

Redução da utilização de xilol no processamento histológico de amostras biológicas de animais para comparação com a técnica padrão/convencional

Reduction in the use of xylene in the histological processing of biological samples from animals compared to the standard/conventional technique

DOI: 10.34188/bjaerv6n4-041

Recebimento dos originais: 05/08/2023

Aceitação para publicação: 30/09/2023

Andreia Mikowski

Mestranda – Pós-graduação Departamento de Medicina Veterinária
Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste
Endereço: Alameda Elio Antônio Dalla Vecchia, 838 – Guarapuava-PR, Brasil
E-mail: andreiamikowski@gmail.com

Gabriel Mikowski

Técnico Histopatológico
Instituição: Histocenter Laboratório de Anatomia patologia e Citopatologia LTDA
Endereço: Rua Professor Becber, 2565 - Guarapuava-PR, Brasil
E-mail: gabrielmikowski@gmail.com

Jayme Augusto Peres

Doutor, Docente - Departamento de Medicina Veterinária / Anatomia Patológica e Medicina Veterinária Legal
Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste
Endereço: Alameda Elio Antônio Dalla Vecchia, 838 – Guarapuava-PR, Brasil
E-mail: perespatologia@gmail.com

Ivo Ilvan Kerppers

Doutor, Docente - Departamento de Fisioterapia
Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste
Endereço: Alameda Elio Antônio Dalla Vecchia, 838 – Guarapuava-PR, Brasil
E-mail: ikerppers@unicentro.br

RESUMO

Técnicas histológicas auxiliam no processamento de amostras biológicas aplicadas ao estudo e diagnóstico, utilizando reagentes e corantes que favorecem a análise de células e tecidos. O tempo de preparo das amostras é longo e o uso de reagentes químicos potencialmente tóxicos expõe os manipuladores e gera resíduos químicos ambientais, inclusive o xileno, um hidrocarboneto aromático amplamente utilizado como agente clarificante e desparafinante. Este estudo visa reduzir o uso de xileno na etapa final da coloração de hematoxilina e eosina em comparação com o protocolo padrão para coloração em diferentes amostras de tecidos de animais necropsiados, sem perder a qualidade da amostra e o diagnóstico. Sessenta e seis lâminas foram confeccionadas a partir de 3 blocos de parafina, divididas em dois grupos e coradas em HE com xileno e com redução ou sem xileno. As lâminas foram analisadas por 25 profissionais das áreas biológica e veterinária, e os resultados expressos por estatística descritiva, apresentando os valores médios. O teste de correlação do Coeficiente de Spearman foi realizado no programa estatístico Jamovi. As lâminas do grupo de teste apresentaram melhores médias estáticas do que as do grupo de controle. Concluindo que o

xileno pode ser reduzido e excluído da última etapa de coloração, mantendo a qualidade estrutural do tecido e diagnóstico, reduzindo custos operacionais e sem prejudicar a saúde do trabalhador.

Palavras-chave: coloração, desparafinação, meio ambiente, poluição, toxicidade

ABSTRACT

Histological techniques help in the processing of biological samples applied to the study and diagnosis, using reagents and dyes that favor cell and tissue analysis. Sample preparation time is long and the use of potentially toxic chemical reagents expose handlers and generate environmental chemical residues, including xylene, an aromatic hydrocarbon widely used as a clarifying and dewaxing agent. This study aims to reduce the use of xylene in the final stage of hematoxylin and eosin staining compared to the standard protocol for staining in different tissue samples from necropsied animals, without losing sample quality and diagnosis. Sixty-six slides were made from 3 paraffin blocks, divided into two groups and stained in HE with xylene and with reduction of without xylene. The slides were analyzed by 25 professionals from the biological and veterinary areas, and the results expressed by descriptive statistics, presenting the average values. The Spearman Coefficient correlation test was performed in the statistical program Jamovi. Slides from the test group showed better static averages than those from the control group. Concluding that xylene can be reduced and excluded from the last staining step, maintaining structural quality of tissue and diagnosis, reducing operating costs and without harming the health of the worker.

