e fotográficas, kariogramas e ideogramas.

6.1 Prancha de figuras

O primeiro passo para analisar os dados cromossômicos, provenientes das técnicas descritas nos tópicos anteriores, é a preparação de pranchas normalmente salvas em formato comum de JPG/TIFF em qualidade de resolução de no mínimo 300dpi, características padrão para publicações em periódicos. As pranchas são feitas no intuito de ajudar na visualização kariotípica individual onde podem ser apontados individualidades de cada táxon analisado, como mencionado: número cromossômico, presença de RON's (regiões organizadoras do nucléolo) e bandas heterocromáticas.

Entre os softwares comumente utilizados para a montagem de pranchas, o Adobe Photoshop®  tem sido o mais frequente devido à simplicidade de uso e interface amigável. Esse software possui algumas versões gratuitas facilmente acessíveis, mesmo para pessoas que nunca o utilizaram. Os passos iniciais para a montagem e confecção de pranchas, resumidamente, são os seguintes:

1. Abra o programa e em uma nova página e configure o tamanho da página (25 cm de largura x 35,37 cm de altura e resolução = 300dpi). Insira as fotos de



DAPI, CMA e sobreposição (CMA/DAPI) nesse documento com resoluções menores (resolução $\cong 150$ pixels). A sobreposição do DAPI e CMA pode ser feita juntas no documento ou separadamente, visando otimizar a confecção da prancha. Para isso, basta colocar as duas fotos sobrepostas, sem alterar o tamanho original de ambas, selecione uma delas, e na caixa de funções à direita, escolha a função *Layers* \rightarrow *Lighten*, na barra de tarefas, que fará com que a imagem selecionada fique translúcida. Depois, posicione corretamente as imagens para que os cromossomos de ambas as fotos fiquem alinhados;

2. Recorte as figuras inseridas em tamanho adequado para montagem harmoniosa da prancha (Fig. 22). Use as guias para auxiliar tanto no posicionamento das imagens, como também para recortá-las nas mesmas dimensões, para isso, na barra de tarefas selecione *View* \rightarrow *Show* \rightarrow *Guides*.

Atenção: espécies com cromossomos pequenos, visando melhorar a visualização das células, é necessário recortar as fotos originais de modo a reduzir ao máximo a área sem cromossomos e ampliá-las em conjunto após seleção, evitando a distorção das imagens. Importante destacar que, tanto para aumentar ou reduzir, todas as fotos devem estar na mesma ampliação (resolução $\cong 150$ pixels).

3. Faça os ajustes de brilho/contraste dentre outros recursos disponíveis no programa, melhora a qualidade e visualização dos cromossomos, assim como evidencia os detalhes importantes. Para tanto, deve-se na barra de tarefas selecionar: *Image* \rightarrow *Adjustments* \rightarrow *Brightness/Contrast*; para este intuito.

Atenção: Cada uma das figuras sobrepostas poderão ter seus contrastes e brilhos regulados.

4. A prancha estará pronta quando as imagens estiverem devidamente identificadas de acordo com as espécies e munidas de escala que estimem o

tamanho cromossômico, além de setas e insertos destacando e apontando características intrínsecas de cada cariótipo, quando houver (Fig. 22). **Atenção:** a barra branca (= 10 µm) da prancha, é obtida através da calibração em escala laminar micrométrica fotografada na objetiva de 100x (ver Figura 16).

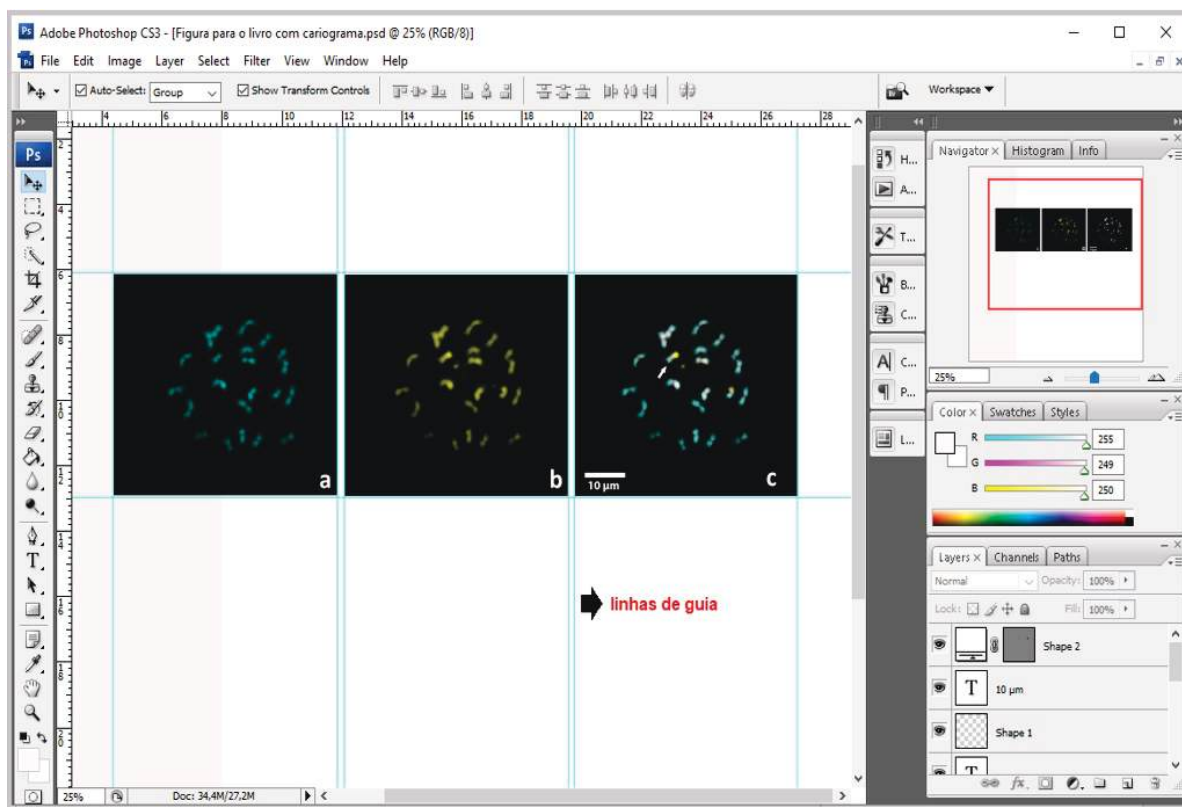


Figura 22. Metáfase de *Tacinga palmadora* utilizada na representação dos últimos passos para a confecção da prancha. Linhas azuis na horizontal e vertical são as *linhas de guia*.

Concluída a prancha, recomenda-se salvar tanto em formato editável (formato PSD do Photoshop) quanto em formato JPG ou TIFF. Mantenha a melhor qualidade para uma organização mais eficiente e precisa dos dados.

6.2 Cariograma

O cariograma é a representação gráfica do cariótipo, utilizando imagens reais dos cromossomos de uma metáfase. Nesta representação, os cromossomos são organizados em pares de acordo com a posição centromérica e forma, buscando evidenciar detalhes como a disposição dos homólogos, tamanho, alterações cromossômicas e classificação posicional centromérica (ver exemplo, Fig. 23d). Para criar um cariograma, utiliza-se fotografias dos cariótipos das espécies analisadas, onde as metáfases estão visualmente espalhadas e a forma cromossômica é nítida. Munidos de um software e suas ferramentas, cada cromossomo é recortado e posteriormente organizado em ordem decrescente de tamanho, independentemente da forma.

A preparação adequada para a obtenção de metáfases é crucial, pois imagens cariotípicas com predominância de sobreposições cromossômicas podem impossibilitar a montagem de cariogramas. As recomendações para a confecção de um cariograma são as mesmas especificadas na seção 6.1. Além disso, ao trabalhar com coloração diferencial é recomendável que o *background* (fundo) selecionado seja preto, para manter características similares às originais da imagem. Utilizando a foto do cariótipo da espécie analisada no Adobe Photoshop®, os passos iniciais para começar a montagem e confecção de seu cariograma serão estes:

1. Seleção de todo o cromossomo, usando a ferramenta **quick selection** ou **lasso** presente na barra vertical à esquerda, recortando através do Ctrl+X e colando no mesmo espaço com o Ctrl+V para, dessa forma, facilitar o movimento do fragmento de imagem conforme a necessidade. Esta ação deve ser repetida para todos os cromossomos até então identificados, onde o alinhamento por tamanho e em ordem decrescente deve ser buscado (Fig. 23d);

2. Após o recorte e o alinhamento decrescente por tamanho com centrômeros alinhados em uma mesma altura, uma minuciosa análise deve ser feita para identificar os possíveis pares de homólogos, de acordo com características já mencionadas como: tamanho, posição centromérica e dos padrões de bandeamento, ou qualquer outra característica visualizável (características conspícuas);
3. Por fim, a devida identificação da figura, por letras, nome científico da espécie, número e a colocação de barras de tamanho devidamente calibradas (5 ou 10 μm) para estimar o tamanho cromossômico devem ser inseridas (Fig. 23).

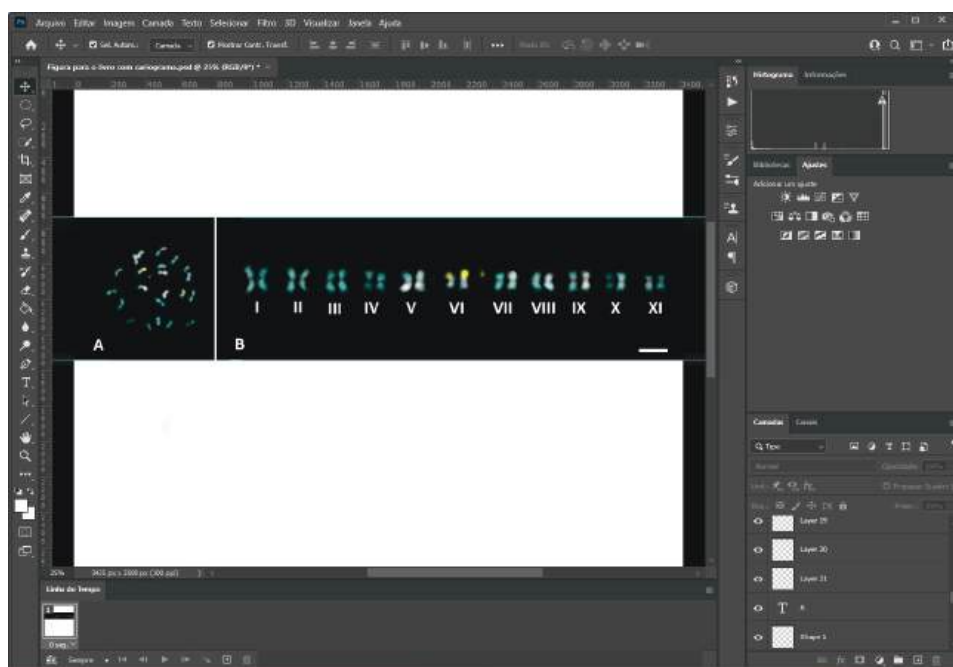


Figura 23. Metáfase de *Tacinga palmadora* utilizada na representação dos últimos passos para a confecção do cariógrama. Barras em "c" e "d" correspondem a 10 μm .

Como na seção anterior, ao término da confecção do cariógrama considere salvar primeiramente em formato PSD editável assim como em formato JPG ou TIFF, buscando sempre a manutenção da qualidade visual da imagem.

6.3 Ideograma

Outra forma de representação cariotípica detalhada, é a confecção de ideogramas (*ideo* = ideia + *gramma* = caráter de algo desenhado), caracterizado por esquemas gráficos dos cariótipos, idealizados a partir das medições cromossômicas, que possam destacar pontos importantes, como os centrômeros, constrições secundárias, resultados de colorações e impregnações. Atualmente, os ideogramas podem ser feitos em programas comuns como o CorelDRAW®, Adobe Photoshop® e DRAWID®.

A título de demonstração e por possuir interface intuitiva e dinâmica o DRAWID® possibilita produção instantânea de ideogramas dos cariótipos analisados, incluindo posições elucidativas como bandas heterocromáticas e sinais fluorescentes de hibridação *in situ* (FISH) (veja figura 24).

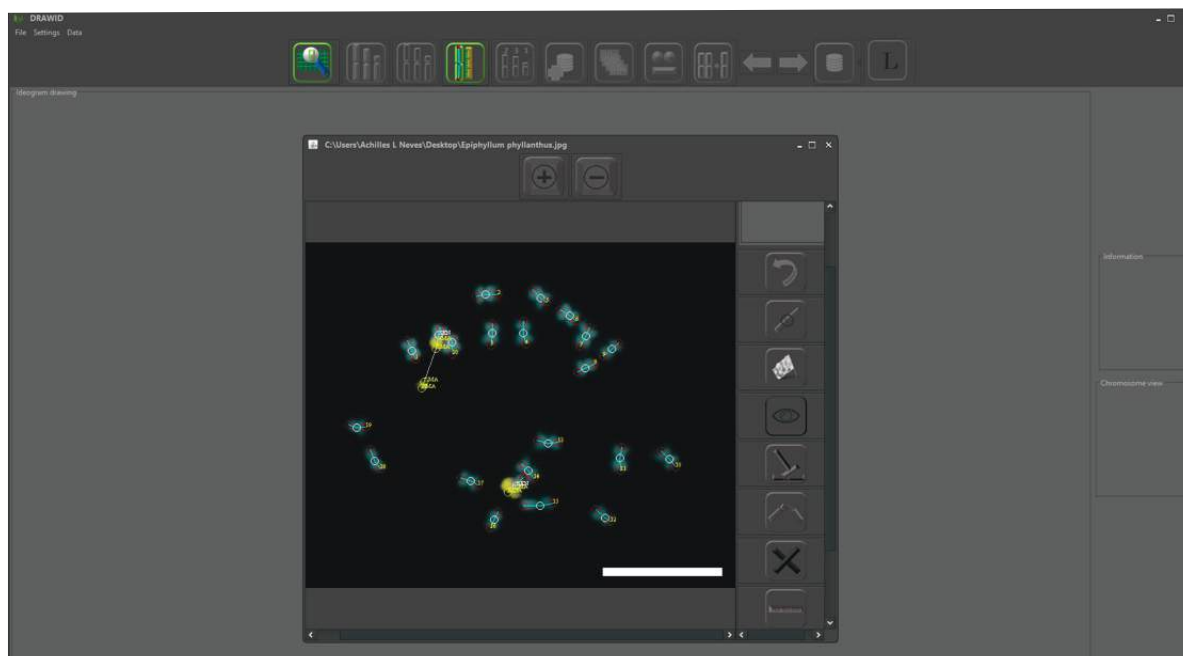


Figura 24. Cariotipo de *Epiphyllum phyllanthus* fornecido uma visão geral do DRAWID®.

Semelhante ao ImageJ®, o DRAWID® (DRAWing Ideogram – Desenhando Ideograma) possui escala conhecida, porém com calibração realizada ao fim das medições cromossômicas de cada cariótipo. Para isso o programa dispõe de uma barra de escala de tamanho conhecido – geralmente 10 µm – inserida na imagem analisada. O processo de análise dos cariótipos pelo DRAWID® é prático e está sumarizado na Tabela 1. Observe que os comandos 2, 4, 5 e 9, mais o comando S no *software*, devem ser feitos entre o início e o fim (comando 3) da medição de cada cromossomo.

Ao concluir as medições, o próximo passo é armazenar os dados e, para isso, é necessário salvar o progresso, basta clicar na aba *Data* → *Show Chromosome Table* → *Save xslx*, escolher pasta e o nome do arquivo desejado. Tanto os cromossomos como seus respectivos metadados serão salvos em uma planilha de Excel. Os metadados consistem em dados numéricos que contém o índice centromérico, tamanho cromossômico, tamanho cromossômico relativo, razão entre os braços e comprimento do braço curto e longo e podem ser revisados ao selecionar "*Show Metadata Table*". O ideograma produzido após as medições de todos os cromossomos do cariótipo pode também ser salvo, para isso basta clicar em *File* → *Save Figure*, escolher pasta e nome do arquivo desejado, onde ao lado do nome deve ser colocado a extensão do formato do arquivo a ser armazenado (ver exemplo, Fig. 25).

Tabela 1. Principais funções do DRAWID® em sequência de uso.

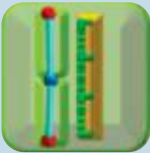
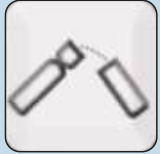


Etapas	Comando	Tecla de atalho	Função
1		-	Abrir a imagem JPEG que será analisada. Uma nova janela para as medidas cromossômicas será exibida.



Tabela 1. Continua...

Etapas	Comando	Tecla de atalho	Função
2		C	Marcar a posição do centrômero.
3		F	Determinar o fim da medição de cada cromossomo.
4		B	Marcar início e fim de uma banda heterocromática com, por exemplo, CMA ⁺ /DAPI.
5		D	Marcar sinais como pontos únicos. Exemplo sinais de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) ou genes únicos.
6		-	Desfazer qualquer ação na medição.
7		-	Remover todas as medições e marcações.
8		-	Remover medições de qualquer um dos cromossomos já mensurados.

Tabela 1. Continua...

Etapas	Comando	Tecla de atalho	Função
9		-	Unir cromossomos distendidos ou fragmentados. A primeira medição deve ser do fragmento contendo o centrômero; em seguida, meça o segundo fragmento sem o centrômero.
10		-	Calibrar as medições realizadas para "µm" ou outra unidade, utilizando a barra inserida na imagem previamente, cujo comprimento é conhecido.
11	-	S	Medir as regiões dos satélites dos cromossomos. São necessários dois cliques, o primeiro para iniciar e o segundo para finalizar a medição da região do satélite.
12		-	Clique no botão para visualizar o ideograma gerado após as medições. Para salvar a imagem do Idiograma, clique em Arquivo - Salvar Figura.

