

CAPITOLO 4

I COLORANTI IN MICROSCOPIA

Sin da quando è stato inventato il microscopio, si è subito sentita l'esigenza di colorare alcuni tipi di oggetti di osservazione perchè altrimenti invisibili. I coloranti in microscopia sono stati usati per la prima volta nel XVIII secolo: lo zafferano per tingere le fibre muscolari e poco dopo il carminio per tingere preparati vegetali.

L'utilizzo della colorazione dei preparati microscopici, grazie alle esperienze ed al progredire della chimica, è diventato fondamentale per l'analisi istologica, in quanto i nuovi coloranti, che via via si sono perfezionati, sono in grado di colorare solo alcune parti del preparato, lasciandone incolore o tingendone di un altro colore, altre (coloranti metacromatici). Oggigiorno le tecniche di colorazione sono indispensabili in microscopia; la quantità dei reagenti e dei coloranti disponibili è veramente notevole e ad ogni colorante o insieme di coloranti, corrispondono protocolli con procedure di utilizzo rigidissime, che difficilmente è possibile attuare se non si dispone di un laboratorio attrezzato.

Per protocollo si intende tutto l'insieme di trattamenti e procedure da eseguire rigorosamente sul campione da osservare e per la preparazione dei reagenti. Il metodo di allestimento di un campione per l'osservazione microscopica e scientifica deve essere sempre lo stesso al fine di ottenere risultati certi, ripetibili e comparabili.

ORIGINE E NATURA DEI COLORANTI

I coloranti possono essere estratti sia dal regno animale che da quello vegetale, anche se per la maggior parte sono prodotti di sintesi.

I principali coloranti naturali sono:

- 1) **Zafferano** estratto dal fiore dello zafferano;
- 2) **Carminio** estratto dal corpo e dalle uova di una cocciniglia, la *Dactylopius coccus* originaria dell'America centrale, parassita di alcune cactacee, che è anche un colorante alimentare (E120, E124) e viene utilizzato nell'industria cosmetica;
- 3) **Ematossilina**, estratta dal legno della pianta *Haematoxylon campechianum*.

L'argomento in esame è molto complesso e le tecniche della colorazione vanno ben oltre le mie competenze, comunque cercherò di dare alcuni suggerimenti, grazie ai quali potrete districarvi in questo difficile campo.

Un primo problema pratico che si trova a dover affrontare un neofita della microscopia è la reperibilità dei coloranti. Il loro costo, inoltre, è elevato e le quantità vendute sono spesso eccessive per un uso amatoriale. È bene ricordare, infatti, che per effettuare una colorazione bastano poche gocce e che i coloranti hanno una scadenza, dopo la quale diventano inutilizzabili.

Alcuni coloranti sono facilmente reperibili in farmacia o in negozi di acquari, celati sotto nomi di diversi prodotti, come alcuni disinfettanti, il cui principio attivo è proprio il colorante. Certamente questi sostituti non hanno la purezza delle sostanze utilizzate nei laboratori d'analisi, ma ci consentono ugualmente di raggiungere il nostro scopo.

I tre coloranti generici più usati e facilmente reperibili sono:

- 1) **BLU DI METILENE**;
- 2) **EOSINA**;
- 3) **TINTURA DI IODIO**;

Prima di illustrare le loro proprietà, funzioni, nonché modalità di impiego, passo ora, brevemente, a dare alcune indicazioni pratiche su dove e come possono essere reperiti.

BLU DI METILENE: si può facilmente acquistare in alcune farmacie; ha l'aspetto di polvere blu/nera che deve essere opportunamente preparata prima del suo utilizzo. Nel caso in cui la ricerca nelle varie farmacie sia infruttuosa, vi consiglio di recarvi in un negozio di acquari.

Il *blu di metilene* viene infatti impiegato per la cura di una malattia dei pesci chiamata volgarmente "ittio". Qualora il negoziante ne sia sprovvisto, potete comunque farvi dare un qualsiasi altro farmaco per la cura di questa malattia, infatti il principio attivo utilizzato per la cura dell' "ittio", non è altro che il *blu di metilene*.

EOSINA: è reperibile in farmacia in polvere rossa, ma se il farmacista ne è sprovvisto allora dovrete sostituirla con un qualsiasi disinfettante cutaneo a base di *eosina*.

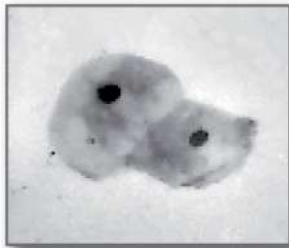
TINTURA DI IODIO: è anch'essa reperibile in farmacia, quale principio attivo di diversi farmaci disinfettanti; anche in questo caso potrete chiedere consiglio al farmacista.