Keywords: histological, techniques, xylene, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A histologia é um ramo da ciência que estuda a anatomia microscópica em sua composição celular e estrutural, as quais formam os tecidos constituindo a base para o entendimento da fisiologia e fisiopatologia do organismo dos seres vivos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; SAMUELSON, 2007). O termo surgiu pela primeira vez em 1819, num livro do anatomista e fisiologista Karl Mayer, baseado nos estudos microscópicos de estruturas biológicas descritas pelo médico italiano Marcello Malpighi no século XVII (CALADO, 2019).

Para confecção de uma lâmina histológica e posterior observação em microscopia óptica, o tecido passa por várias etapas de processamento histológico, que consiste em diversas fases distintas, como: coleta da amostra, identificação, fixação, desidratação, diafanização e inclusão em parafina, essas etapas possibilitam a realização de cortes pela microtomia em fatias finas que são colocados em lâminas de vidro e corados, dando suporte ao tecido, permitindo a diferenciação dos vários componentes celulares e teciduais de um órgão (ABREU *et al.*, 2022; GARTNER, 2007).

O xilol, também é denominado de xileno, dimetilbenzeno ou metil tolueno, é caracterizado com número de Registro no *Chemical Abstract Service* (nº CAS) 1330-20-7, com as características físico-químicas apresentadas na tabela 1 é um hidrocarboneto aromático derivado do petróleo que compõe o grupo BTEX (benzeno, tolueno, etil benzeno e xilenos) de Compostos Orgânicos Voláteis (COV) amplamente utilizado como solvente universal e agente desparafinizante em laboratórios de

anatomia histológica e histopatológica, é o produto químico mais perigoso utilizado (ABREU *et al.*, 2022; SRAVYA *et al.*, 2018; VISWASINI *et al.*, 2021).

O xilol tem sua importância na técnica histológica removendo o agente desidratante, o álcool, permitindo a impregnação do agente de incorporação, a parafina, e o inverso, remover o agente de impregnação permitindo a hidratação para coloração das células e tecidos. Esse produto é incolor, com odor adocicado, em estado líquido ou gasoso, insolúvel em água e inflamável (ABREU *et al.*, 2022; ALWAHAIBI *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2007; DO VALE, 2019; PREMA *et al.*, 2020).

Médicos patologistas, histopatologistas e técnicos laboratoriais estão em ininterrupto contato com esse produto químico que começou a ser utilizado na década de 1950 e desde a década de 1970 é considerado tóxico, causando prejuízos a saúde que podem ser leves ou até causar morte, dependendo do grau de exposição (ASHITHA, 2018). Pela alta volatilidade o xilol começa a evaporar a temperatura de 26°C, contaminando o ar e a inalação de vapores de xilol pode causar tontura, dor de cabeça, náuseas e vômitos, ficando armazenado no tecido adiposo e muscular. A exposição a longo prazo pode causar insônia, tremores, irritabilidade, concentração prejudicada e perda de memória de curto prazo, afetando o sistema nervoso central, incapacitando permanentemente muitos trabalhadores e em caso de derramamento no solo pode lixiviar e contaminar rios e lençóis freáticos (ALWAHAIBI *et al.*, 2018; BUESA e PESHKOV, 2009; COSTA *et al.*, 2007; PREMA *et al.*, 2020).

As hipóteses levantadas no estudo são de que a redução do uso de xilol na fase inicial da coloração histológica, hematoxilina e eosina (HE) e a exclusão na fase final em lâminas de tecido animal mantém a qualidade da amostra e diagnóstico, havendo diminuição com gastos operacionais.

Tabela 1. Características físico-químicas do xilol

Fórmula molecular	C ₈ H ₁₀
Designação IUPAC	Dimetilbenzeno
Peso molecular	106,16 g/mol
Ponto de fusão	-25°C, -48°C e 13°C (orto, meta e para, respectivamente)
Ponto de ebulição	144°C, 139°C e 138°C (orto, meta e para, respectivamente)
Temperatura de auto ignição	465,9°C
Pressão de vapor	1,33 kPa
Solubilidade	Hidrocarbonetos aromáticos, etanol e parafina

Fonte: DO VALE (2019).