Fonte: <https://docplayer.net/94047787-Drawid-v0-26-manual.html>

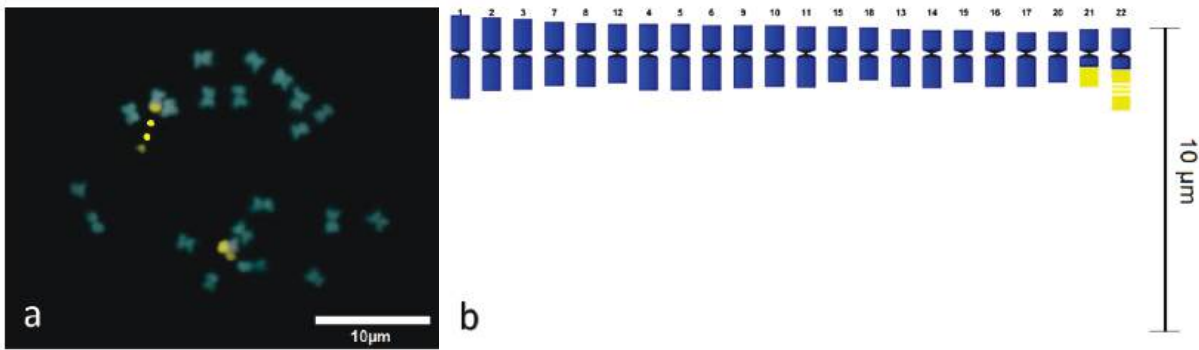


Figura 25. **A.** Célula metafásica de *Epiphyllum phyllanthus* corada com CMA/DAPI. **B.** Ideograma de *E. phyllanthus* produzido DRAWID. Linha pontilhada em "a" e tracejada em "b" apontam a distensão da banda CMA⁺ (ou RONS) do cromossomo 22.



6.4 Tabela

A apresentação dos resultados em forma de tabela permite a sumarização e exposição dos dados de maneira fácil e de rápida leitura. Geralmente, a tabela deve conter dados de coleta, como o nome científico da planta, número do coletor (ou coletores), local de coleta, além dos dados citogenéticos. Os dados de coleta presentes na tabela são informações imprescindíveis, pois permitem localizar o herbário onde se encontra o material testemunho (voucher), bem como onde foi coletada a amostra analisada. Os resultados apresentados na tabela podem conter dados cariológicos e/ou cariomorfométricos. Dados cariológicos, como número cromossômico ($2n$), fórmula cariotípica (FC), tamanho cromossômico (comprimento total do conjunto cromossômico haploide), padrões de bandas, sítios de DNA ribossomal e conteúdo de DNA nuclear (2C DNA). Contagens prévias de números cromossômicos encontrados na literatura também podem ser inseridas na mesma tabela, de forma que as colunas fiquem individualizadas, conforme mostra os exemplos 1 e 2 de tabelas apresentadas abaixo:

Exemplo 1.

Tabela 1. Dados cariológicos das espécies analisadas de ...

Taxon	voucher	Local de coleta	2n	FC	Tamanho cromossômico (µm)	Padrões de Bandas		DNAr		2C DNA (pg)	Referência
						CMA*/DAPI*	CMA*/DAPI*	5S	35S		

No exemplo 2, além dos dados de coleta, foram incluídas informações cariomorfométricas, como a média do comprimento cromossômico (**C**), a relação entre o cromossomo maior e o menor no complemento (**R**) e a média da relação entre os braços cromossômicos (**r**). Essas medidas são pré-requisitos para a determinação

dos índices de assimetria intracromossômica (**A₁**) e intercromossômica (**A₂**). Os índices (A₁ e A₂) revelam a assimetria cariotípica total (valores de índices ≈ 1) ou assimetria cariotípica relativa (valores de índices ≈ 0), identificando a variação na morfologia (A₁) e no tamanho cromossômico (A₂) presentes no cariótipo (para mais informações sobre esses índices consulte Zarco 1986; e para explorar esses e outros índices de assimetria usados para análises cariomorfométricas ver Medeiros Neto *et al*, 2017).


Exemplo 2.

Tabela 2. *Dados cariomorfométricos das espécies analisadas de ...*

Taxon	voucher	Local de coleta	2n	FC	Tamanho cromossômico (µm)	A ₁	A ₂

7. Componentes, cuidados e limpeza do fotomicroscópio

Nos laboratórios de citogenética, o uso de microscópios ópticos de campo claro e/ou de fluorescência na avaliação e análise de dados é imprescindível. Os fotomicroscópios epifluorescentes são equipados com sistemas de câmeras de alta qualidade para a produção de imagens com melhor resolução.



Geralmente, esses microscópios estão interligados a computadores equipados com softwares de captura e edição de imagens com interface interativa. Através desse sistema, a captura de fotografias por câmeras digitais pode ser realizada de forma eficiente, simples e rápida. Microscópios de epifluorescência permitem não apenas a análise, mas também a documentação dos resultados para reprodução e publicação.

O microscópio é um dos equipamentos essenciais e mais utilizados em um laboratório de citogenética. Devido ao seu custo elevado, é crucial adotar cuidados de manuseio rotineiro para manter seu perfeito funcionamento e garantir sua durabilidade. O conhecimento básico sobre os componentes, funcionamento e limpeza é fundamental para assegurar a longevidade do equipamento e seu funcionamento adequado. No entanto, é importante ressaltar que esses cuidados não substituem a manutenção periódica realizada por técnicos qualificados. A frequência dessa manutenção é inversamente proporcional à adoção de medidas preventivas para evitar danos.

7.1 Componentes básicos

Apesar das inúmeras mudanças ao longo dos anos para atender as mais diversas utilidades, o microscópio, de modo geral, é subdividido em **partes ópticas** (oculares, objetivas, diafragma, fonte de luz e filtros), e **partes mecânicas** (base, braço, platina ou mesa, revólver, canhão, parafuso macrométrico e parafuso micrométrico). A figura 26 ilustra bem estes componentes. A diferença entre um microscópio óptico comum e um fotomicroscópio baseia-se no sistema de captura de imagens composto, tão somente, de câmeras digitais acopladas e integradas a um software de captura.

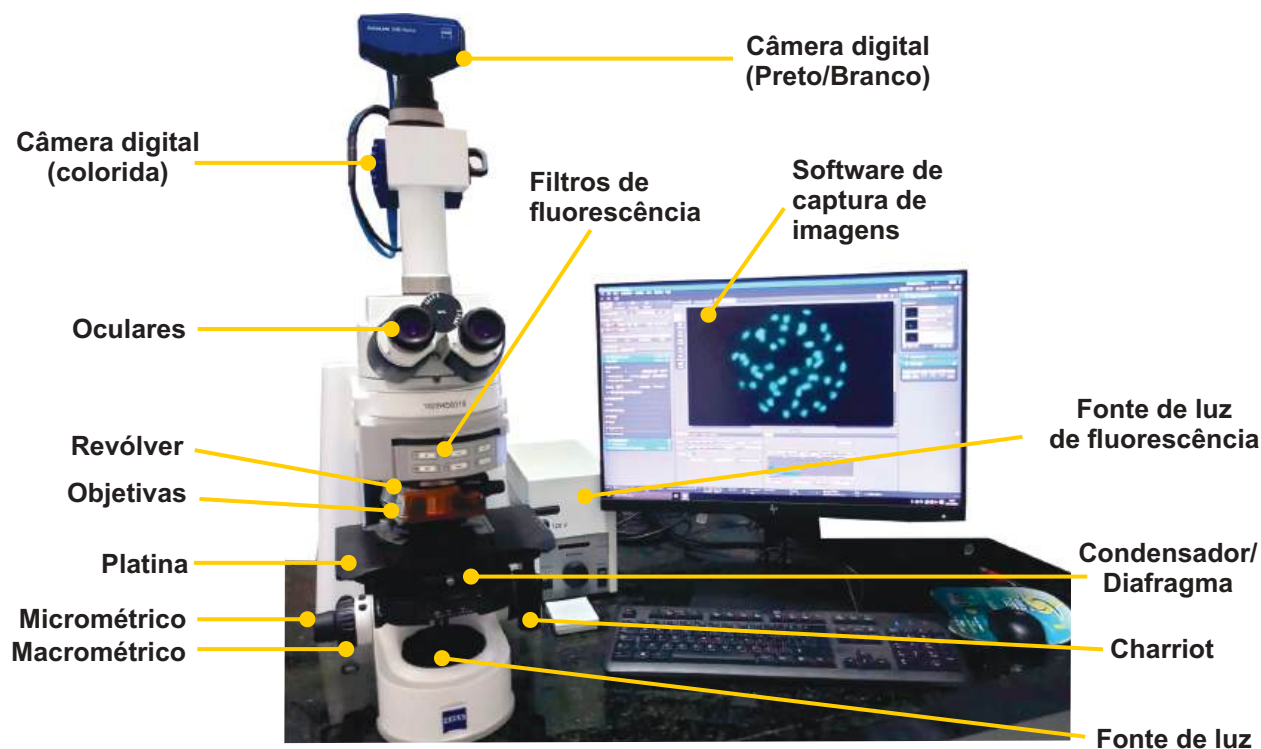


Figura 26. Visão geral do microscópio de fluorescência: Partes ópticas, mecânicas e software.

7.2 Cuidados e limpeza

O cuidado permanente com a limpeza e a conservação do microscópio, tanto previamente a utilização, quanto durante o trabalho, é indispensável para a visualização do objeto e obtenção de imagens de boa qualidade, respectivamente. A maximização técnica do desempenho do equipamento, uma vez que é um instrumento laboratorial de precisão, sensibilidade e de alto custo de aquisição e manutenção técnica, deve ser sempre a prioridade.

Quando não estiver em uso, é crucial proteger o microscópio de forma física para evitar o acúmulo de poeira e outros elementos nas partes ópticas e mecânicas. Essa deposição de material indesejado frequentemente resulta em danos físicos, como arranhões e manchas, além de danos biológicos, como o surgimento de fungos.

Tais danos podem inutilizar partes importantes, como oculares, objetivas, condensadores e filtros, especialmente em fotomicroscópios de fluorescência.

Para manutenção periódica, a disposição de instrumentos de limpeza específicos pode ser bastante útil na remoção residual, como é o caso da **bomba de ar** do tipo pera de borracha (Fig. 27), vendida em farmácia como ducha ginecológica (nome comercial). As lentes oculares e objetivas merecem destaque

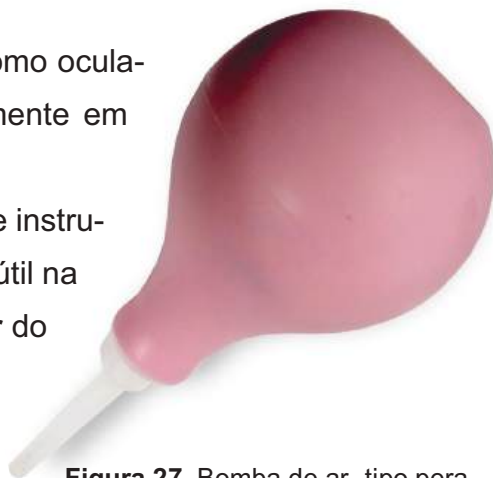


Figura 27. Bomba de ar, tipo pera.

especial quanto aos cuidados, pois são consideradas uma das partes ópticas mais sensíveis entre os componentes. A manutenção equivocada, ou até mesmo a falta dela, pode acarretar grandes prejuízos técnico-analíticos nos resultados buscados.

● ***Das oculares***

Evite tocar na superfície das lentes oculares, bem como nos condensadores, buscando evitar marcas de impressões digitais e riscos.

A oleosidade natural dérmica e ciliar depositada sobre as lentes podem danificar o equipamento e devem ser eliminadas com algodão ou lenço de papel fino e macio, ligeiramente umedecido (Fig. 28), de preferência com uma mistura de álcool-éter na proporção de 1:1.



Figura 28. Limpeza das oculares.

● ***Das objetivas***

As lentes objetivas 5x, 10x, 20x e 40x possuem necessidades distintas de limpeza em relação às objetivas de imersão (60x e 100x), salvo manutenções

periódicas de rotina e/ou por toque accidental no óleo de imersão. Entretanto, as lentes objetivas de 60x e 100x, como mencionado, necessitam, além de manutenção preventiva periódica, de atenção redobrada e zelo por parte do microscopista, já que estão constantemente em contato com o óleo de imersão, o que é costume para melhorar a nitidez das imagens (Fig. 29). Nesses casos, a remoção do óleo de imersão dessas objetivas ao final do dia deve ser priorizada, evitando o acúmulo de poeira e outras sujeiras que possam ficar presas ao óleo de imersão e danificá-las. Para isso, utilize lenços de papel macio e seco para retirar o excesso e, em seguida, um novo lenço umedecido com a solução de álcool-éter (1:1). **Atenção:** se acidentalmente a objetiva de 40x tocar no óleo de imersão, limpe imediatamente, a fim de evitar o prejuízo de perder essa objetiva. Utilize óleo de imersão de qualidade ou recomendado pelo fabricante do microscópio, pois alguns óleos sintéticos muito densos (não recomendados) podem danificar as lentes das objetivas.



Figura 29. Visão do revólver: sistema de lentes e objetivas.

• **Dos filtros de fluorescência**

Em equipamentos munidos de filtros de fluorescência, primeiramente para seleção correta dos filtros (Fig. 30B), o usuário deve conhecer a curva espectral de emissão da fonte de luz usada, além do nível de excitação e comprimento de onda emitida pelo corante. Quando se usa, por exemplo, o DAPI, para visualização de cromossomos ou bandas, a excitação máxima deve ser em torno de 358 nm, e a emissão máxima deve ser capturada em torno de 461 nm. Do mesmo modo, para visualização dos blocos de CMA, deve-se usar filtro de comprimento de onda de excitação de 440 nm e de emissão 475 nm (Tabela 2).

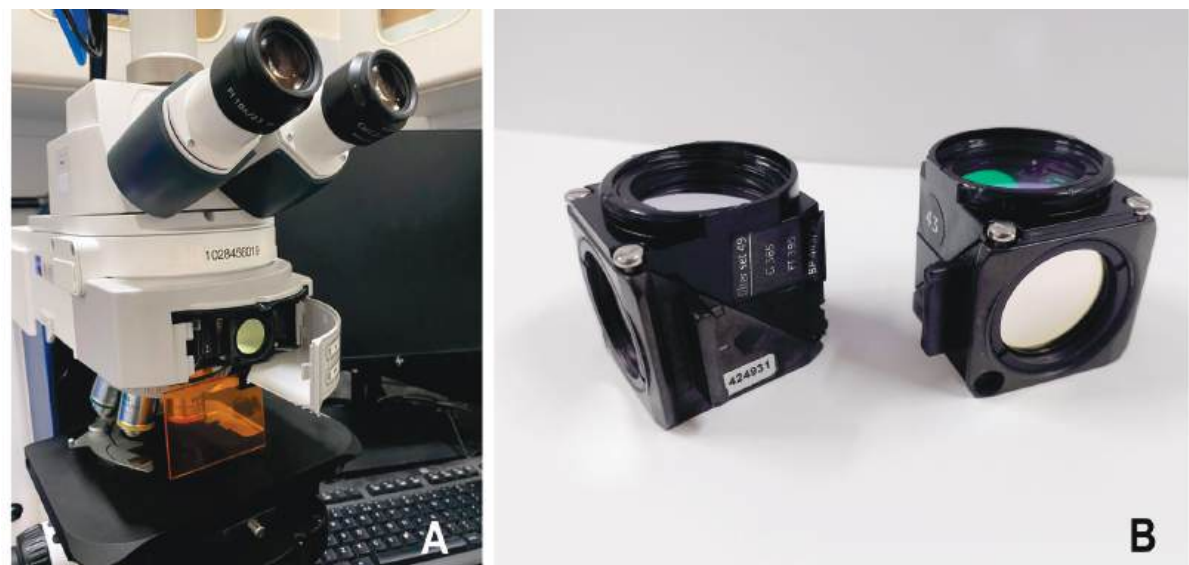


Figura 30. Filtro de fluorescência.

Tabela 2. Filtros necessários para detecção de bandas ou sítios com corantes fluorescentes.

Corantes fluorescentes	Filtros necessários para visualização Excitação/Emissão	Cor da fluorescência Emitida
DAPI	358/461 nm	Azul
CMA	440/475 nm	Amarelo
FITC	495/523 nm	Verde
Cy3	550/570 nm	Vermelho

8. Preparo de soluções

A preparação de soluções requer alguns cuidados que estão diretamente relacionados com a toxicidade, volatilidade, cálculos, pesagem, solubilidade, homogeneidade e armazenamento. Todas as soluções devem ser preparadas em capela para exaustão de gases (ver Fig. 31A), pois oferece proteção aos usuários e ao ambiente contra a exposição de gases nocivos, tóxicos, derramamento de produtos químicos e fogo. As soluções preparadas devem ser transferidas e guardadas em frascos apropriados e corretamente rotuladas com nome e concentração da solução, data do preparo e iniciais do nome da pessoa que preparou (ver exemplo na Fig. 31B e C).

A seguir serão descritos por categoria o preparo de algumas das soluções usadas na citogenética com ilustrações para facilitar o entendimento. É importante ressaltar que o uso de reagentes de alta qualidade, obtidos de fornecedores confiáveis, é indispensável para a qualidade e sucesso de todas as etapas da análise citogenética. Assim, como sugestão, informamos os códigos de referência desses reagentes amplamente utilizados, em virtude da qualidade comprovada pelo fabricante.

Por último, é importante destacar que todos os cálculos para alcançar as concentrações desejadas neste guia foram realizados por meio das equações de concentração comum (m/v), concentração molar (mol/L) e concentração percentual simples. Para preparar outras soluções em diferentes concentrações, ou mesmo revisar as fornecidas pelo guia, consulte o Anexo 6.