Passiamo ora alla preparazione dei coloranti e al loro utilizzo differenziandolo in base ai nostri scopi ed a ciò che vogliamo osservare.

PREPARAZIONE DEI COLORANTI IN MICROSCOPIA

Mi occuperò, ora, della preparazione dei coloranti e del loro utilizzo, variabile in base al fine, nonché all'oggetto di osservazione.

BLU DI METILENE: È un colorante generico indispensabile che viene utilizzato principalmente per mettere in evidenza il nucleo delle cellule. (vedi foto mucosa della bocca). La sua preparazione è



Cellule di sfaldamento della mucosa della bocca

semplice: la polvere va sciolta in acqua demineralizzata ed il prodotto va poi conservato in un recipiente ben chiuso. Viene utilizzato normalmente all' 1% (un grammo di polvere è sufficiente per 100 grammi di soluzione) ma si può usare anche più diluito, prolungando poi il tempo di immersione o di permanenza del preparato nel colorante.

Nel caso in cui non abbiate trovato il colorante in polvere e dobbiate utilizzare, in sua sostituzione, un farmaco acquistato in farmacia, potete usarlo puro senza diluizioni.

EOSINA: È un colorante generico che colora però prevalentemente il citoplasma della cellula. Si usa in concentrazione dell'1%, oppure, si può alternativamente utilizzare il disinfettante acquistato in farmacia senza diluizioni.

TINTURA DI IODIO: Questo colorante serve per mettere in evidenza eventuali granuli di amido che si coloreranno di un colore bruno/violaceo.

Prima di qualsiasi colorazione è fondamentale trattare correttamente il campione da osservare; possiamo, tuttavia, effettuare un semplice esperimento, senza alcuna preventiva preparazione, per renderci facilmente conto del diverso comportamento dei coloranti sopra illustrati.

COLORIAMO UNA FETTA DI PATATA

Prendiamo tre fettine sottilissime di patata e mettiamole in tre “vetri da orologio” (i vetri da orologi sono recipienti in vetro con una leggera concavità *vedi foto a lato*, chi non ne disponesse può usare un bicchierino di plastica da caffè) contenenti i diversi coloranti. Attendiamo circa dieci minuti, sciacquiamo



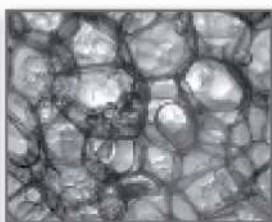
le fettine, con acqua fredda, sotto il getto di un rubinetto e dopo averle poste su tre vetrini distinti, coprendole con un vetrino copri-oggetto, aggiungiamo una goccia d'acqua e passiamo all'osservazione al microscopio. Anche

se non abbiamo ottenuto un vetrino perfetto a causa dell'elevato spessore della fetta, questo ha poca importanza ai fini dell'esperimento, purché nell'osservazione non vengano superati i 40 - 100 ingrandimenti.

Le foto delle fettine di patata tinte con i tre diversi coloranti sono state scattate a 100 ingrandimenti (al microscopio). Si notano, in particolare: nella prima i granuli di amido tinti di blu scurissimo dalla tintura di iodio; nella seconda le pareti cellulari della polpa della patata, tinte con il blu di metilene, mentre nella terza, il citoplasma della cellula, tinto con l'eosina.



Patata tinta con
tintura di iodio



Patata tinta con
blu di metilene



Patata tinta con
eosina

In queste tre foto il nucleo delle cellule è quasi invisibile perchè nascosto dall'amido

LA COLORAZIONE NEGATIVA

La colorazione negativa è un particolare tipo di colorazione che viene utilizzata amatorialmente per mettere in evidenza su un campo nero i batteri (vedi foto sottostante). Per effettuarla è sufficiente diluire in due gocce di **inchiostro di china**, poste a lato di un vetrino, una piccolissima goccia di acqua contenente batteri. Sarà sufficiente effettuare “uno striscio” di questa goccia nera su tutta la superficie del vetrino ed attendere che l’inchio-



stro si secchi perfettamente. A questo punto si copre il tutto con un vetrino coprioggetto e si può procedere all’osservazione. Si noteranno i batteri come corpuscoli luminosi in evidenza su di un campo scuro.

UNA COLORAZIONE DA NOBEL

Al fine di mettere in evidenza le cellule nervose, Camillo Golgi scoprì nel 1873 la colorazione cromo-argentina denominata “reazione nera”. Questo tipo di colorazione, che impiega sali di cromo e di argento, permise di mettere in evidenza, per la prima volta, i dettagli e le ramificazioni delle cellule nervose tingendole di nero.

Nel 1906 Camillo Golgi, grazie anche a questa scoperta, vinse il premio Nobel per la medicina.