PARTE EXPERIMENTAL

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras biológicas de animais necropsiados no Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava – PR. As amostras foram selecionadas de acordo com os tipos de tecidos básicos conforme os órgãos de cada aparelho e/ou sistema (tecido epitelial, tecido conjuntivo - tecido conjuntivo propriamente dito e tecidos conjuntivos especiais: adiposo, cartilaginoso, ósseo e sanguíneo - tecido muscular e tecido nervoso).

As coletas das amostras deram-se no período de janeiro a abril de 2022, sendo fragmentos de pele, glândula mamária, intestino, rim e cérebro, totalizando 5 amostras e compreendiam tecidos com alterações patológicas macroscópicas, provenientes de diferentes espécies de acordo com a rotina do laboratório, que foram selecionadas para diagnóstico pelo médico veterinário da instituição.

Depois do exame necroscópico as amostras foram fixadas em formalina a 10% por 24h para, em seguida, passarem pelo exame macroscópico e clivagem, para seleção da região a ser analisada em microscopia. A partir dessa seleção, as amostras foram colocadas em cassetes plásticos identificados com o número do exame e seguiram o protocolo padrão da técnica histológica descrita por Caputo *et al.* (2010).

Na etapa da microscopia, foram confeccionadas lâminas em duplicidade para cada amostra e divididas em dois grupos, o grupo controle (GC) e grupo teste (GT).

As lâminas do grupo controle foram coloridas em HE, conforme o protocolo padrão da coloração seguido por Caputo *et al.* (2010)

As lâminas do grupo teste foram coradas com base no protocolo de coloração histológica HE apresenado por Caputo *et al.* (2010), porém, com alterações nas quantidades de álcool e xilol utilizados, descritas na tabela 2.

Tabela 2. Protocolo coloração HE proposta, diminuindo tempo do xilol na fase inicial e exclusão na final

Reagente	Quantidade
Xilol aquecido	20 segundos
Xilol aquecido	20 segundos
Álcool absoluto (99,3%)	10 banhos
Álcool absoluto (99,3%)	10 banhos
Álcool 80%	10 banhos
Água	10 banhos
Hematoxilina de Harris	A partir de 1 minuto
Água corrente sem pressão	Até sair o excesso de corante
Água	5 minutos
Eosina amarela	A partir de 1 minuto
Água corrente sem pressão	Até sair o excesso de corante
Estufa até a lâmina secar	15 minutos
Colagem da lamínula	Bálsamo do Canadá

Fonte: CAPUTO *et al.* e colaboradores modificada (2022).

As lâminas do GC e GT, foram encaminhadas a vinte e cinco avaliadores, da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Guarapuava – PR, sem identificação quanto ao tipo de processo que cada uma passou. Os critérios de avaliação foram os mesmos usados por Ankle e Joshi (2009), Cazari *et al.* (2013), Falkeholm *et al.* (2001), Ganesan *et al.* (2016), Kunhua *et al.* (2011), Prema *et al.* (2020), Premalatha *et al.* (2013), Sithara *et al.* (2021), que avaliaram corte, colorações citoplasmática e nucleares, nitidez, clareza e uniformidade da coloração e morfologia celular levando em consideração a pontuação 1 (um) para adequada e 0 (zero) para inadequada, com pontuação menor que 2 (dois) a lâmina foi considerada inadequada para leitura e pontuação maior que 3 (três) classificada como adequada para leitura. Akpulu *et al.* (2021) pontuaram suas amostras com ruim 0 (zero), razoável 1 (um), bom 2 (dois), ótimo 3 (três) e excelente 4 (quatro) para leitura.

Para análise estatística, os dados das leituras foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel® e os resultados expressos por estatística descritiva, apresentando os valores em média. Foi realizado o teste de correlação de teste de Spearman. A análise estatística foi realizada utilizando o software Jamovi 2.3.21.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das amostras com a aplicação da técnica