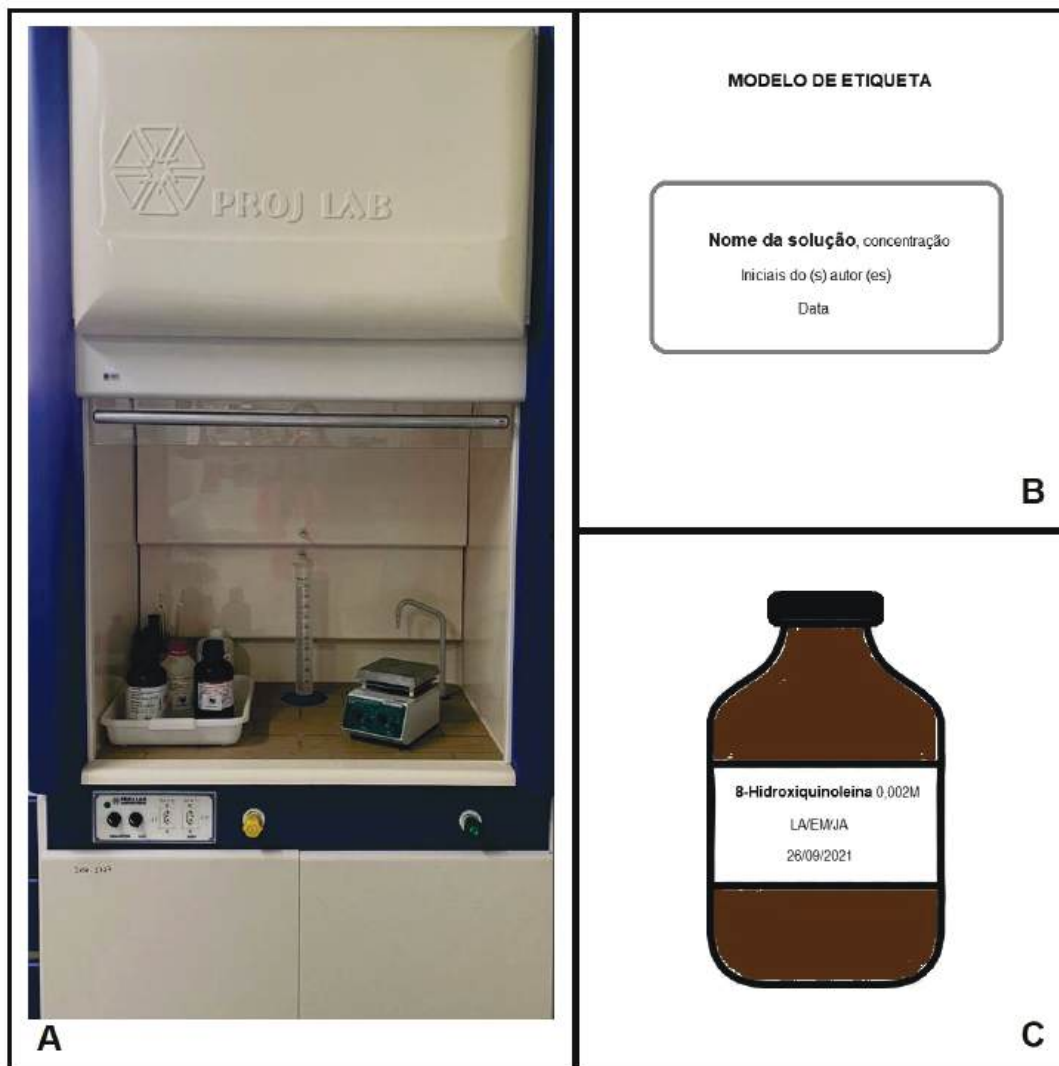


Figura 31. Capela para exaustão de gases (A), modelo de etiqueta sugerido (B) e ilustração de uma solução corretamente rotulada (C).

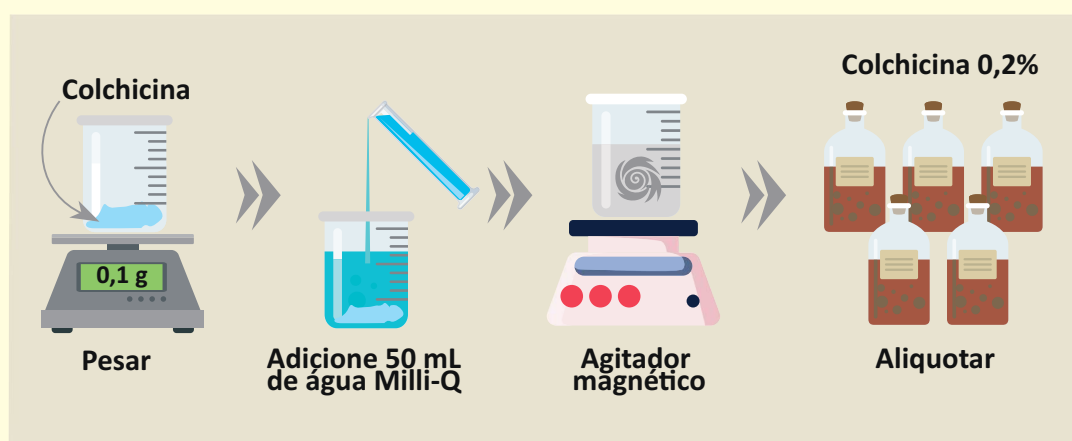
8.1 Agentes antimetabólicos

a) Colchicina 0,2%

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 100 mL.
2. Pese 0,1 g de Colchicina e dissolva em 50 mL de água Milli-Q ou água destilada.
3. Para isso, utilize um agitador magnético em uma capela de exaustão.
4. Divida a solução em alíquotas de 10 mL.
5. Armazene a solução no freezer a -20 °C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 50 mL



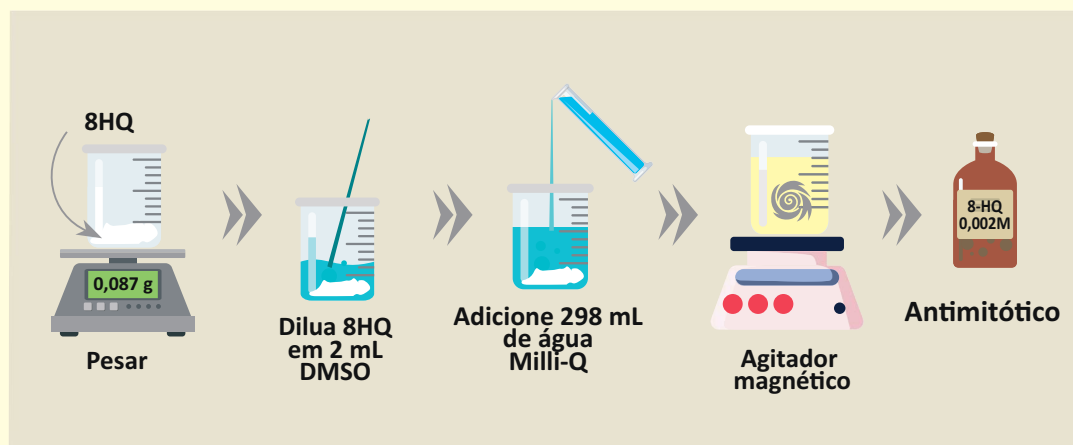
Atenção: Não é conhecida nenhuma interferência do ácido acético nas propriedades antimetabólicas da colchicina quando ambos são guardados no mesmo local de refrigeração. Etiquetar todos os frascos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Colchicina - C9754-500MG (Sigma-Aldrich).

b) 8-Hidroxiquinoleína 0,002M

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 25 mL e um béquer de 500 mL.
2. Dissolva 0,087 g de 8HQ (8-hidroxiquinoleína) em 2 mL de DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) em um béquer de 25 mL.
3. Transfira o 8HQ dissolvido no DMSO para o béquer maior (500 mL) e adicione 298 mL de água Milli-Q ou água destilada e leve para agitação constante por 4-5 horas.
4. Para isso, utilize um agitador magnético em uma capela de exaustão ou em um ambiente ventilado.
5. Armazene a solução em frasco âmbar hermeticamente fechado na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 300 mL



Atenção: O 8HQ é um antimitótico de difícil solubilidade. A solubilidade e a qualidade antimitótica podem ser melhoradas com o uso do DMSO e da água Milli-Q, respectivamente. Caso o laboratório não disponha de DMSO, o 8HQ pode ser diluído apenas em água, porém levará mais tempo para a solubilização completa. O 8HQ e o ácido acético devem ser armazenados em geladeiras separadas, pois o ácido acético pode degradar o 8HQ. Etiquetar o frasco com as seguintes informações: nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Mantendo os cuidados necessários de armazenamento do 8-HQ, é seguro utilizá-lo por até um ano após o preparo. Código de referência: 8-Hidroxiquinoleína - 252565-50G (Sigma- Aldrich).

8.2 Fixadores

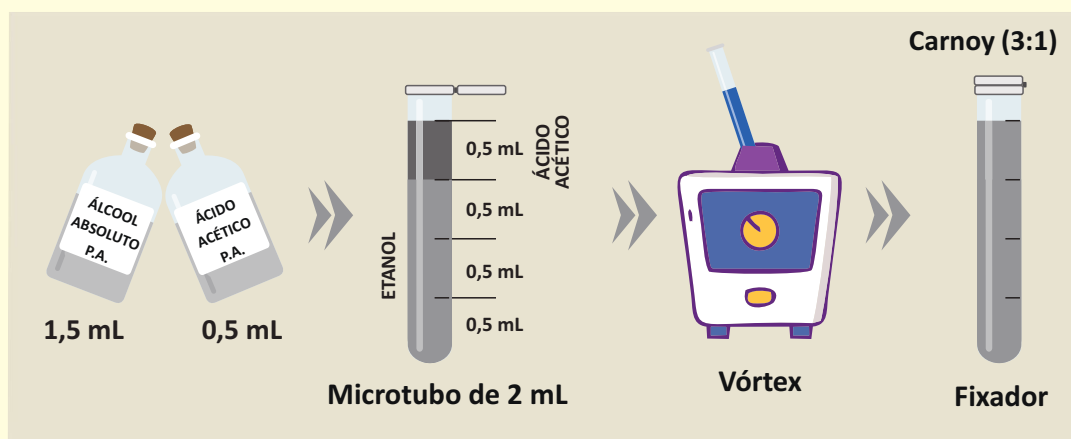
a) Fixador Carnoy 3:1 (álcool etílico: ácido acético)

■ PARA FIXAÇÃO DE RAÍZES

MODO DE PREPARAR

1. Use um microtubo de 2 mL.
2. Coloque 1,5 mL de Álcool etílico absoluto.
3. Coloque 0,5 mL de Ácido acético glacial.
4. Misture bem os dois reagentes com o auxílio de um agitador vortex ou manualmente.
5. Após a completa homogeneização do fixador, ele está pronto para uso.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 2 mL



Atenção: O volume de fixador sugerido para fixação de 7 a 10 raízes é de 2 mL por microtubo, na proporção de 3:1 (3 partes de etanol absoluto para 1 parte de ácido acético). O volume do fixador deve ser de 10 a 20 vezes maior que o material a ser fixado. Sempre faça isso, preferencialmente, em capela de exaustão para proteger-se dos vapores corrosivos. O fixador deve ser preparado alguns minutos, ou até 30 minutos, antes de ser utilizado. Código de referência: Álcool etílico (etanol) absoluto - 1060351000-1L (Sigma-Aldrich). Ácido acético glacial - 1.00063-1L (Sigma-Aldrich).

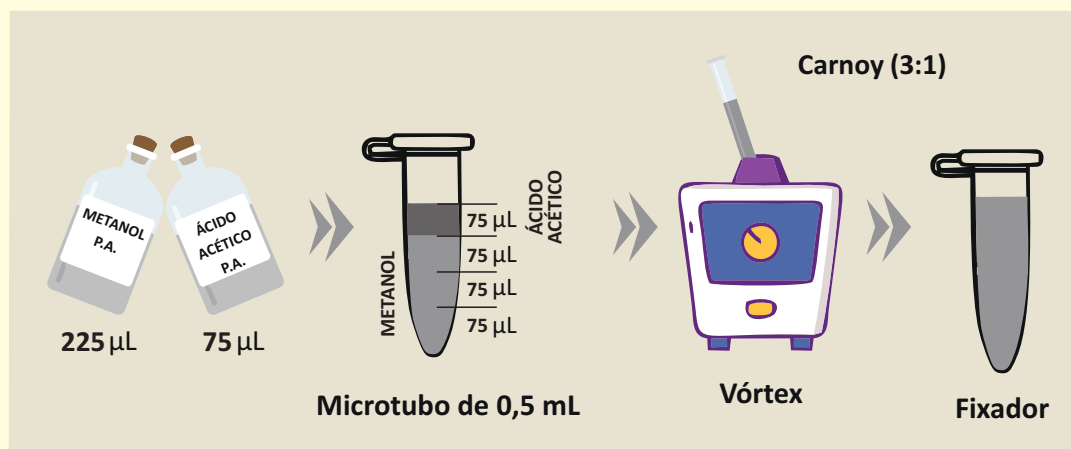
b) Fixador Carnoy 3:1 (álcool metílico: ácido acético)

■ PARA SUSPENSÃO CELULAR

MODO DE PREPARAR

1. Use microtubo de 0,5 mL ou 1,5 mL (a depender da quantidade).
2. Coloque 225 μ L de álcool metílico absoluto em um microtubo.
3. Adicione 75 μ L de ácido acético glacial.
4. Misture bem os dois reagentes com o auxílio de um agitador vortex ou manualmente.
5. Guarde no freezer a -20 °C até o momento de ser utilizado.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 300 μ L



Atenção: O volume final do fixador dependerá da quantidade de pontas de raízes a serem fixadas. A proporção de metanol absoluto para ácido acético deve ser de 3:1 (3 partes de metanol absoluto para 1 parte de ácido acético). Como parâmetro, use 300 μ L de fixador para cada três pontas de raízes. O fixador deve ser feito poucos minutos antes de ser utilizado. Sempre faça isso, preferencialmente, em capela de exaustão usando luvas para proteger-se dos vapores corrosivos, sobretudo quando se trata de álcool metílico (metanol). Código de referência: Álcool metílico (metanol) absoluto - 1060351000-1L (Sigma-Aldrich). Ácido acético glacial - 1.00063-1L (Sigma-Aldrich).

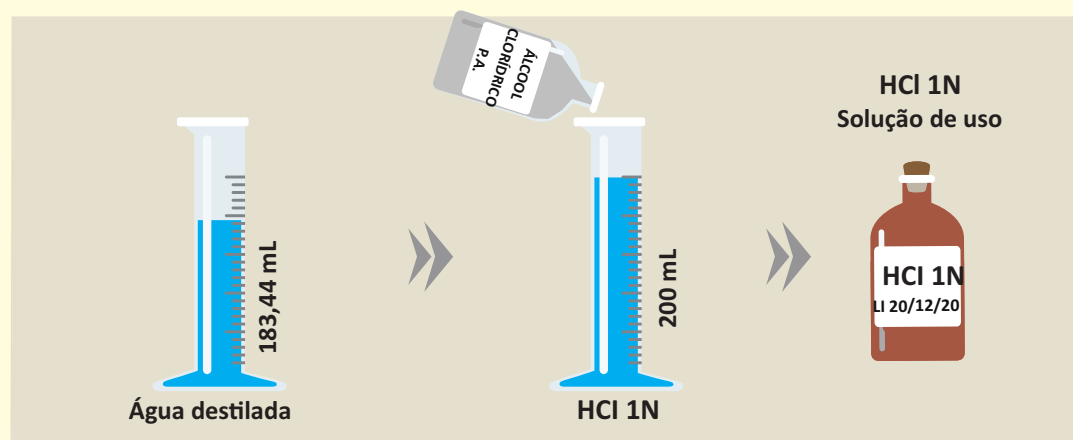
8.3 Ácidos e mix de enzimas

a) HCl 1N e 5N

MODO DE PREPARAR

1. **HCl 1N:** Coloque, primeiramente, 183,44 mL de água destilada em uma proveta de vidro e acrescente 16,56 mL de HCl (Ácido clorídrico).
2. **HCl 5N:** Coloque, primeiramente, 117,20 mL de água destilada em uma proveta de vidro e acrescente 82,8 mL de HCl.
3. Guarde em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado.
4. Armazene a solução à temperatura ambiente.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 200 mL



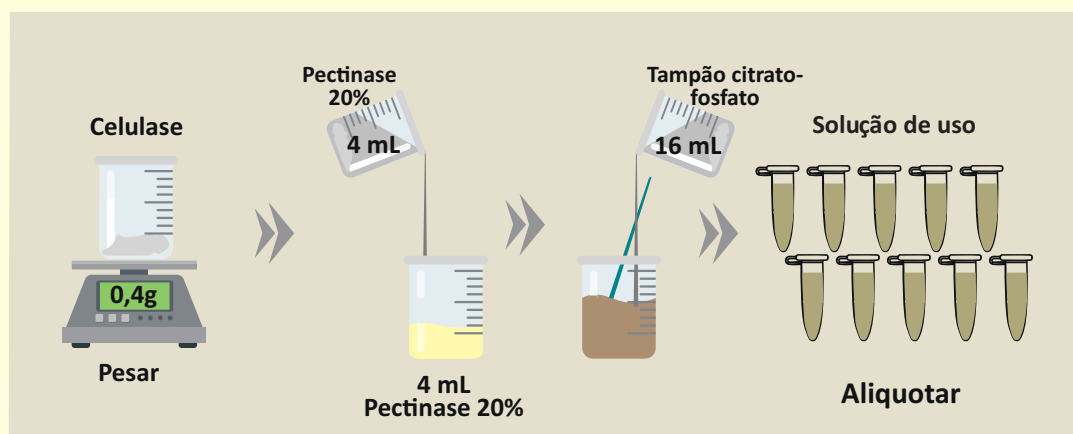
Atenção: O ácido clorídrico é extremamente corrosivo e tóxico. É necessário muito cuidado ao manipulá-lo. Sempre faça isso em capela de exaustão para proteger-se dos vapores corrosivos. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

b) Solução de celulase 2% - pectinase 20%

MODO DE PREPARAR

1. Prepare a solução enzimática em um béquer de 25 mL.
2. Pese 0,4 g de celulase e dissolva em 4 mL de pectinase.
3. Adicione 16 mL de tampão citrato-fosfato com pH 4,8.
4. Divida os 20 mL da solução enzimática final em 10 alíquotas de 2 mL.
5. Armazene as alíquotas no freezer a -20 °C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 20 mL



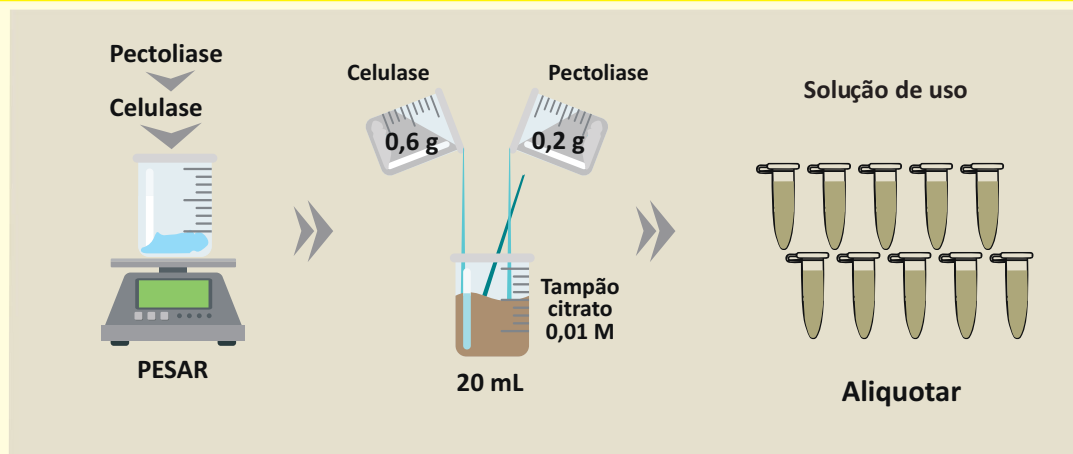
Atenção: O uso de pectinases e celulases de boa qualidade garante uma digestão rápida e eficiente. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Celulase - C1184-25KU (Sigma-Aldrich). Pectinase - P4716-25KU (Sigma-Aldrich).

c) Solução de celulase 3% - pectoliase 1%

MODO DE PREPARAR

1. Prepare a solução enzimática em um béquer de 25 mL.
2. Pese 0,6 g de celulase e 0,2 g de pectoliase.
3. Dissolva em 20 mL de tampão citrato 0,01 M (pH 4,8).
4. Divida os 20 mL da solução enzimática final em 10 alíquotas de 2 mL.
5. Armazene as alíquotas no freezer a -20 °C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 20 mL



Atenção: O uso de pectoliasas e celulases de boa qualidade garante uma digestão rápida e eficiente. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Celulase - C1184-25KU (Sigma-Aldrich). Pectoliase -P3026-100MG (Sigma-Aldrich).