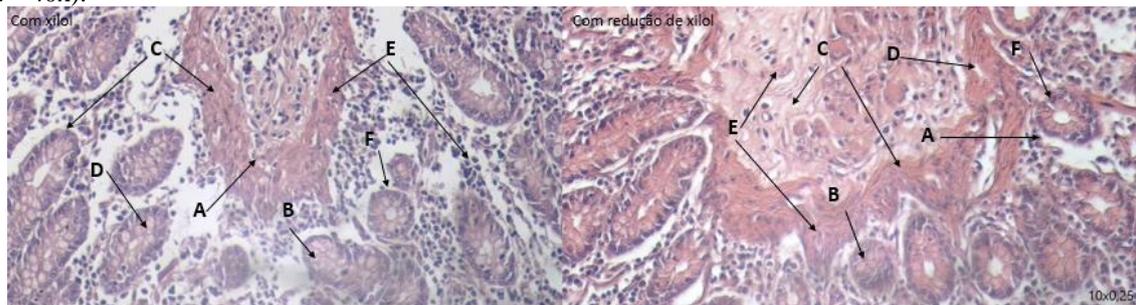
Para se chegar ao diagnóstico é necessário a identificação do órgão em relação a estrutura histológica e determinação das alterações nas reações celulares e teciduais, para isso é fundamental determinar o contorno citoplasmático para identificar a morfologia celular e estabelecer as alterações degenerativas e necróticas pela integridade da membrana celular e pela membrana nuclear classifica-se o processo em necrótico, inflamatório e neoplásico. As morfologias parenquimatosas relacionadas a forma dos tecidos, como presença de tecido conjuntivo e fibroblastos, são importantes para classificação do tempo da lesão, dessa forma, as características referentes a quantidade de células, tamanho, forma e coloração são importantes na classificação das lesões, além dos infiltrados que essas possam apresentar nos tecidos dos organismos (MAGALHÃES *et al.*, 2001; SANTOS 2016).

Foram avaliadas as 3 amostras provenientes de análise histopatológica, essas, continham todos os tecidos que representam os organismos em sua formação embriológica, epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso, e examinado os seguintes itens: coloração nuclear, coloração citoplasmática, nitidez de coloração, clareza de coloração e uniformidade de coloração e morfologia celular.

Amostra de intestino

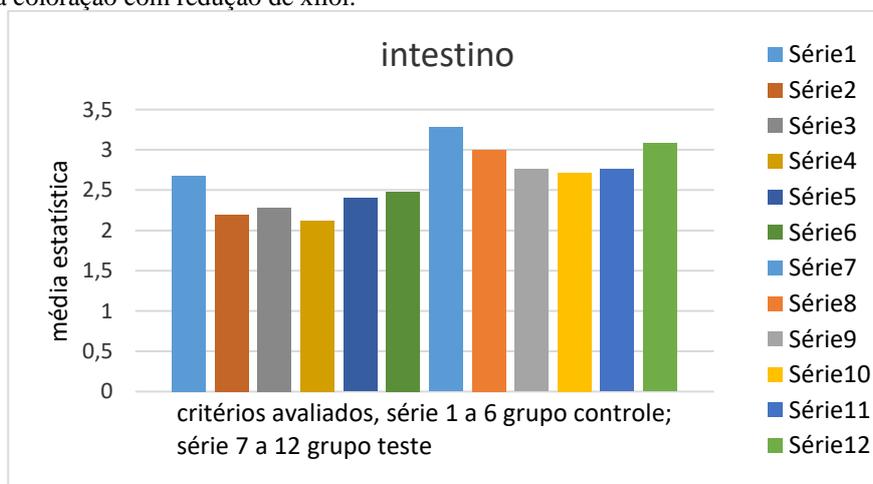
Na fotomicrografia do intestino (Figura 1) observa-se as colorações das lâminas com xilol (GC) e com redução de xilol (GT). Pode se notar que a coloração com redução de xilol evidencia o HE de melhor forma que a com xilol. Nota-se os núcleos mais evidenciados, o citoplasma definido favorecido pela nitidez, clareza e uniformidade da coloração, preservando a morfologia celular.

Figura 1. Fotomicrografia das lâminas com amostra de intestino dos GC e GT. A. Coloração nuclear. B. Coloração do citoplasma. C. Nitidez da coloração. D. Clareza da coloração. E. Uniformidade da coloração. F. Morfologia da coloração (H&E – 40x).



Na figura 2 estão demonstrados os valores para as avaliações correspondente a lâmina intestinal com xilol (GC) e com redução de xilol (GT). Nota-se que os valores médios para as avaliações dos aspectos de visualização das lâminas obtiveram valores maiores na lâmina corada com a redução de xilol.