8.4 Corantes acéticos e fluorescentes

a) Hematoxilina acética 1%

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 200 mL.
2. Dissolva 1 g de hematoxilina e 0,25 g de alúmen férrico em 100 mL de ácido acético 45%, usando um bastão de vidro.
3. Coloque a mistura em um vidro escuro com tampa e frasco revestidos por papel alumínio, em ambiente ventilado. De preferência, use capela de exaustão.
4. Após uma semana, filtre a solução e armazene em frasco escuro à temperatura ambiente.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



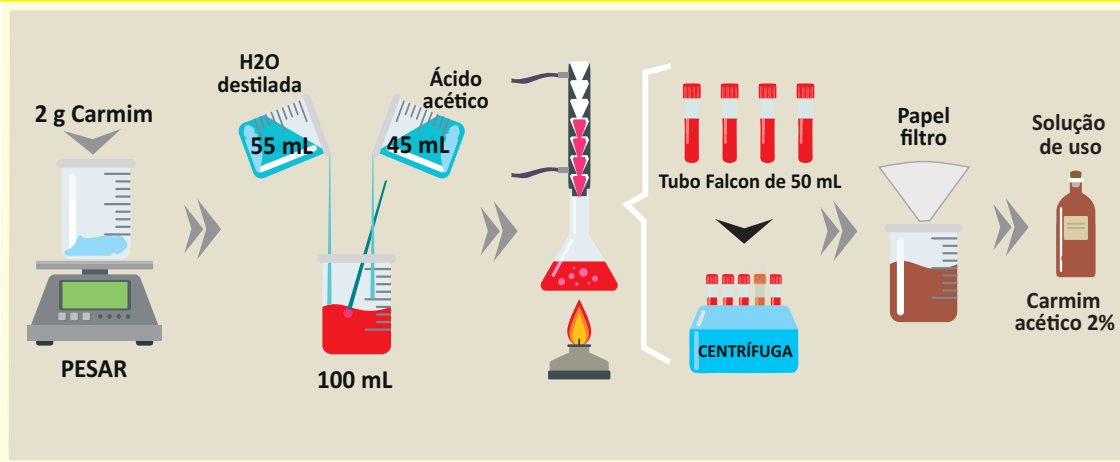
Atenção: A hematoxilina e o alúmen férrico podem causar manchas na pele e nas roupas. Evite o uso de pipeta Pasteur que teve contato com HCl, pois ele neutraliza a coloração da hematoxilina. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Hematoxilina - H3136-25G (Sigma-Aldrich).

b) Carmim acético 2%

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 200 mL.
2. Dissolva 2 g de carmim em uma solução de 55 mL de água destilada e 45 mL de ácido acético glacial.
3. Aqueça até ferver em um condensador de refluxo por 2 a 3 horas.
4. Após a solução esfriar, distribua a solução em tubos falcon de centrifuga e centrifugue a solução a 14.000 rpm por 10 minutos.
5. Retire o sobrenadante e filtre.
6. Coloque em frasco fechado e escuro.
7. Armazene a solução à temperatura ambiente.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



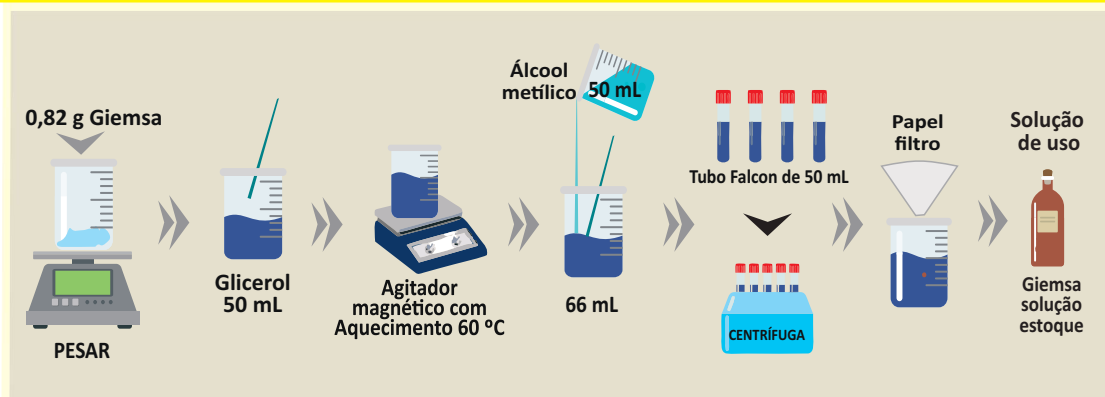
Atenção: Na falta de uma centrífuga, após a solução esfriar, apenas filtre e mantenha em vidro escuro à temperatura ambiente. Evite o uso de pipeta Pasteur que teve contato com HCl, pois ele neutraliza a coloração do carmim. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Carmim - C1022-25G (Sigma-Aldrich).

c) Giemsa - Solução estoque

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 200 mL.
2. Dissolva 0,80 g de corante de Giemsa em pó em 50 mL de glicerina a 60 °C em agitador magnético com aquecimento por 2 horas, com agitação constante.
3. Após a solução esfriar, adicione 50 mL de álcool metílico e homogeneíze novamente.
4. Distribua a solução em tubos falcon de centrifuga e centrifugue a solução a 14.000 rpm por 10 minutos.
5. Retire o sobrenadante, que é o corante líquido, e coloque em frasco escuro.
6. Armazene a solução centrifugada na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



Atenção: Na falta de uma centrífuga, após a solução esfriar, guarde em vidro escuro bem fechado por uma semana para que a solução decante. Filtre e mantenha em vidro escuro. Evite o uso de pipeta Pasteur que tenha tido contato com ácido acético. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Giemsa - G4507-5G (Sigma-Aldrich).

d) Giemsa a 2% - Solução de uso

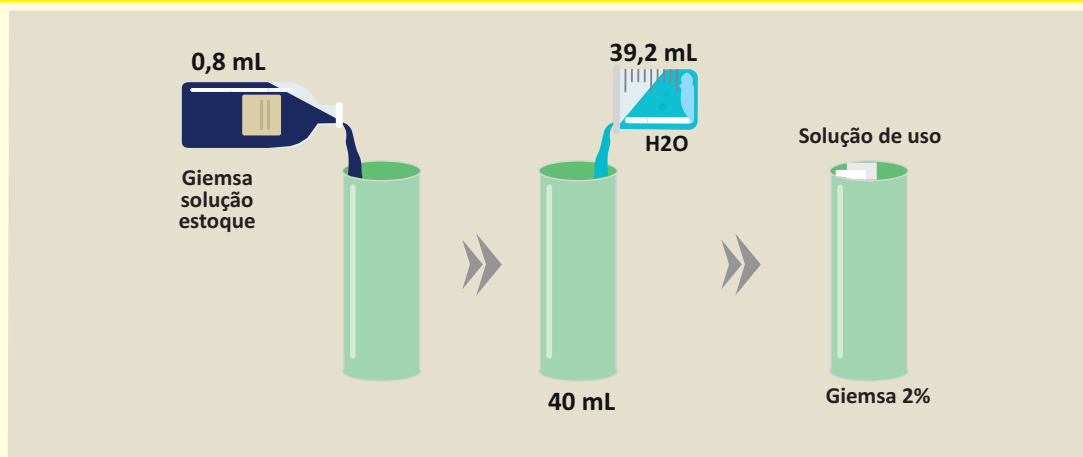
MODO DE PREPARAR

1. Use um frasco porta-lâmina de 40 mL.

2. Adicione 39,2 mL de água destilada e 0,8 mL (corresponde a 2% de 40 mL) da solução estoque de Giemsa.

3. Homogenize com cuidado.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 40 mL



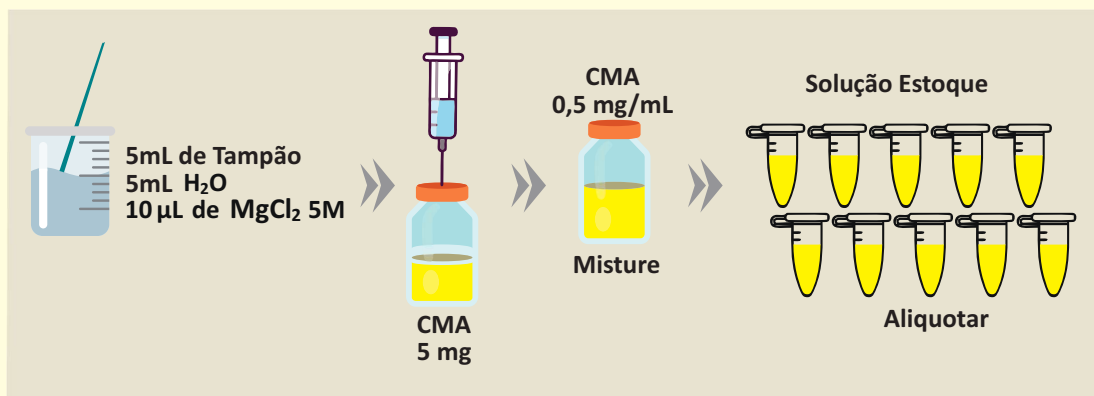
Atenção: Para uso rotineiro, use água destilada para diluição. Evite recipientes que tenham tido contato com ácido acético.

e) CMA (Cromomicina A₃) 0,5 mg/mL - Solução estoque

MODO DE PREPARAR

1. Prepare uma mistura 1:1 de tampão Mcllvaine pH 7,0 e água Milli-Q ou destilada.
2. Acrescente 10 µL de MgCl₂ 5M.
3. Use uma seringa para aplicar a mistura final (5 mL de Tampão + 5 mL de H₂O + 10 µL de MgCl₂ 5M) no frasco contendo 5 mg de CMA.
4. Agite o frasco para garantir completa solubilidade das 5 mg de CMA.
5. Divida os 10 mL da solução preparada em alíquotas de 1 mL.
6. Armazene a solução na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 10 mL



Atenção: O corante deve ser preparado pelo menos uma semana antes de ser utilizado. Como se trata de um reagente em quantidade muito pequena e genotóxico, use uma seringa estéril para aplicar o solvente (tampão Mcllvaine + água Milli-Q ou destilada) no frasco original (C2659-5MG) que contém o reagente. Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: Cromomicina A₃ (CMA) - C2659-5MG (Sigma-Aldrich).

f) CMA (Cromomicina A₃) 0,1 mg/mL - Solução de uso

MODO DE PREPARAR

- | | |
|--|--|
| 1. Use um béquer de 25 mL envolto em papel alumínio para evitar luz direta. | 3. Divida os 10 mL da solução de uso em alíquotas de 1 mL ou 1,5 mL. |
| 2. Dilua 2 mL de solução estoque (0,5 mg/mL) em 8 mL de tampão McIlvaine pH 7,0. | 4. Armazene a solução na geladeira a 4°C. |

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 10 mL



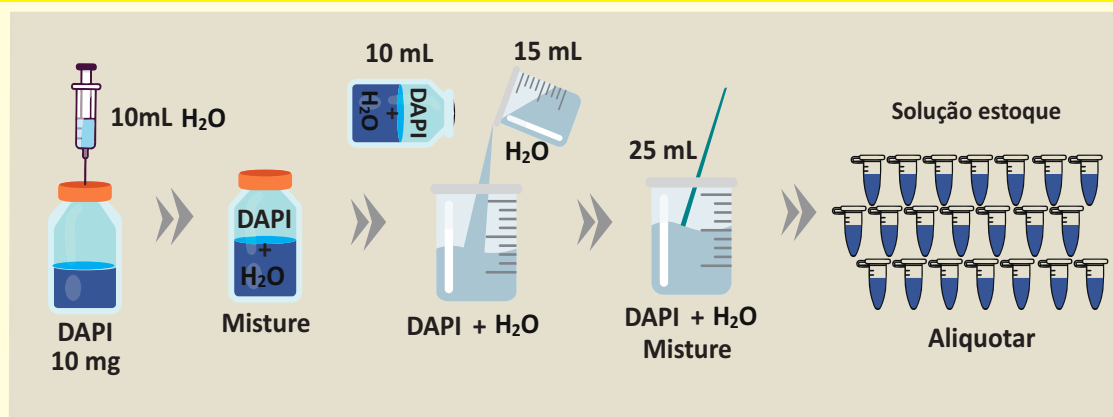
Atenção: Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

g) DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 0,2 mg/mL – Solução estoque

MODO DE PREPARAR

1. Use uma seringa para aplicar 10 mL de água Milli-Q ou destilada no frasco contendo 5 mg de DAPI.
2. Homogenize a mistura de DAPI e água manualmente
3. Transfira o conteúdo homogeneizado para um béquer e acrescente mais 15 mL de água Milli-Q ou destilada para que o DAPI fique na concentração final (solução estoque) de 0,2 mg/mL.
4. Homogenize a mistura com cuidado, usando um bastonete de vidro, evitando a exposição à luz.
5. Divida os 25 mL da solução estoque em alíquotas de 1 mL ou 1,5 mL.
6. Armazene as alíquotas no freezer a -20 °C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 25 mL



Atenção: Como se trata de um reagente em quantidade muito pequena e genotóxico, use uma seringa estéril para aplicar o solvente (água Milli-Q) no frasco original que contém o reagente (D9542-5MG). Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou. Código de referência: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) - D9542-5MG (Sigma-Aldrich).

h) DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 1 µg/mL – Solução uso

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 25 mL envolto em papel alumínio para evitar luz direta.
2. Dilua 100 µL da solução de DAPI 0,2 mg/mL em 20 mL de tampão Mcllvaine pH 7,0.
3. Divida os 20 mL da solução preparada em alíquotas de 1 mL ou 1,5 mL.
4. Armazene as alíquotas no freezer a -20 °C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 20 mL



Atenção: DAPI na concentração de 1 µg/mL tem respondido bem em cactos, mas caso isso não ocorra aumente a concentração para 2 µg/mL. Para obter alíquotas de DAPI a 2 µg/mL, utiliza-se 100 µL de DAPI a 0,2 mg/mL, diluídos em 10 mL de tampão Mcllvaine, pH 7,0. Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

i) DAPI Glicerol - 1 $\mu\text{g/mL}$

MODO DE PREPARAR

1. Use um béquer de 25 mL envolto em papel alumínio para evitar luz ultravioleta.
2. Use o DAPI na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$.
3. Dilua 5 mL da solução de DAPI 2 $\mu\text{g/mL}$ em 5 mL de glicerol (glicerina), obtendo uma proporção de 1:1.
4. Divida os 10 mL da mistura em alíquotas de 1 mL.
5. Armazene as alíquotas no freezer a -20°C .

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 10 mL



Atenção: Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

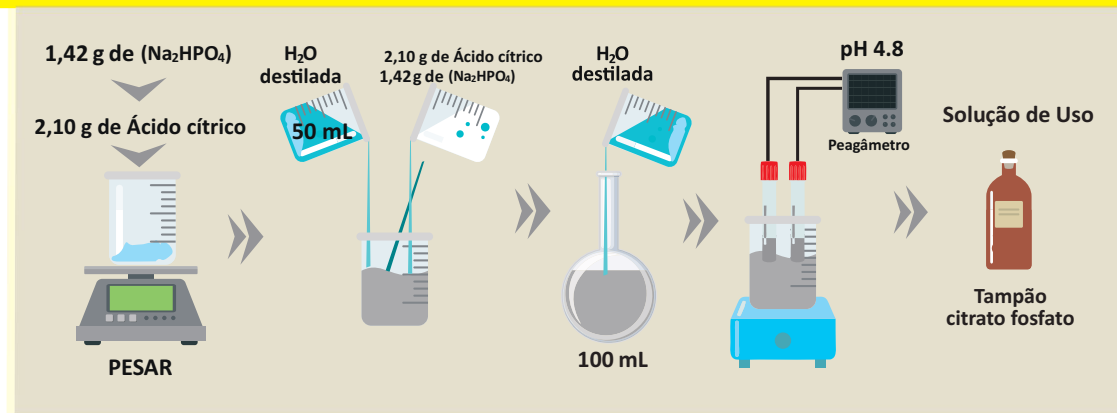
8.5 Soluções tampão

a) Tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,8)

MODO DE PREPARAR

1. Pese 1,42 g de Fosfato de sódio diabásio anidro (Na_2HPO_4) e 2,10 g de ácido cítrico.
2. Adicione 50 mL de água destilada a um béquer e misture bem até que os reagentes estejam completamente dissolvidos.
3. Transfira a solução para um balão volumétrico de 100 mL.
4. Complete com água destilada até o menisco atingir a marca de 100 mL.
5. Agite bem para homogeneizar a solução.
6. Use um pHmetro para ajustar o pH para 4,8.
7. Armazene a solução na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



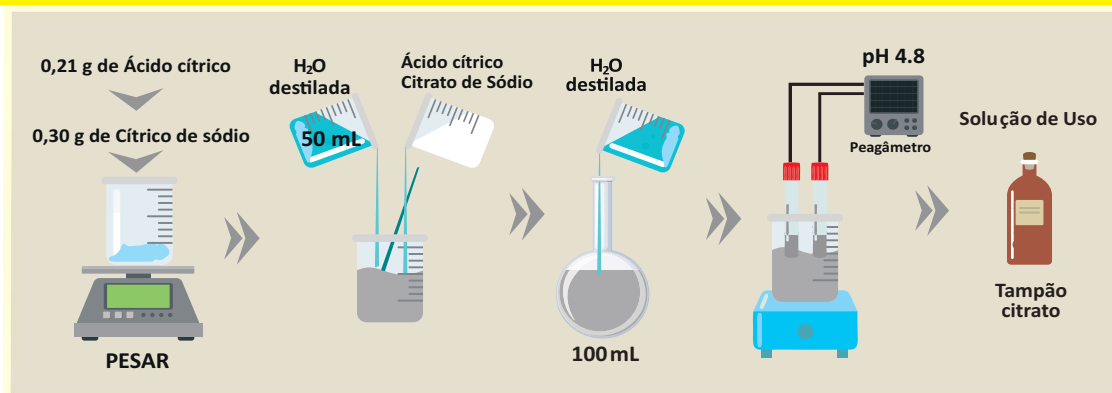
Atenção: Com o tempo de uso, sempre verifique antes de usar o tampão se existe a presença de fungo. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

b) Tampão citrato 0,01 M (pH 4,8)

MODO DE PREPARAR

1. Pese 0,21 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7H_2O$) e 0,30 g de citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7H_2O$).
2. Adicione 50 mL de água destilada a um béquer e misture bem até que os reagentes estejam completamente dissolvidos.
3. Transfira a solução para um balão volumétrico de 100 mL.
4. Complete com água destilada até o menisco atingir a marca de 100 mL.
5. Agite bem para homogeneizar a solução.
6. Use um pHmetro para ajustar o pH para 4,8.
7. Armazene a solução na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



Atenção: Com o tempo de uso, sempre verifique antes de usar o tampão se existe a presença de fungo. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

c) Tampão Mcllvaine pH 7,0

MODO DE PREPARAR

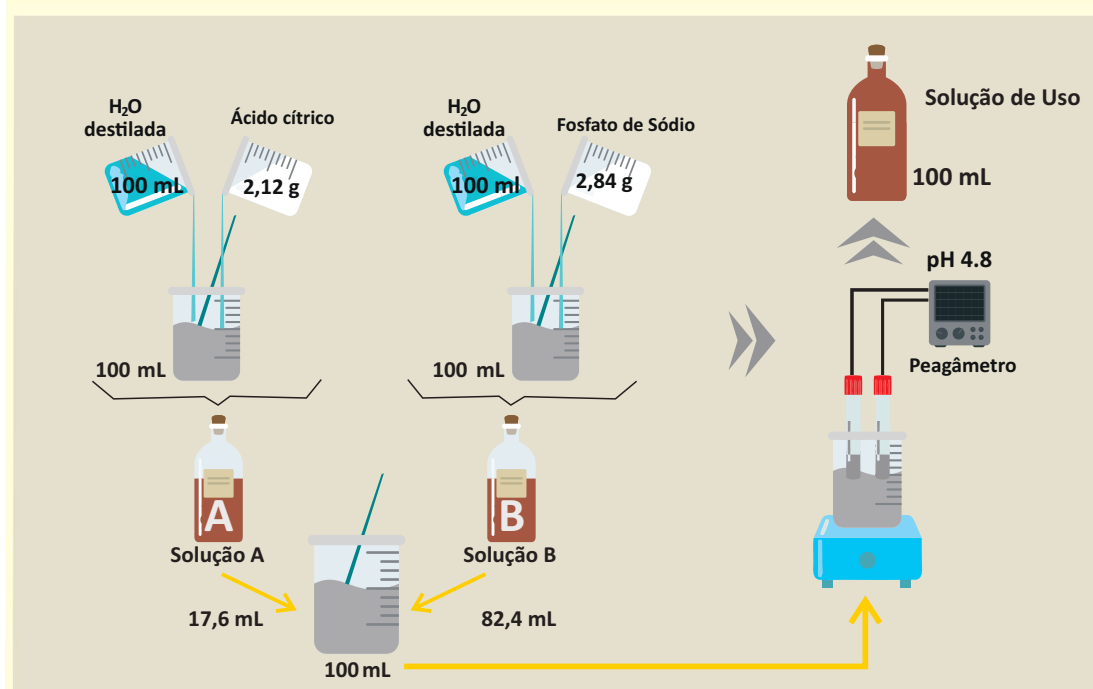
1. Soluções estoque:

- **Solução A (0,1 M):** Dissolva 2,10 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 100 mL de água destilada.
- **Solução B (0,2 M):** Dissolva 2,84 g de fosfato de sódio diabásio anidro (Na_2HPO_4) em 100 mL de água destilada.

2. Solução de uso (100 mL):

- Misture 17,6 mL de solução A com 82,4 mL de solução B.
- Ajuste o pH para 7,0 com NaOH (hidróxido de sódio) ou HCl (ácido clorídrico).
- Armazene todas as soluções na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 100 mL



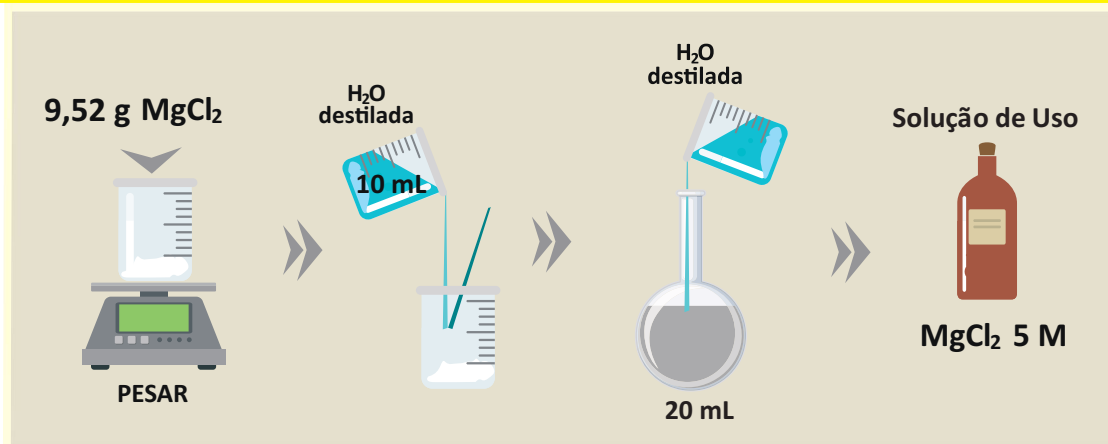
Atenção: Com o tempo de uso, sempre verifique antes de usar o tampão se existe a presença de fungo. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

d) Cloreto de magnésio - MgCl_2 5 M

MODO DE PREPARAR

1. Pese 9,52 g de cloreto de magnésio anidro (MgCl_2) em um béquer de 25 mL.
2. Adicione 10 mL de água destilada ao béquer.
3. Misture bem até que o MgCl_2 esteja completamente dissolvido.
4. Transfira a solução para um balão volumétrico de 20 mL.
5. Complete com água destilada até o menisco atingir a marca de 20 mL.
6. Agite bem para homogeneizar a solução.
7. Armazene a solução na geladeira a 4°C.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 20 mL



Atenção: Com o tempo de uso, sempre verifique antes de usar o tampão se existe a presença de fungo. Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

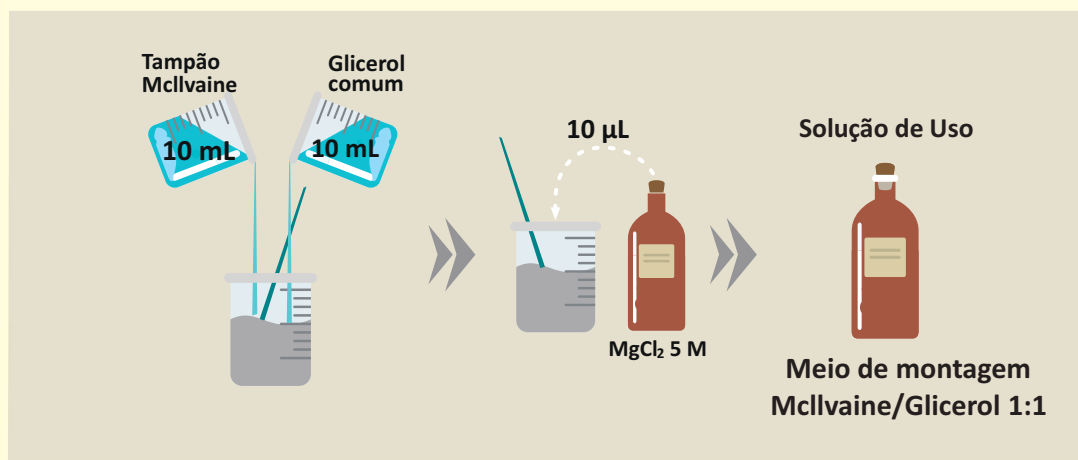
8.6 Meio de montagem para fluorocromos

a) Meio de montagem Mcllvaine/glicerol 1:1

MODO DE PREPARAR

1. Adicione 10 mL de tampão Mcllvaine (pH 7.0) com 10 mL de glicerol (Glicerina) a um béquer de 25 mL.
2. Misture bem até que as duas soluções estejam completamente misturadas.
3. Adicione 10 μ L de $MgCl_2$ 5 M (ou 0,012 g de $MgCl_2$ anidro) e misture novamente a solução para completa solubilização.
4. Transfira a solução para um recipiente fechado e guarde na geladeira.

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 20 mL



Atenção: Etiquetar o frasco com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

b) Meio de montagem Mcllvaine/glicerol com DAPI

MODO DE PREPARAR

1. Adicione 10 mL do meio de montagem Mcllvaine/glicerol a um béquer de 25 mL.
2. Adicione 50 μ L de DAPI 0,2 mg/mL (solução estoque) e misture bem até que as duas soluções estejam completamente misturadas.
3. Divida a solução preparada em alíquotas de 1 mL.
4. Armazene as alíquotas no freezer a -20°C .

ILUSTRAÇÃO - Volume preparado: 10 mL



Atenção: Os microtubos devem ser envoltos em papel alumínio para proteger a solução da degradação causada pela luz. Etiquetar todos os microtubos com o nome da solução, concentração, data de preparação e iniciais do nome da pessoa que preparou.

9. Potencial de risco químico das substâncias utilizadas

Em laboratórios de citogenética vegetal, diversas substâncias químicas, fundamentais para a preparação e análise de cromossomos de plantas, apresentam considerável potencial de risco químico. Os riscos químicos podem incluir exposição a substâncias tóxicas, irritantes, corrosivas ou carcinogênicas (Tabela 3). É válido lembrar que nenhuma das substâncias químicas utilizadas deve ser descartada na pia do laboratório ou na natureza. Isso se deve ao potencial de contaminação ambiental e aos danos à saúde humana e animal causados por essas substâncias.

Para garantir a segurança no laboratório, é fundamental que os usuários adotem práticas seguras, incluindo o uso correto de Equipamento de Proteção Individual - EPIs (luvas, máscaras, óculos e jalecos) e a realização de atividades em capelas de exaustão, quando necessário. A conscientização e formação sobre os perigos de cada substância são



Figura 32. Recipientes de descartes.

essenciais, assim como a estrita conformidade com normas, regulamentações e diretrizes específicas para o manuseio seguro de substâncias químicas em laboratórios, garantindo um ambiente de trabalho protegido.



Adicionalmente, a manutenção de recipientes de descarte (Fig. 32) com rotulagem precisa para substâncias como 8-HQ, colchicina, fixadores, corantes fluorescentes, lâminas, lamínulas e ponteiros usadas, entre outros, juntamente com a lavagem de vidrarias e a limpeza de bancadas ao final do trabalho, são aspectos cruciais na gestão do potencial de risco químico em laboratórios de citogenética vegetal.

Tabela 3. Risco químico associado às principais substâncias utilizadas no laboratório de citogenética.

	Agente químico	Inflamável	Corrosivo	Tóxico	Genotóxico
Antimitóticos	Colchicina	NÃO	NÃO	SIM	SIM
	8-Hidroxiquinoleína	NÃO	NÃO	SIM	SIM
	Orizalina	NÃO	NÃO	SIM	SIM
	Trifluralina	NÃO	NÃO	SIM	SIM
Fixadores	Ácido acético glacial	SIM	SIM	SIM	NÃO
	Álcool metílico P.A.	SIM	SIM	SIM	NÃO
	Álcool etílico Absoluto	SIM	SIM	SIM	NÃO
Corantes	CMA (corante)	NÃO	NÃO	SIM	SIM
	DAPI (corante)	NÃO	NÃO	SIM	SIM
	GIEMSA pó	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
	Hematoxilina em pó	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
	Carmim em pó	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Meio de montagem	Glicerol	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
	Xilol	SIM	SIM	SIM	NÃO
	Entellan	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Limpeza	Ácido clorídrico P.A.	NÃO	SIM	SIM	NÃO
	Hipoclorito de sódio	NÃO	SIM	SIM	NÃO
	Éter etílico	SIM	SIM	SIM	NÃO
	Formaldeído	SIM	SIM	SIM	SIM

Fonte: Rogatto, 2000.

10. Obtenção de bons resultados: problemas e possíveis soluções

A obtenção de preparações cromossômicas de qualidade na citogenética vegetal é desafiadora devido a barreiras técnicas e biológicas. Questões como paredes celulares rígidas, especialmente em alguns grupos de plantas, dificultam a ação de agentes químicos ou enzimáticos. Além disso, a presença de compostos secundários, como taninos e óleos essenciais, pode interferir na fixação e observação dos cromossomos. Outros fatores que podem intensificar a complexidade na padronização dos métodos, exigindo ajustes específicos nos protocolos são: (1) seleção inadequada de tecidos vegetais, (2) características biológicas intrínsecas a cada espécie e (3) condições ambientais que podem resultar em algum tipo de estresse.

Obter células em diferentes estágios da mitose ou meiose é desafiador, especialmente em tecidos vegetais com ciclos celulares complexos, devido ao comportamento variável dos cromossomos. Para superar algumas das dificuldades mais comumente observadas na análise citogenética vegetal, foram listados os principais problemas e possíveis soluções em ordem alfabética na Tabela 4.



Tabela 4. Dicas para melhorar a qualidade de preparações cromossômicas.



PROBLEMAS		POSSÍVEIS CAUSAS 	DICAS 
Ausência de nitidez nas bandas CMA e DAPI		<p>■ Lâminas muito velhas podem estar danificadas ou fungadas.</p>	Recomenda-se armazenar as lâminas de microscopia em um local fresco e seco para prolongar sua vida útil, evitando assim danos ou contaminações que possam comprometer a qualidade das bandas CMA e DAPI.
		<p>■ Problemas técnicos: (1) Uso de óleo de imersão impróprio ou sua aplicação diretamente nas lentes pode causar imagens desfocadas; (2) Presença de ar entre as células e a lamínula; (3) Uso de lamínulas muito espessas dificulta a passagem adequada da luz.</p>	Antes de usar o óleo de imersão, limpe as lentes objetivas removendo poeira com uma lufada suave com bomba de ar (Fig. 27) e, em seguida, utilize um lenço de papel especial em movimentos suaves e circulares. Mantenha as lentes limpas após o uso. Ao montar a lâmina, assegure-se de centralizar bem as células, evitando ar entre elas e a lamínula. Verifique a diluição adequada do meio de montagem e a pressão correta do conjunto lâmina-lamínula. Use lamínulas com a espessura apropriada.
		<p>■ Envelhecimento inadequado das lâminas pode levar à umidade, e gotículas de água na célula podem diluir o fluorocromo, prejudicando a coloração.</p>	Controlar cuidadosamente o tempo de envelhecimento das lâminas. Uma técnica eficaz é mergulhar as lâminas em etanol 100% por uma noite e incubá-las a 55 °C por 30 minutos antes de realizar a coloração com CMA/DAPI.
		<p>■ Cromossomos muito condensados podem dificultar a visualização das bandas.</p>	É importante ajustar o tempo de pré-tratamento e o tipo de antimitótico. Isso pode ser feito reduzindo o tempo, mudando o antimitótico ou combinando as duas opções.

Tabela 4. Continuação...

		POSSÍVEIS CAUSAS 	DICAS 
PROBLEMAS	Ausência de cromossomos metafásicos	<p>■ Problemas na preparação das amostras: (1) Raízes velhas e condições inadequadas de crescimento; (2) Técnicas inadequadas de esmagamento ou dissociação celular; (3) Flutuações nas condições ambientais, como temperatura, umidade e luminosidade, impactando no ritmo da divisão celular e a disponibilidade de células em metáfase.</p>	<p>Fixar raízes jovens; revisar qualidade e tempo do antimitótico; manter as mudas cultivadas para as análises em condições ambientais adequadas (solo, temperatura e umidade).</p>
	Células “enroladas ou torcidas” nas lâminas	<p>■ Deslizamento da lamínula: Durante as batidas para espalhar as células e/ou no momento do esmagamento, a lamínula pode deslizar sobre a lâmina, resultando em células enroladas ou danificadas.</p>	<p>Prender a lamínula com papel filtro em uma das extremidades antes de espalhar as células ou esmagar a preparação, evitando que a lamínula deslize sobre a lâmina.</p>
	Células “rachadas”	<p>■ Depende da técnica utilizada: (1) Lâmina por muito tempo no nitrogênio líquido¹; (2) Exposição prolongada na estufa pode causar o rompimento das células².</p>	<p>Deixe a lâmina no N₂ líquido por, no máximo, 3 minutos¹. Evitar incubação excessiva².</p>





Tabela 4. Continuação...