Figura 2. Média dos valores para as avaliações das lâminas das amostras de intestino dos GC (série 1 a 6) e GT (série 7 a 12). 1. Coloração nuclear com xilol. 2. Coloração do citoplasma com xilol. 3. Nitidez da coloração com xilol. 4. Clareza da coloração com xilol. 5. Uniformidade da coloração com xilol. 6. Morfologia da coloração com xilol. 7. Coloração nuclear com redução de xilol. 8. Coloração do citoplasma com redução de xilol. 9. Nitidez da coloração com redução de xilol. 10. Clareza da coloração com redução de xilol. 11. Uniformidade da coloração com redução de xilol. 12. Morfologia da coloração com redução de xilol.



Na tabela 3 está a correlação do coeficiente de Spearman realizada entre as lâminas coradas com xilol e com redução de xilol, observa-se uma moderada positiva entre coloração nuclear com xilol e coloração nuclear coloração citoplasmática, clareza da coloração e morfologia da coloração com redução de xilol. A nitidez e uniformidade da coloração com xilol apresenta correlação moderada positiva com todos os itens contendo redução de xilol. A clareza da coloração com xilol apresenta correlação moderadamente positiva entre coloração do citoplasma, nitidez, clareza e uniformidade da coloração com redução do xilol. E a morfologia celular com xilol mostra correlação entre clareza da coloração e morfologia celular com redução de xilol.

Tabela 3. Correlação de Spearman das lâminas com amostra de intestino.

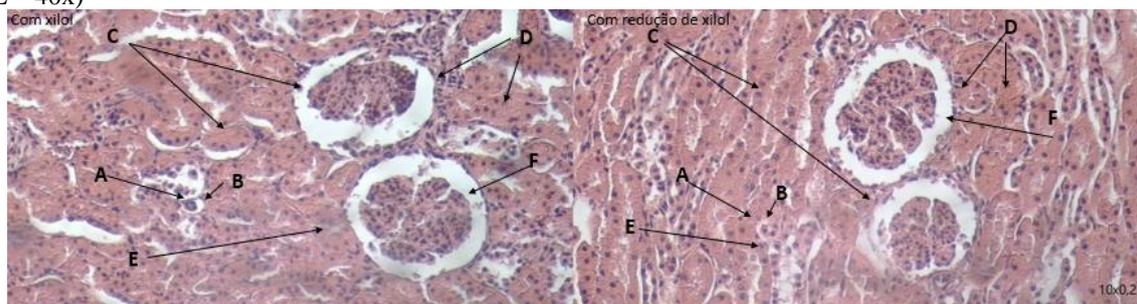
INTESTINO		Col. nucl. c/x	Col. citopl. c/x	Nitidez col. c/ x	Clareza col. c/x	Unifor. col. c/x	Morf. cel. c/x
Col. nucl. red./x	Rho de Spearman	0.523**	-0.028	0.457*	0.391	0.407*	0.389
	p-value	0.007	0.896	0.022	0.054	0.043	0.055
Col. citopl. red./x	Rho de Spearman	0.413*	0.238	0.463*	0.456*	0.491*	0.348
	p-value	0.040	0.252	0.020	0.022	0.013	0.088
Nitidez col. red./x	Rho de Spearman	0.382	0.315	0.502*	0.594**	0.443*	0.358
	p-value	0.059	0.125	0.011	0.002	0.026	0.079
Clareza col. red./x	Rho de Spearman	0.458*	0.248	0.459*	0.606**	0.412*	0.417*
	p-value	0.021	0.233	0.021	0.001	0.041	0.038
Unifor. col. red./x	Rho de Spearman	0.258	0.258	0.424*	0.513**	0.531**	0.326
	p-value	0.213	0.214	0.034	0.009	0.006	0.112
Morf. cel. red./x	Rho de Spearman	0.457*	0.010	0.475*	0.393	0.523**	0.474*
	p-value	0.022	0.964	0.016	0.052	0.007	0.017

Nota. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Amostra de rins

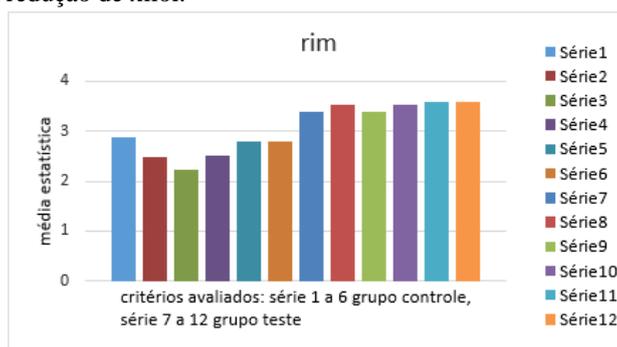
Na fotomicrografia dos rins (Figura 3) observa-se as colorações das lâminas do GC e GT. Pode se notar que a coloração do GT evidencia o HE de melhor forma que a do GC. Observam-se os núcleos mais evidentes devido a distribuição da coloração do citoplasma que apresenta nitidez e clareza, mantendo morfologia celular.

Figura 3. Fotomicrografia das lâminas com amostra de rins dos GC e GT. A. Coloração nuclear. B. Coloração do citoplasma. C. Nitidez da coloração. D. Clareza da coloração. E. Uniformidade da coloração. F. Morfologia da coloração (H&E – 40x)



No figura 4 estão demonstrados os valores para as avaliações correspondente a lâmina de tecido renal com xilol e com redução de xilol. Verifica-se que os valores médios para as avaliações dos aspectos de visualização das lâminas obtiveram valores maiores na lâmina corada com a redução presença de xilol.

Figura 4. Média dos valores para as avaliações das lâminas das amostras de rins dos GC (série 1 a 6) e GT (série 7 a 12). 1. Coloração nuclear com xilol. 2. Coloração do citoplasma com xilol. 3. Nitidez da coloração com xilol. 4. Clareza da coloração com xilol. 5. Uniformidade da coloração com xilol. 6. Morfologia da coloração com xilol. 7. Coloração nuclear com redução de xilol. 8. Coloração do citoplasma com redução de xilol. 9. Nitidez da coloração com redução de xilol. 10. Clareza da coloração com redução de xilol. 11. Uniformidade da coloração com redução de xilol. 12. Morfologia da coloração com redução de xilol.



Na tabela 4 está a correlação do coeficiente de Spearman realizada entre as lâminas coradas com xilol e com redução de xilol, observa-se uma moderada positiva entre coloração nuclear com xilol e coloração citoplasmática, nitidez da coloração e clareza da coloração com redução de xilol. A correlação entre coloração do citoplasma com xilol e nitidez da coloração com redução de xilol é moderadamente positiva. A correlação entre clareza da coloração com xilol é moderadamente positiva em relação a nitidez da coloração com redução de xilol. E a correlação entre as morfologias celulares com xilol e com redução de xilol é moderadamente positiva.

Tabela 4. Correlação de Spearman das lâminas com amostra de rins.