		POSSÍVEIS CAUSAS 	DICAS 
PROBLEMAS	Citoplasma denso	<p>■ Causas da densidade do citoplasma podem incluir: (1) Processos inadequados de fixação; (2) Fixações antigas ou em coletas de campo, causando decomposição, desidratação ou oxidação, resultando em concentração de organelas e substâncias; (3) Em certas espécies vegetais, variações naturais de densidade devido a características genéticas específicas podem afetar a reação do citoplasma ao corante.</p>	<p>Considere utilizar novas raízes e fixá-las em Carnoy, composto por 60% de álcool e 40% de ácido acético. Ao realizar preparações cromossômicas, efetue a lavagem das lâminas em ácido acético 60% por 30 minutos. Além disso, experimente diferentes corantes para reduzir o contraste, procurando um corante que interaja menos com o citoplasma e, assim, diminua o contraste na preparação. O aquecimento rápido em lâmina na lamparina a álcool, após a maceração do meristema¹ ou pipetagem da suspensão celular², pode auxiliar na redução do citoplasma denso.</p>
	Cromossomos fracamente corados	<p>■ Confeção inadequada das lâminas: (1) Quantidade insuficiente de corante aplicado às células; (2) Uso de corante inadequado para o tipo de célula ou estrutura celular a ser corada.</p>	<p>Aumente a concentração ou o tempo de exposição ao corante para aprimorar a coloração das células. Escolha o corante apropriado para o tipo de célula ou estrutura celular a ser corado. Giemsa e Hematoxilina são os corantes mais indicados na coloração convencional de células vegetais, pois reagem bem aos cromossomos de todos os tamanhos. Além disso, são mais simples, permitindo uma observação rápida e direta dos cromossomos, com coloração mais intensa e melhor contraste. Além disso, alguns grupos de plantas, Malvaceae, são conhecidos por corarem fracamente com Giemsa ou hematoxilina. Nesses casos, busque melhorar o contraste através da manipulação digital das imagens.</p>

Tabela 4. Continuação...




PROBLEMAS		POSSÍVEIS CAUSAS	DICAS
	Cromossomos sobrepostos ou pouco espalhados	<ul style="list-style-type: none">Problemas no pré-tratamento e fixação: Exposição prolongada das raízes a antimitóticos pode interferir na separação apropriada dos cromossomos em metáfase mitótica. A fixação inadequada dos cromossomos pode resultar em aglomeração ou sobreposição de cromossomos.	 Evite exposição prolongada de raízes a antimitóticos, pois pode causar contração excessiva e aderência cromossômica. Ajuste o tempo de pré-tratamento conforme a resposta fisiológica de cada espécie na análise citogenética. Prepare a fixação minutos antes do uso, utilizando reagentes de alta qualidade e garantindo completa homogeneização na solução fixadora.
	Dificuldades na definição da morfologia cromossômica	<ul style="list-style-type: none">Cromossomos muito contraídos: Exposição prolongada das raízes a antimitóticos ou exposição das raízes a antimitóticos mais concentrados.	Inicialmente, considere realizar mudanças no tipo de antimitótico, tempo de exposição ou concentração dessa solução. Em seguida, teste o aumento da concentração de ácido acético (de 25% para 40%) no fixador, pois isso pode auxiliar na preservação da morfologia dos cromossomos, mantendo sua estrutura durante o processo de fixação e evitando distorções e contrações cromossômicas.
	Emissão insuficiente de raízes pelas mudas de plantas	<ul style="list-style-type: none">Água em excesso (particularmente para Cactos), má qualidade do solo, falta de luz solar, condições ambientais adversas, má qualidade das mudas, doenças e pragas e fatores genéticos.	Use solo bem drenado com nutrientes adequados. Evite excesso de rega, especialmente em cactos; deixe o solo secar completamente antes de regar (estresse hídrico). Forneça luz solar adequada para o crescimento das raízes. Evite mudanças bruscas de temperatura, ventos fortes e condições adversas. Verifique doenças ou pragas, e cultive mudas saudáveis.

Tabela 4. Continuação...

		POSSÍVEIS CAUSAS 	DICAS 
PROBLEMAS	Imagem sem nitidez	<p>■ O equipamento de microscopia pode estar com defeito ou mal calibrado, por exemplo, a lente objetiva pode estar suja ou desfocada, ou o condensador pode estar mal ajustado. Além disso, verifique se as lamínulas usadas são adequadas e se o conjunto lâmina/lamínula foi bem pressionado.</p>	Verifique a limpeza da lente objetiva e certifique-se de que não está desfocada. Avalie o ajuste do condensador e assegure-se de que as lamínulas utilizadas são apropriadas para o procedimento, assim como o conjunto lâmina/lamínula está corretamente pressionado.
	Lâmina com poucas células	<p>■ Problemas no preparo da lâmina: (1) Excesso de ácido acético na lâmina¹; (2) Poucas raízes ou raízes muito finas; (3) Quantidade desproporcional entre o número de raízes e fixador (metanol: ácido acético)².</p>	Evite o deslocamento das células para as bordas da lâmina, reduzindo a quantidade da gota de ácido acético na maceração da ponta da raiz ¹ . Aumente o número de raízes para confecção da lâmina. Utilize a quantidade de raízes proporcional ao volume de fixador (recomenda-se para o preparo da lâmina o uso de 3 a 4 pontas raízes para cada 50 µL de fixador) ² .
	Metáfases incompletas ou cromossomos muito espalhados	<p>■ Excesso de digestão enzimática e pressão na lamínula¹.</p>	Controle o tempo de digestão e a intensidade das batidas da agulha no conjunto lâmina/lamínula, especialmente após hidrólise ou digestão enzimática prolongada ¹ .
		<p>■ Sonicação excessiva pode danificar as células e as estruturas celulares. Por outro lado, se a pipetagem não for feita com cuidado, as células e os cromossomos podem ser danificados².</p>	Reduza o tempo no banho ultrassônico (sonicação), especialmente quando as raízes foram submetidas a uma hidrólise ou digestão enzimática prolongada ² .

Legenda: Sobrescrito, 1 = Aplicado para as técnicas de esmagamento (Guerra e Souza, 2002), 2 = Aplicado para a técnica de dissociação de células meristemáticas por sonicação (DCMS).

11. Princípios essenciais para convivência no laboratório

Em um laboratório de citogenética, assim como em outros domínios científicos colaborativos, o desempenho eficaz vai além da aplicação de habilidades técnicas-científicas, tais como curiosidade, competência, persistência, leitura, rigor científico, honestidade intelectual, atualização contínua e inovação. Embora essas atribuições

sejam essenciais e devam ser incorporadas pelo pesquisador, por si só, mostram-se insuficientes para garantir o sucesso do grupo de pesquisa e, consequentemente, a sustentabilidade do laboratório.

A gestão e manutenção bem-sucedidas do laboratório requer a aplicação dos princípios de boa convivência, competência comunicativa e ética profissional. A presença de cordialidade, empatia, compartilhamento de conhecimento, valorização da diversidade, respeito mútuo, escolha cuidadosa de palavras, habilidade de ouvir, conciliação trabalho-vida, respeito pelos direitos, dignidade e integridade profissional são essenciais. Esses princípios são cruciais para todos os usuários e membros do grupo de pesquisa, que compartilham a responsabilidade por um ambiente saudável e produtivo.

O pensamento coletivo e institucional emerge como a espinha dorsal do grupo de pesquisa, transcendendo inclinações individualistas. Estes princípios não apenas cultivam um ambiente agradável ao trabalho, mas também



impulsionam avanços significativos nas atividades de pesquisa, estabelecendo as bases para um laboratório produtivo e gratificante para todos os participantes, independentemente das divergências pessoais.



12. Bibliografia consultada

Alves, L. I. F.; Batista, F. R. C.; Neves, J. A. L.; Alves, J. C. F.; Almeida, E. M.; Zappi, D. C. Cytogenetics haracterization of *Tacinga* Britton & Rose (Opuntioideae-Cactaceae). In: ZUFFO, Alan Mario (Org.). As Regiões Semiáridas e suas Especificidades. Atena Editora, Ponta Grossa- PR, 2019.

Adobe Inc. Adobe Photoshop CC (Versão 2023.2). FDM: Adobe Inc., 2021.
Disponível em: <https://www.adobe.com/products/photoshop.html>. Acesso em: 15 de janeiro de 2024.

Barros e Silva, A.E.; Guerra, M. CMA/DAPI Banding of Plant Chromosomes. In: Heitkam, T.; Garcia, S. (eds) Plant Cytogenetics and Cyto genomics. Methods in Molecular Biology, vol. 2672. Humana, New York, NY, 2023.

Barros e Silva, A.E.; Guerra, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. Biotech Histochem, v. 85, n. 2, p. 115-125, Apr. 2010.


Carvalho, C. R. Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.). Viçosa, MG: UFV, 1995. 127 p. (Tese de Doutorado).

Castro, J. P.; Medeiros-Neto, E.; Souza, G.; Alves, L. I. F.; Batista, F. R. C.; Felix, L. P. CMA band variability and physical mapping of 5S and 45S rDNA sites in Brazilian Cactaceae: Pereskioideae and Opuntioideae. Brazilian Journal of Botany, v.39, p. 613–620, 2016.

Castro, Juliana P.; Moraes, Ana Paula; Chase, Mark W.; Santos, Angeline M. S.; Batista, Fabiane R. C.; Felix, Leonardo P. Karyotype characterization and evolution of chromosome number in Cactaceae with special emphasis on subfamily Cactoideae. Acta Botanica Brasilica, v. 34, n. 1, p. 135-148, 2020.

Castro, J. P., Souza, L. G. R., Alves, L. F., Silva, A. E. B., Guerra, M.; Felix, L. P. (2013). IAPT/IOPB chromosome data 15/1. In K. Marhold (Ed.), TAXON, v.62, 1073–1083. DOI: 10.12705/625.16.

Calado, L. L., Alves, L. I. F., Diniz, L. R., Rocha, L., Medeiros, A. P. P., & Batista, F. R. C. (2023). IAPT chromosome data 39/2. In Marhold, K., & Kučera, J. (Eds.), TAXON, 72(5), 1189–1192.



Freitas, J. G.; Alves, L. I. F.; Zappi, D. C.; ALMEIDA, E. M.; Peraza-FLORES, L. N.; Amaral, D. O. J.; Araújo, D. B. P.; Batista, F. R. C. Novelities in Cactaceae from Eastern Brazil: Adding two new species and one new nothospecies to Tacinga (Opuntioideae). *Phytotaxa*, v. 490, n. 3, p. 239–252, 2021.

Griffiths, A. J. F.; Wessler, S. R.; Carroll, S. B.; Doebley, J. Introdução à genética. 11ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2016.

Guerra, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

Guerra, M. F
ISH – Fluorescent in situ hybridization. Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2004.

Guerra, M. Reviewing chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, v. 4, p. 741-743, 1986.

Guerra, M. S. Introdução à Citogenética Geral. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, p.142, 1988.

Guerra, M.; Souza, M. J. Como observar cromossomos – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC, Ribeirão Preto, p. 131, 2002.

Kirov, I.; Khrustaleva, L.; Van Laere, K.; Soloviev, A.; Meeus, S.; Romanov, D.; Fesenko, I. DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics*, v. 11, n. 4, p. 747-757, 2017.

Medeiros Neto E, Nollet F, Moraes AP, Felix LP. Intrachromosomal karyotype asymmetry in Orchidaceae. *Genetics and Molecular Biology*, v. 40, n. 3, p. 610-619, 2017.

Menezes, M. O. T.; Alves, L. I. F. A new tetraploid species of Tacinga Britton & Rose (Cactaceae) from Ceará, Northeastern Brazil. *Revista Rodriguésia*, no prelo.

National Institutes of Health (NIH). ImageJ (Versão 1.53). Bethesda: National Institutes of Health, 2022. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 15 de janeiro de 2024.

Paula, C.; Ribeiro, O. B.C. Cultivo prático de cactáceas. UFV, Viçosa, p.94, 2008.

Pierce, Benjamin A. Genética: um enfoque conceitual. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.774, 2016.

Puertas, M. J.; Naranjo, T. (Ed.). Plant cytogenetics. Basel: Karger, p. 398, 2008.

Puchtler, H; Waldrop FS; Conner, HM; Terry, ST. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. Histochemie, v. 16, p. 361–371, 1968.

Rogatto, S. R. Citogenética sem risco: Biossegurança e garantia de qualidade. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 170, 2000.

Silva, P. K., Alves, L. I. F., Neves, J. A. L., Almeida, E. M., Medeiros Neto, E., Batista, F. R. C., Zappi, D. C., & Felix, L. P. (2019). IAPT chromosome data 30/10. In Marhold, K., & Kučera, J. (Eds.), TAXON, 68(5), 1124–1130. DOI <https://doi.org/10.1002/tax.12156>.

Singh, R. J. Plant cytogenetics. 3ª edição, CRC Press, 2016.

Sumner, A. T. Chromosomes: Organization and Function. Wiley–Blackwell, p.304, 2002.

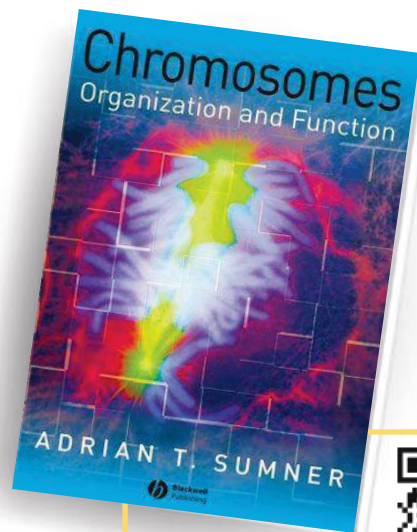
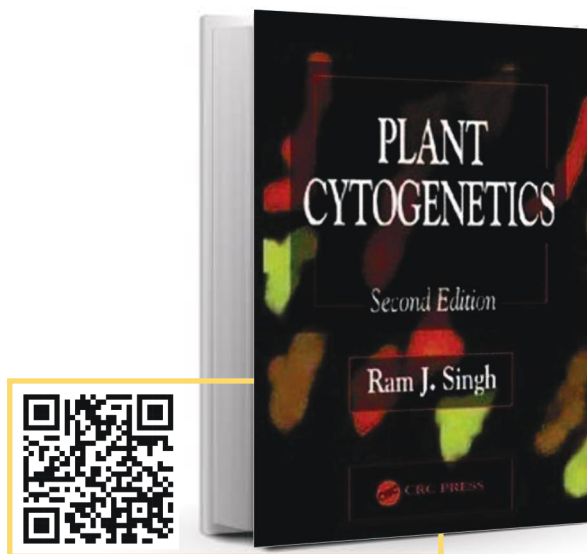
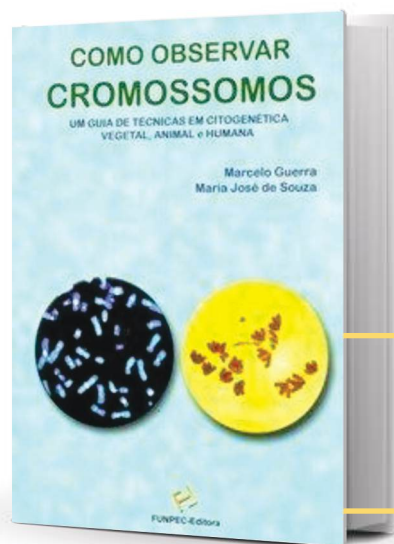
Sumner, A.T. Chromosome Banding. London, Unwin Hyman, 434 pp., 1990.

Zarco, R. C. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon, Vienna, v. 35, p. 526-530, 1986.



13. Anexos

Anexo 1. Livros indicados para o aprofundamento teórico-prático em citogenética vegetal.



Anexo 2- Mapa mental das etapas envolvidas no preparo de lâmina usando a técnica de esmagamento seguido por coloração (Guerra e Souza, 2002).

Como preparar lâmina?



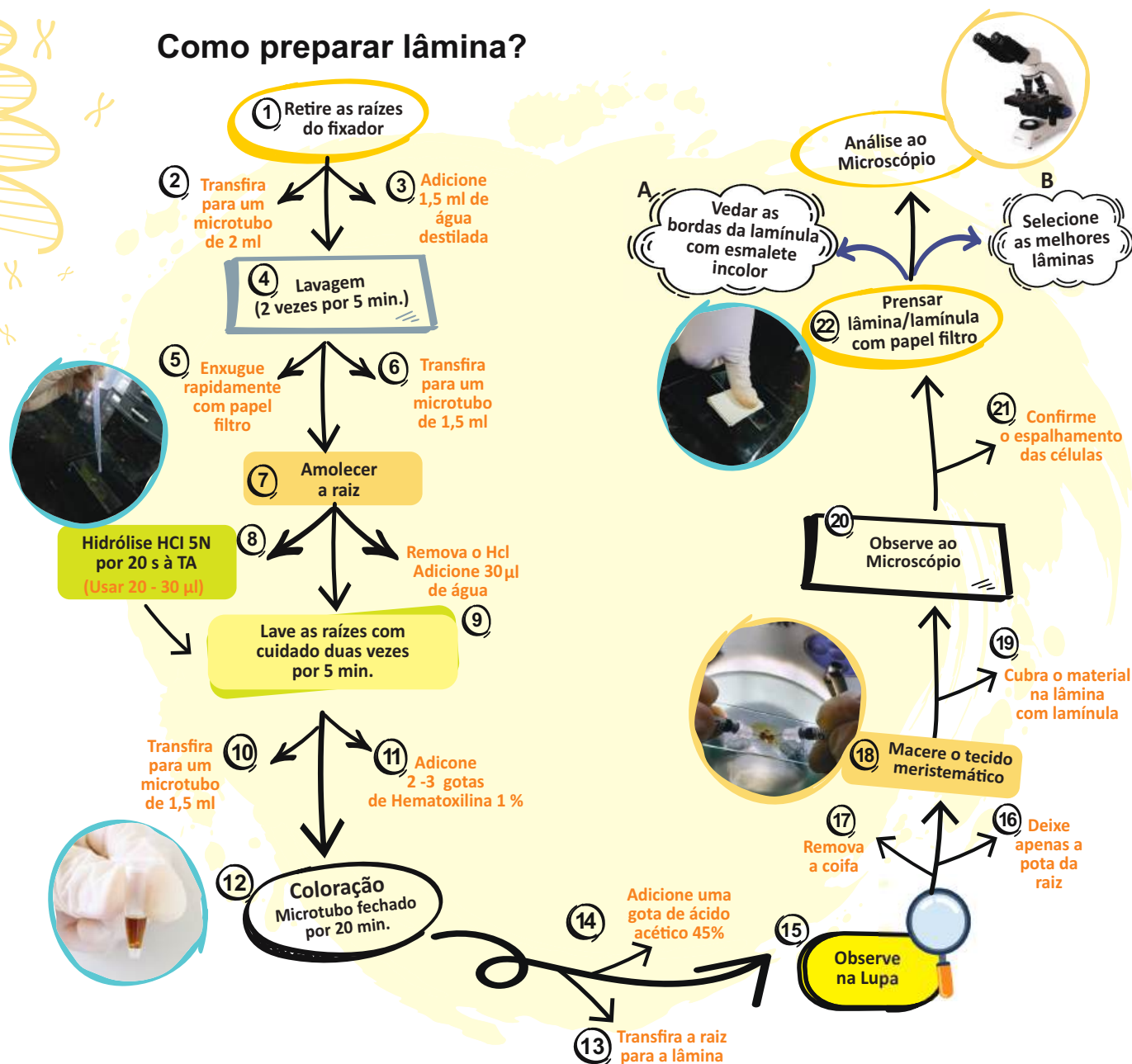
NOTAS:

A: Para a coloração convencional, as raízes devem ser submetidas à hidrólise com HCl 5N por 20 min, à temperatura ambiente (TA).