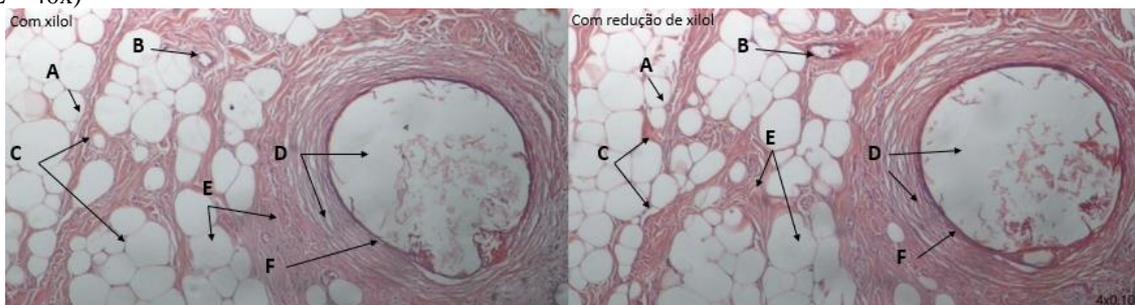
Rins		Col. nucl. c/x	Col. citopl. c/x	Nitidez col. c/ x	Clareza col. c/ x	Unifor. col. c/x	Morf. cel. c/ x
Col. nucl. red./x	Rho de Spearman	0.350	0.167	0.012	0.235	0.128	-0.026
	p-value	0.086	0.426	0.956	0.258	0.543	0.903
Col. citopl. red./x	Rho de Spearman	0.471 *	0.389	-0.034	0.352	0.184	0.159
	p-value	0.018	0.055	0.872	0.085	0.380	0.446
Nitidez col. red./x	Rho de Spearman	0.462 *	0.411 *	0.023	0.415 *	0.279	0.253
	p-value	0.020	0.041	0.914	0.039	0.178	0.222
Clareza col. red./x	Rho de Spearman	0.422 *	0.361	0.007	0.349	0.314	0.393
	p-value	0.036	0.077	0.975	0.087	0.126	0.052
Unifor. col. red./x	Rho de Spearman	0.303	0.283	0.048	0.368	0.334	0.246
	p-value	0.140	0.171	0.819	0.070	0.103	0.236
Morf. cel. red./x	Rho de Spearman	0.342	0.339	-0.036	0.246	0.265	0.423 *
	p-value	0.094	0.097	0.863	0.236	0.201	0.035

Nota. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

Amostra de pele

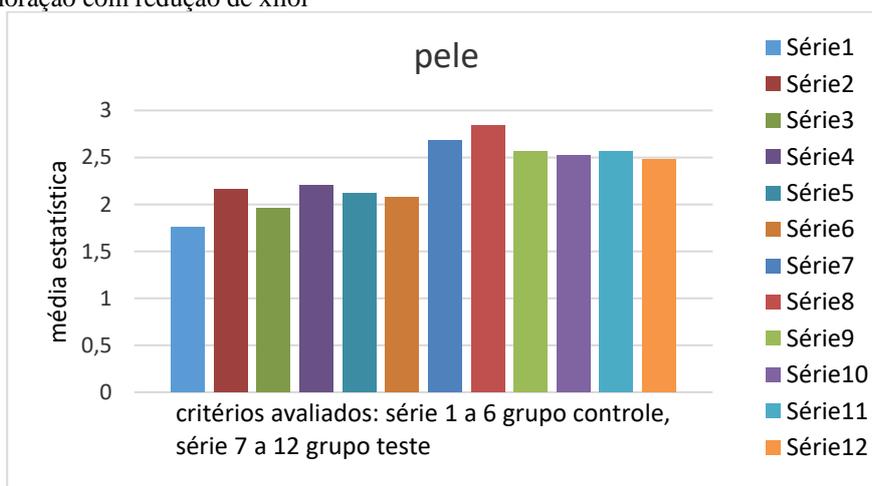
Na fotomicrografia da pele (Figura 5) observa-se as colorações das lâminas do GC e GT. Pode se notar que a coloração do GT evidencia o HE de melhor forma quando comparado ao GC. Nota-se contorno nuclear e citoplasmático mais nítidos devido clareza da coloração, além da morfologia celular conservada.

Figura 5. Fotomicrografia das lâminas com amostra de pele dos GC e GT. A. Coloração nuclear. B. Coloração do citoplasma. C. Nitidez da coloração. D. Clareza da coloração. E. Uniformidade da coloração. F. Morfologia da coloração (H&E – 40x)



Na figura 6 estão demonstrados os valores para as avaliações correspondente a lâmina de pele do GC e GT. Nota-se que os valores médios para as avaliações dos aspectos de visualização das lâminas obtiveram valores maiores na lâmina corada com a redução de xilol.