B: Para a coloração diferencial, é necessário realizar a digestão enzimática das raízes, seguida de incubação por 60 min. a 37°C. Durante o tempo de incubação, deixe a lâmina em uma espécie de câmara úmida na estufa.

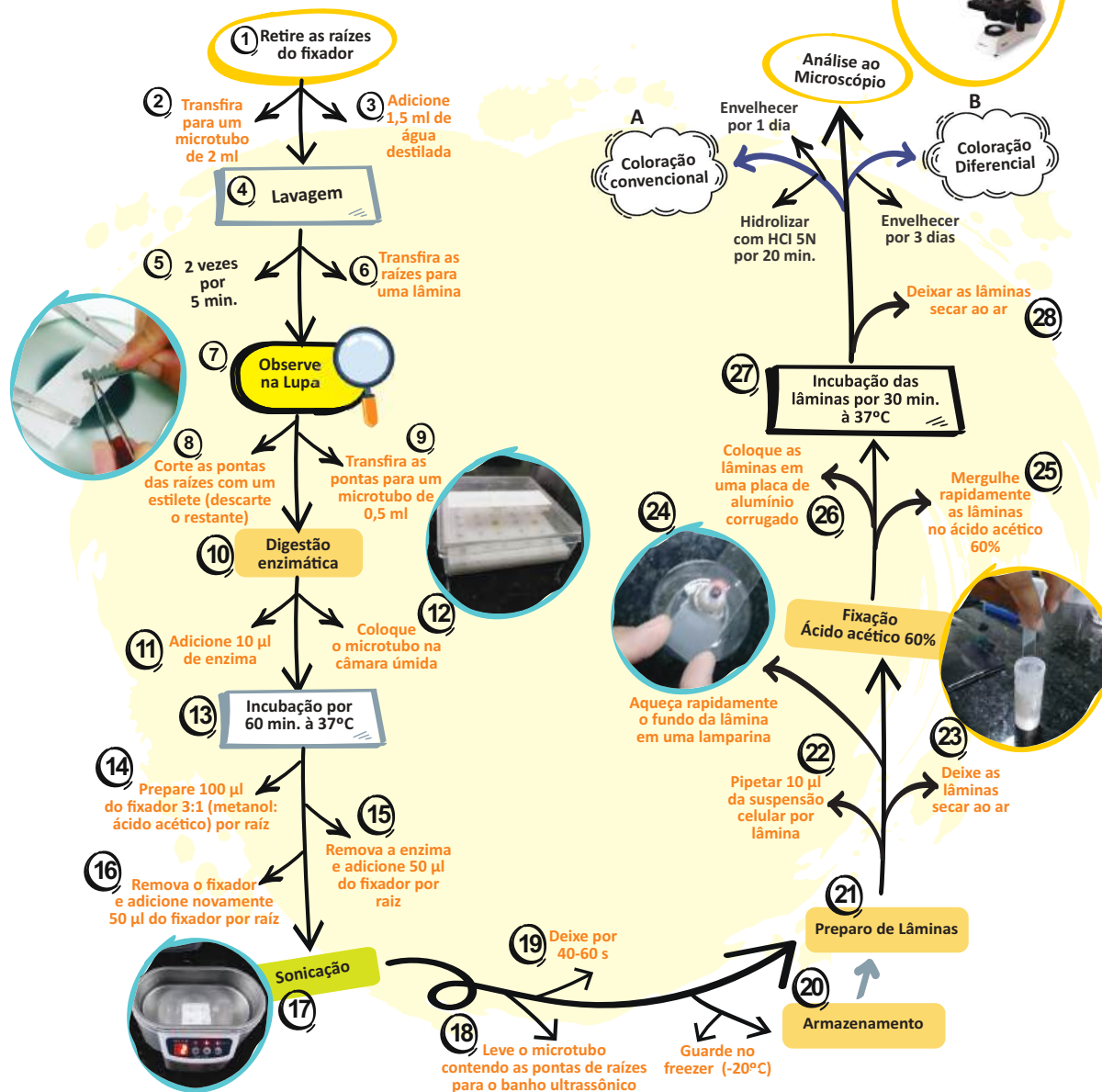
Anexo 3. Mapa mental das etapas da preparação de lâmina usando a técnica coloração com hematoxilina acética 1% seguida por esmagamento (Guerra e Souza, 2002).

Como preparar lâmina?



Anexo 4. Mapa mental das etapas de preparação de lâminas usando a técnica de dissociação de células meristemáticas por sonicação - DCMS.

Como preparar lâmina?



NOTAS:

15: Prepare o fixador minutos antes do uso. Utilize 100 µl de fixador por raiz. Para mais de uma raiz, a quantidade de fixador é de 100 µl x N° de raízes.

16: Remova a enzima com cuidado, evitando a remoção das pontas das raízes no processo. Para isso, utilize o papel filtro cortado em tiras ou uma seringa de insulina.

18: Observe se ocorreu a completa dissociação celular. Caso não tenha ocorrido, repita o tempo de sonicação.

21: As suspensões celulares armazenada no freezer precisam ser ressuspensas antes do uso.

A: Antes do procedimento de coloração convencional, é necessário submeter as lâminas à hidrólise com HCl 5N por 20 min.

B: Para a coloração diferencial, não é necessário realizar a hidrólise com HCl 5N.



Anexo 5. Registros de números cromossômicos (*2n*) e padrões de bandas heterocromáticas em Cactaceae.

Resumo geral de espécies analisadas
N° de gêneros ----- 20
N° de espécies ----- 67
N° de espécies ameaçadas (CR, EN e VU) ----- 14

Tabela 5. Dados citológicos de Cactaceae Juss.: Síntese de estudos publicados pelos autores¹.

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
Arrojadoa Britton & Rose			
<i>Arrojadoa bahiensis</i> (P.J.Braun & Esteves) N.P.Taylor & Eggli	EN	22	N/A
<i>Arrojadoa dinae</i> Buining & Brederoo	NE	22	1t+1p
<i>Arrojadoa luetzelburgii</i> (Vaupel) N.P.Taylor	NE	22	1t + 1p
<i>Arrojadoa penicillata</i> (Gürke) Britton & Rose	NE	22	1t+1p
<i>Arrojadoa rhodantha</i> (Gürke) Britton & Rose	NE	22	1t
Brasilopuntia (K.Schum.) A.Berger			
<i>Brasilopuntia brasiliensis</i> (Willd.) A.Berger	NE	22	2t + 2i
Cereus Mill.			
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	NE	22	1t

Tabela 5. Continuação...

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
<i>Coleocephalocereus</i> Backeb.			
<i>Coleocephalocereus aureus</i> Ritter	NE	22	2t+2pe
<i>Coleocephalocereus decumbens</i> Ritter	NE	22	2t+2pe
<i>Coleocephalocereus goebelianus</i> (Vaupel) Buining	NE	22	2t+2pe
<i>Coleocephalocereus purpureus</i> (Buining & Brederoo) Ritter	EN	22	2t+2pe
<i>Discocactus</i> Pfeiff.			
<i>Discocactus bahiensis</i> Britton & Rose	VU	22	2t
<i>Discocactus zehntneri</i> Britton & Rose	VU	22	1t
<i>Epiphyllum</i> Haw.			
<i>Epiphyllum phyllanthus</i> (L.) Haw.	LC	22	2t
<i>Epiphyllum anguliger</i> (Lem.) G. Don	LC	22	1t
<i>Facheiroa</i> Britton & Rose			
<i>Facheiroa squamosa</i> (Gürke) P.J.Braun & Esteves	NE	22	N/A
<i>Facheiroa ulei</i> (Gürke) Werderm.	EN	22	N/A
<i>Harrisia</i> Britton			
<i>Harrisia adscendens</i> (Gürke) Britton & Rose	NE	22	1t + 4p
<i>Hylocereus</i> (A.Berger) Britton & Rose			
<i>Hylocereus setaceus</i> (Salm-Dyck) R.Bauer	LC	44	4t





Tabela 5. Continuação...

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
<i>Lepismium</i> Pfeiff.			
<i>Lepismium cruciforme</i> (Vell.) Miq.	LC	22	2t
<i>Leocereus</i> Britton & Rose			
<i>Leocereus bahiensis</i> Britton & Rose	NE	22	N/A
<i>Melocactus</i> Link & Otto			
<i>Melocactus azureus</i> Buining & Brederoo	EN	44	2t + 22p
<i>Melocactus bahiensis</i> Luetzelb.	NE	44	N/A
<i>Melocactus ernestii</i> Vaupel	NE	44	3t + 6p
<i>Melocactus lanssensianus</i> P.J.Braun	EN	22	1t + 8p
<i>Melocactus levitestatus</i> Buining & Brederoo	NE	22	1t + 4p
<i>Melocactus oreas</i> Miq.	NE	44	2t + 7
<i>Melocactus zehntneri</i> (Britton & Rose) Luetzelb.	NE	44	2t + 3p
<i>Micranthocereus</i> Backeb.			
<i>Micranthocereus flaviflorus</i> Buining & Brederoo	NE	22	2t
<i>Micranthocereus polyanthus</i> (Werderm.) Backeb	EN	22	N/A
<i>Nopalea</i> Salm-Dyck			
<i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck	NE	22	2i+2t

Tabela 5. Continuação...

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
<i>Opuntia</i> Mill.			
<i>Opuntia dillenii</i> (Ker Gawl.) Haw.	NE	44	2t+6pe
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	NE	88	4t+64pe
<i>Pereskia</i> Mill.			
<i>Pereskia aculeata</i> Mill	LC	22	2t
<i>Pereskia bahiensis</i> Gürke	LC	22	2t
<i>Pereskia grandifolia</i> Haw.	LC	22	2t
<i>Pilosocereus</i> Byles & Rowley			
<i>Pilosocereus aureispinus</i> (Buining & Brederoo) Ritter	DD	22	N/A
<i>Pilosocereus azulensis</i> N. P. Taylor & Zappi	CR	22	N/A
<i>Pilosocereus brasiliensis</i> (Britton & Rose) Backeb.	NT	22	2t
<i>Pilosocereus catingicola</i> (Gürke) Byles & Rowley subsp. <i>cattingicola</i>	NE	44	4t
<i>Pilosocereus catingicola</i> subsp. <i>salvadorensis</i> (Werderm.) Zappi	NE	44	4t
<i>Pilosocereus chrysostele</i> (Vaupel) Byles & G.D.Rowley	NE	22	2t
<i>Pilosocereus floccosus</i> subsp. <i>quadricostatus</i> (Ritter) Zappi	EN	22	2t
<i>Pilosocereus glaucochrous</i> (Werderm.) Byles & G. D. Rowley	VU	22	2t
<i>Pilosocereus magnificus</i> (Buining & Brederoo) Ritter	EN	22	2t





Tabela 5. Continuação...

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
<i>Pilosocereus</i> Byles & Rowley			
<i>Pilosocereus multicostatus</i> Ritte	EN	22	2t
<i>Pilosocereus pachycladus</i> F.Ritter subsp. <i>pachycladus</i>	NE	44	4t
<i>Pilosocereus pachycladus</i> subsp. <i>pernambucoensis</i> (Ritter) Zappi	NE	44	4t
<i>Pilosocereus pentaedrophorus</i> (Cels) Byles & Rowley subsp. <i>pentaedrophorus</i>	NE	22	2t
<i>Pilosocereus pentaedrophorus</i> subsp. <i>robustus</i> Zappi	NE	22	2t
<i>Quiabentia</i> Britton & Rose			
<i>Quiabentia zehntneri</i> (Britton & Rose) Britton & Rose	LC	22	N/A
<i>Rhipsalis</i> Gaertn.			
<i>Rhipsalis baccifera</i> (J.M.Muell.) Stearn subsp. <i>baccifera</i>	NE	44	4t
<i>Rhipsalis cereuscula</i> Haw.	NE	22	2t
<i>Rhipsalis floccosa</i> Salm-Dyck ex Pfeiff. subsp. <i>floccosa</i>	NE	44	N/A
<i>Tacinga</i> Britton & Rose			
<i>Tacinga armata</i> J.G.Freitas & E.M.Almeida	NE	66	2t+2i
<i>Tacinga braunii</i> Esteves	VU	22	3t+1i
<i>Tacinga funalis</i> Britton & Rose	DD	22	2t

Tabela 5. Continuação...

Taxon	Status CNCFlora ²	2n	Bandas ³ CMA ⁺
<i>Tacinga</i> Britton & Rose			
<i>Tacinga gladiospina</i> J.G.Freitas & E.M.Almeida	NE	44	3t+2i
<i>Tacinga inamoena</i> (K.Schum.) N.P.Taylor & Stuppy	DD	44	3t+2st
<i>Tacinga mirim</i> M.O.T. Menezes	NE	44	2st+2t
<i>Tacinga palmadora</i> (Britton & Rose) N.P.Taylor & Stuppy	LC	22	2t
<i>Tacinga subcylindrica</i> M.Machado & N.P.Taylor	NE	44	4t
<i>Tacinga wernerii</i> (Eggli) N. P.Taylor & Stuppy	DD	66	2t+2i
<i>Tacinga</i> × <i>flammea</i> J.G.Freitas & E.M.Almeida	NE	55	2t+1i
<i>Xiquexique</i> Lavor, Calvente & Versieux			
<i>Xiquexique gounellei</i> (F.A.C.Weber) Lavor & Calvente subsp. <i>gounellei</i>	NE	22	2t
<i>Xiquexique gounellei</i> subsp. <i>zehntneri</i> (Britton & Rose) Lavor & Calvente	NE	22	2t
<i>Xiquexique tuberculatus</i> (Werderm.) Lavor & Calvente	NE	22	2t

1. Fontes: Menezes & Alves (2024); Freitas et al (2021); Alves et al (2019); Castro et al (2019); Castro et al (2016); IAPT chromosome data 15/1; IAPT chromosome data 30/10; IAPT chromosome data 39/2.

2.Status de conservação CNCFlora (Flora do Brasil): NE = Não avaliada, DD = Deficiente de dados, LC = Menos preocupante, NT = Quase ameaçada, VU = Vulnerável, EN = Em perigo; CR = Criticamente em perigo.

3. Bandas CMA⁺: N/A = Não analisada, t = terminal, st = subterminal, i = interesticial, pe = pericentromérica.

Anexo 6. Exemplos detalhados de cálculos necessários para a preparação de soluções químicas.

Exemplo 1: Concentração comum (m/v)

- Para preparar 10 mL de uma solução de *DAPI* 2 µg/mL a partir de uma solução de *DAPI* 0,2 mg/mL, usaremos a **equação de diluição**, seguindo alguns passos:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

onde:

- C_1 (concentração inicial) = 0,2 mg/mL
- V_1 (volume inicial) = calcular
- C_2 (concentração desejada) = 2 µg/mL
- V_2 (volume final) = 10 mL.

Nota: Ao resolver qualquer equação, é essencial trabalhar com as mesmas unidades para garantir precisão nos cálculos. Se houver unidades distintas, converta-as.

Passo 1: Converta 2 µg/ml para mg/ml dividindo por 1000. Portanto, $C_2 = 0,002$ mg/ml.

Passo 2: Substitua os valores na equação de diluição e determine o V_1 :

Assim:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,2 \times V_1 = 0,002 \times 10$$

$$V_1 = \frac{0,002 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL}}{0,2 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL (ou 100 } \mu\text{L)}$$

Portanto:

- ✓ Use **0,1 mL** (ou 100 µL) de *DAPI* 0,2 mg/mL;
- ✓ Complete com **9,9 mL** de Tampão;
- ✓ No final, terá 10 mL de **DAPI 2 µg/mL**;
- ✓ Para obter outra concentração comum, seja do mesmo reagente ou de outro, basta utilizar a equação: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, e seguir os passos 1 e 2.

Exemplo 2: Concentração Molar (mol/L)

- Para preparar 300 mL de uma solução de 8-hidroxiquinolina (8HQ) 0,002 M, usaremos uma fórmula baseada na equação de **equação de concentração**, seguindo alguns passos:

$$M = \frac{Q_s}{V(L) \times PM}$$

onde:

- **M** (concentração molar desejada) = 0,002 M (mol/L)
- **Q_s** (quantidade de soluto em g necessária do reagente) = calcular.
- **V** (volume da solução a ser preparada) = 300 mL
- **PM** (Peso molecular do reagente) = 145.16 g/mol

Passo 1: Converta 300 mL para litros dividindo por 1000: Portanto, **V** = 0,3 L;

Passo 2: Identifique no rotulo do reagente o peso molecular: **PM** =145.16 g/mol;

Passo 3: Substitua os valores acima na equação concentração molar dada e determine a **Q_s**:

Assim:

$$M = \frac{Q_s}{V(L) \times PM}$$

$$0,002 = \frac{Q_s}{0,3 \times 145,16}$$

$$Q_s = 0,002 \cancel{\text{ mol/L}} \times 0,3 \cancel{\text{ L}} \times 145,16 \text{ g/mol}$$

$$Q_s = 0,087 \text{ g}$$

Portanto:

- ✓ Pese **0,087g** de 8HQ (145.16 g/mol);
- ✓ Dilua em **300 mL** de água destilada;
- ✓ No final, terá 300 mL de **8HQ 0,002 M**;
- ✓ Para obter outra concentração molar, seja do mesmo reagente ou de outro, basta utilizar a equação: **M = Q_s / V x PM**, e seguir os passos 1, 2 e 3.

Exemplo 3: Concentração percentual simples

➤ Preparar 20 mL de solução de *celulase 2%* e *pectinase 20%*. Dado que a celulase é em pó e a pectinase é líquida, e ambas serão diluídas em uma solução tampão. Usaremos uma **equação simples**, seguindo alguns passos:

$$Q_r = V \text{ (mL)} \times C$$

onde:

- Q_r (quantidade de reagente) = calcular
- V (volume desejado) = 20 mL
- C (concentração desejada em decimal) = 0,02 (2% celulase) e 0,2 (20% pectinase)

Passo único: Substitua os valores na equação e determine o Q_r . Neste caso específico, uma será dada em gramas e a outra em mL.

Assim:

- **Solução de Celulase 2%** (sólido):

$$Q_r = 0,02 \times 20$$

$$Q_r = 0,4$$

- **Pectinase 20%** (líquido):

$$Q_r = 0,2 \times 20$$

$$Q_r = 4$$

Portanto:

- ✓ Pese **0,4 g** de celulase;
- ✓ Pipete **4 mL** de pectinase;
- ✓ Complete com **16 mL** de Tampão;
- ✓ No final, terá 20 mL de **celulase 2% e pectinase 20%**;
- ✓ Para obter outra concentração comum, seja do mesmo reagente ou de outro, basta utilizar a equação: $Q_r = V \times C$, e seguir os passos 1 e 2;
- ✓ Não importa se a substância fornecida em percentual é sólida ou líquida, ambas podem ser calculadas pela mesma equação.

14. Glossário

Adenina (A)	Base purínica que faz par com a timina.
Água Milli-Q	É água purificada por um sistema de purificação de laboratório da MilliporeSigma, passando por processos avançados para remover impurezas e garantir alta qualidade, atendendo aos padrões necessários para aplicações laboratoriais sensíveis.
Antimitótico	São substâncias que interferem na divisão celular, atuam impedindo a formação das fibras do fuso (microtúbulos), que são estruturas que separam os cromossomos na anáfase, mantendo as células em metáfases.
Banho ultrassônico	Equipamento composto por três partes: gerador, transdutor e tanque, operando com água, comumente destilada. Utilizado em citogenética para dissociação celular durante a preparação de amostras para análises cromossômicas, assegurando resultados confiáveis.
Background	É uma palavra em inglês que pode ser traduzida como "fundo", algo que está por trás. No contexto da citogenética é traduzida como sendo sujeira na lâmina que impedem a visualização dos sinais de sondas.
Braço curto (c)	Menor braço cromossômico.
Braço longo (l)	Maior braço cromossômico.
Braço do microscópio	Também chamado de coluna, é fixo na base do microscópio e serve de suporte para as demais partes.
Células meristemáticas	São células especializadas com alta atividade mitótica encontradas nas regiões de crescimento ativo das plantas, conhecidas como meristemas.
Câmara úmida	É um dispositivo usado para criar um ambiente úmido e controlado durante várias etapas de preparação de amostras para análise citogenética. Isso é especialmente importante ao lidar com cromossomos, pois eles podem ser sensíveis à desidratação e danos.



Características conspícuas	Ou caráter conspícuo, é toda e qualquer característica claramente observada no cariótipo das espécies.
Cariótipo	O complemento cromossômico inteiro de um organismo individualizado ou célula, visto durante a metáfase mitótica.
Cariograma	Construído a partir da imagem real dos cromossomos de uma metáfase, em que todos os cromossomos estão bem corados e individualizados. Estes cromossomos são recortados e ordenados, esquematicamente, juntando os pares de cromossomas homólogos, possibilitando o estudo do cariótipo.
Centrômero (constricção primária)	Região especializada do DNA em cada cromossomo eucariótico, que age como um sítio para a ligação de proteínas do cinetócoro.
Charriot	Peça que permite movimentar a lâmina sobre a platina, geralmente localiza-se na lateral direita.
Citogenética	Compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto a sua variação e evolução.
Citotaxonomia	Disciplina que busca utilizar características do cariótipo, especialmente o número, tamanho, morfologia e estrutura cromossômica, na classificação dos seres vivos.
Citosina (C)	Base pirimídica do DNA que faz par com a guanina.
CMA (Cromomicina A3)	Complexo de diversos antibióticos glicosídicos intimamente relacionados derivados do fungo <i>Streptomyces griseus</i> . Fluorocromo base específico para observar regiões ricas em citosina e guanina.
Colchicina	Principal alcalóide extraído da <i>Colchicum autumnale</i> , utilizado como antimitótico para cromossomos grandes na citogenética.

DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol)	Corante fluorescente que emite a cor azul brilhante, fluorocromo base específico para observar regiões ricas em adenina e timina. Devido à afinidade pelo material genético gerar pouco background citoplasmático, é utilizado como contracorante nuclear clássico na microscopia de fluorescência.
Desnaturação	Separação de dois filamentos de uma dupla hélice de DNA ou grave perturbação da estrutura de qualquer molécula complexa sem quebra das principais ligações de suas cadeias.
Dissociação celular	É o processo de separar células umas das outras para obter uma suspensão de células individuais. Essencial em diversas áreas da biologia, biotecnologia e pesquisa científica, a dissociação celular pode ser realizada por métodos físicos, químicos ou enzimáticos, dependendo das características celulares e dos objetivos experimentais.
Digestão enzimática	Uso de enzimas ou mix de enzimas em diferentes concentrações para amolecimento de tecidos.
Diploide	Uma célula que tem dois conjuntos cromossômicos, ou um organismo individual tendo dois conjuntos cromossômicos em cada uma de suas células.
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Composto químico orgânico que possui a fórmula química $(CH_3)_2SO$. É um solvente polar aprotico, o que significa que pode dissolver uma ampla variedade de compostos, tanto polares quanto apolares.
DNA (Ácido desoxirribonucleico)	É um tipo de ácido nucleico que armazena e transmite as informações genéticas da maioria dos seres vivos. O DNA é formado por duas cadeias de nucleotídeos, que se enrolam uma sobre a outra, formando uma dupla hélice. Cada nucleotídeo é composto por um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada. A sequência de bases no DNA determina a informação genética que é transmitida para as proteínas e o RNA.
DNA ribossomal (DNAr)	É uma sequência de DNA contida nos cromossomos do nucléolo que codifica RNA ribossomal. Estas sequências regulam a transcrição e iniciação da amplificação e contêm segmentos espaçadores transcritos e não-transcritos.





DNA repetitivo	DNA redundante; sequências de DNA que estão presentes em muitas cópias por conjunto cromossômico.
DNA satélite	Qualquer tipo de DNA altamente repetitivo, antes definido como DNA formador de bandas satélite após centrifugação em um gradiente de densidade de cloreto de céso.
Entellan ®	É uma resina sintética usada como meio de montagem em microscopia. Aplicada sobre amostras em lâminas de vidro, ela seca formando uma película transparente e dura, preservando e protegendo permanentemente as amostras para observação microscópica.
Esmagamento	Tecidos da amostra colocados entre lâmina e lamínula esmagados pela pressão do polegar sob a lamínula.
Exsicata	Amostra de planta prensada e, em seguida, seca em uma estufa (herborizada), fixada em uma cartolina de tamanho padrão acompanhada de uma etiqueta ou rótulo contendo informações sobre a planta, coletor(es) e data, características ecológicas e local de coleta que compõem uma coleção de plantas secas, conhecidas como herbário.
Fixador	Solução composta por reagentes combinados em diferentes proporções, utilizados para a coagulação e precipitação das proteínas, mantendo a forma e a estrutura do conteúdo celular.
Fluorocromo (fluoróforo)	É um grupo funcional da molécula que absorverá energia de um comprimento de onda específica e posteriormente a emitirá em outro determinado comprimento de onda maior.
Formula cariotípica (FC)	Determinação dos tipos cromossômicos presentes no cariótipo, com base a partir da definição da posição do centrômero por meio da determinação da razão entre os braços cromossômicos (r) ou índice centromérico (ic).
Fotomicroscópio	Instrumento que consiste numa combinação de um microscópio e de um aparelho fotográfico que se destina a fazer fotomicrografias.
Fonte de luz	Nos microscópios modernos é uma lâmpada, mas em microscópios mais antigos era um espelho que refletia a luz.

Gap	Em português, o termo "gap" é traduzido como "lacuna" ou "intervalo". No contexto utilizado em citogenética, significa regiões cromossômicas que não são coradas com DAPI ou CMA.
Genotóxico	Substâncias que possuem ação sobre o genoma da célula e, conforme o tipo celular alterado pela substância ou agente genotóxico, ocorrem diferentes efeitos: carcinogênico, mutagênico ou teratogênico.
Guanina (G)	Base purínica do DNA que faz par com citosina.
Gloquídios	São espinhos semelhantes a pelos ou espinhos curtos, geralmente farpados, encontrados nas aréolas de alguns cactos.
Herbário	É uma coleção dinâmica de espécimes de fungos ou de plantas, de modo geral, desidratados ou preservados em meio líquido, destinada a servir como documentação da diversidade vegetal e fúngica.
Heterocromatina	Material nuclear que se mantém condensado em todo o ciclo celular, ao contrário do resto do cromossomo, que apresenta um ciclo de condensação-descondensação.
Heterocromatina constitutiva	Regiões cromossômicas de cromatina permanentemente condensada. Geralmente ocorre em um par de cromossomos homólogos, e não é transcrito devido à sua composição do DNA.
Híbrido	Híbrido – É uma espécie que resulta do cruzamento entre indivíduos de espécies diferentes, mas geneticamente próximas. Geralmente, os híbridos são estéreis, pois possuem um número diferente de cromossomos dos seus pais ou devido a incompatibilidades de genes. Porém, em alguns casos raros, os híbridos podem ser férteis e dar origem a novas espécies.
Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) –	É uma técnica de citogenética molecular que utiliza sondas de DNA marcadas com fluorocromos, utilizada para hibridizar com o DNA-alvo.
Hidrólise	É uma reação química de quebra de ligação química de uma molécula com a adição de uma molécula de água. Em citogenética, a hidrólise consiste no amolecimento dos tecidos por meio da ação do ácido clorídrico (HCl).





Ideograma	Desenho esquemático do cariótipo, cujos cromossomos são organizados aos pares. Esse tipo de esquema permite mostrar informações como o tipo de cromossomo (localização do centrômero), RONS, tamanho dos braços e bandeamentos.
Maceração	Envolve o amolecimento ou desintegração dos tecidos, permitindo um acesso mais fácil às células para análises cromossômicas.
Macrométrico	Parafuso que permite regular a altura da platina. Faz movimentos amplos para um ajuste grosso.
Meio de montagem Mcllvaine/glicerol	Solução usada como meio de montagem para lâminas semipermanentes coradas com fluorocromos. É preparada a partir da mistura de tampão Mcllvaine (pH 7,0) e glicerol (glicerina) numa proporção de 1:1.
Menisco	Em física e química, refere-se à curva que se forma na superfície de um líquido quando ele entra em contato com as paredes de um recipiente. Isso ocorre devido à tensão superficial do líquido. O menisco pode ser côncavo ou convexo, dependendo das interações entre o líquido e as paredes do recipiente.
Meristema	São áreas de tecido embrionário e indiferenciado, onde ocorre a divisão celular e a formação de novas células.
Metadados	Conjunto de informações adicionais sobre um determinado dado em análise.
Microscópio de campo claro	Técnica de microscopia óptica comumente usada quando a luz passa através da amostra, fazendo com que a área observada seja bem iluminada. O feixe de luz passa através da amostra sendo captado pela objetiva.
Microscópio de fluorescência	Uma molécula com propriedade fluorescente emite luz com comprimento de onda na faixa visível quando exposta a uma fonte ultravioleta (UV). A excitação e a emissão de luz das moléculas fluorescentes são reguladas por filtros para promover cor e contraste.
Micrométrico	Parafuso que permite regular a altura da platina. Permite um ajuste fino do foco.

Mitose	Um tipo de divisão celular em que uma célula (a célula-mãe) se divide para produzir duas novas células (as filhas) que são geneticamente idênticas a ela. No contexto do ciclo celular, a mitose é a parte do processo de divisão em que o DNA do núcleo das células é dividido em dois conjuntos iguais de cromossomos.
Número cromossômico (2n)	Número de cromossomos encontrado em células somáticas com dois conjuntos cromossômicos.
Objetivas	Geralmente três ou quatro, são lentes de maior poder de ampliação.
Oculares	Dois sistemas de lentes (em microscópios monoculares há apenas um). As oculares geralmente têm poder de aumento de 10x e é por meio delas que observamos a imagem ampliada.
Óleo de imersão	É um óleo especial usado para melhorar a resolução das imagens de microscopia óptica em objetivas de maior ampliação. Sua principal função é reduzir a perda de luz causada pela refração quando a luz passa do vidro da lente para o ar e, em seguida, para a amostra.
Overnight	É uma expressão em inglês que significa, em português, que algo deve ser deixado em processo ou ocorrendo durante toda a noite.
Platina	Também chamada de mesa, é o suporte onde será colocada a lâmina. A platina pode ser levantada ou baixada para regular o foco, utilizando-se os parafusos macro e micrométrico.
Pipetagem	Processo de transferência de volumes precisos de líquidos entre recipientes usando pipetas.
Região intercalar ou intersticial (i)	Porção intermediária dos braços cromossômicos.
Região pericentromérica (pe)	Região em torno do centrômero.
Região proximal (p)	Região próxima ao centrômero.





Região terminal ou telomérica (t)	Porção terminal dos braços cromossômicos.
Regiões organizadoras do nucléolo (RONs)	Correspondem segmentos do DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, de 18S, 5.8S e 28S, situados no nucléolo da célula.
Repetição em tandem	Fragmentos idênticos que se repetem um atrás do outro por centenas a milhares de vezes.
Revólver	Peça giratória que comporta as objetivas. Para trocar de objetiva, sempre manuseie o revólver, nunca force as objetivas
Satélite	Seguimento cromossômico situado entre constrição secundária e o telômero.
Suspensão celular	Mistura homogênea de células individuais em uma solução líquida, obtida por meio de dissociação celular.
Sonicação	Refere-se ao processo de aplicar ondas sonoras de alta frequência a uma amostra, geralmente em líquido, para diversos fins, como a dispersão de partículas, a dissolução de substâncias ou a dissociação celular. O equipamento utilizado para realizar a sonicação é chamado de sonicador ou banho ultrassônico.
Tampão Mcllvaine	É uma solução de ácidos cítrico e fosfórico usada em laboratórios para manter um pH constante em experimentos citomoleculares, especialmente aqueles envolvendo enzimas. Ele ajuda a estabilizar as condições de reação, garantindo resultados consistentes. É assim nomeado em homenagem ao químico e bioquímico americano William H. Mcllvaine.
Táxon	É a denominação que designa um conjunto de organismos incluídos em qualquer nível hierárquico de classificação. Família Iridaceae, gênero <i>Alophia</i> , espécie <i>Alophia drummondii</i> , por exemplo, são táxons em diferentes níveis hierárquicos de uma mesma família.
Taxa	Plural de táxon.
Tecido meristemático	Tecido vegetal encontrado nas zonas de crescimento das plantas. Constituído por células indiferenciadas com grande capacidade de multiplicação e especialização (células meristemáticas).

Telômero	Estrutura constituída por sequências repetitivas de DNA não codificante que formam as extremidades dos cromossomos.
Timina (T)	Base pirimídica do DNA que faz par com adenina.
Tubo	Suporte das oculares. Também chamado de canhão.
Vórtex	Na prática, são movimentos espirais ao redor de um centro de rotação, para tanto equipamento denominados de agitador vórtex, são utilizados no laboratório para agitação e homogeneização de líquidos contidos em pequenos tubos ou frascos.
Voucher	O termo voucher refere-se ao material testemunho de uma planta, usualmente prensado, desidratado e incluído no acervo de um herbário.
Vernacular	Nome popular ou vulgar de um táxon que não seja o nome científico.
Xilol	Hidrocarboneto aromático ($C_6H_4(CH_3)_2$) que produz um efeito narcótico se for inalado em altas concentrações. Comumente utilizado para desmontar lâminas permanentes coradas convencionalmente.



15. Quiz: Desafie-se com um teste sobre nosso Guia



A gamificação é uma abordagem pedagógica que utiliza os princípios e as mecânicas dos jogos para promover a aprendizagem significativa, ativa e colaborativa. Essa estratégia se fundamenta na ideia de que os jogos têm o potencial de gerar engajamento, motivação, desafio, feedback e recompensa, elementos essenciais para o processo de ensino e aprendizagem.

Uma das plataformas que incorpora a gamificação na educação é o Quizizz.com, um sistema online que permite aos professores e alunos criarem e participarem de quizzes interativos, adaptativos e personalizados. Dessa forma, desenvolvemos um quiz nessa plataforma para que você, leitor, possa testar os principais conceitos e práticas abordadas em nosso Guia.

Você pode acessar nosso quiz pelo link: https://quizizz.com/admin/quiz/659c7c8e2a5106d2f53c7781?source=quiz_share; ou através do QR code logo abaixo. Para se inscrever no Quizizz.com, você pode utilizar o Google, o e-mail, o Classlink, o Clever ou outras opções.





MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



✉ insa@insa.gov.br

☎ 83 3315.6400

🐦 [insamctic](https://twitter.com/insamctic)

📘 [insamcti](https://www.facebook.com/insamcti)

📷 [insamctic_](https://www.instagram.com/insamctic_)

ISBN: 978-85-64265-95-0

CD



9 788564 265950