Figura 6. Média dos valores para as avaliações das lâminas das amostras de pele dos GC (série 1 a 6) e GT (série 7 a 12). 1. Coloração nuclear com xilol. 2. Coloração do citoplasma com xilol. 3. Nitidez da coloração com xilol. 4. Clareza da coloração com xilol. 5. Uniformidade da coloração com xilol. 6. Morfologia da coloração com xilol. 7. Coloração nuclear com redução de xilol. 8. Coloração do citoplasma com redução de xilol. 9. Nitidez da coloração com redução de xilol. 10. Clareza da coloração com redução de xilol. 11. Uniformidade da coloração com redução de xilol. 12. Morfologia da coloração com redução de xilol



Na tabela 5 está a correlação de Spearman realizada entre as lâminas do grupo controle e grupo teste, observa-se uma fraca positiva em relação a coloração nuclear com xilol com a coloração nuclear e citoplasmática, clareza, uniformidade e morfologia celular com redução de xilol. A

coloração citoplasmática com xilol também apresenta uma correlação fraca positiva com a coloração nuclear e citoplasmática, nitidez e clareza da coloração com redução de xilol. Uma correlação fraca positiva entre as nitidezes e as clarezas dos grupos controle e teste. A uniformidade da coloração com xilol está fracamente correlacionada com a coloração do citoplasma, clareza e uniformidade da coloração com redução de xilol. E a morfologia celular com xilol correlaciona-se fracamente com a nitidez e morfologia celular do grupo teste.

Tabela 5. Correlação de Spearman das lâminas com amostra de pele.

Pele		Col. nucl. c/x	Col. citopl. c/x	Nitidez col. c/x	Clareza col. c/x	Unifor. col. c/x	Morf. cel. c/x
Col. nucl. red./x	Rho de Spearman	0.499 *	0.403 *	0.061	0.059	0.346	0.179
	p-value	0.011	0.046	0.770	0.781	0.090	0.391
Col. citopl. red./x	Rho de Spearman	0.408 *	0.414 *	0.060	0.311	0.615 **	0.263
	p-value	0.043	0.039	0.777	0.130	0.001	0.205
Nitidez col. red./x	Rho de Spearman	0.303	0.587 **	0.439 *	0.214	0.325	0.592 **
	p-value	0.150	0.003	0.032	0.316	0.121	0.002
Clareza col. red./x	Rho de Spearman	0.440 *	0.631 ***	0.178	0.513 *	0.651 ***	0.144
	p-value	0.031	< .001	0.406	0.010	< .001	0.502
Unifor. col. red./x	Rho de Spearman	0.535 **	0.387	-0.115	0.180	0.529 **	0.063
	p-value	0.007	0.062	0.593	0.400	0.008	0.771
Morf. Cel. red./x	Rho de Spearman	0.418 *	0.194	0.068	0.136	0.355	0.596 **
	p-value	0.042	0.364	0.752	0.525	0.089	0.002

Nota. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

4 DISCUSSÃO

A busca por substitutos do xilol começou em 1992 com Rasmussen *et al.*, que utilizaram óleo de oliva e óleo de coco na etapa de diafanização, porém, para os experimentos de Ankle e Joshi (2009), Buesa e Peshkov (2009), Premalatha *et al.* (2013), Sermadi *et al.* (2014), Udonkang *et al.* (2014), Indu *et al.* (2014), Ganesan *et al.* (2016), Prema *et al.* (2020), Sithara *et al.* (2021), Akpulu *et al.* (2021), utilizaram na diafanização e coloração dos tecidos, água aquecida com sabão líquido, água com limão e óleo de coco, palma, mineral refinado, cedro e eucalipto. concluindo que todos podem ser usados como substitutos ao xilol. Já Cazari *et al.* (2013) e Mikowski *et al.* (2021), eliminaram o xilol da última etapa da coloração antes da montagem das lâminas nos seus experimentos, não observado comprometimento quanto a qualidade técnica para sua exclusão.

Segundo Falkeholm *et al.* (2001), a confecção de blocos em parafinas sem utilizar xilol é rotina diária no Hospital Vrinnevi, Suécia, desde 1995. O método elimina o xilol na etapa da diafanização, na desparafinização das amostras e acaba com a necessidade de reidratação e desidratação para as etapas de coloração e montagem das lâminas, visando diminuir custos e agilizar o trabalho sem perder a qualidade das amostras.

Ainda conforme dados de Falkeholm *et al.* (2001), as amostras que eliminaram o xilol das etapas de processamento e coradas em HE sem xilol foram consideradas tão boas ou melhores que as convencionais em 74% das comparações. No estudo em questão 75% das amostras confeccionadas com redução de xilol foram consideradas melhores que as convencionais, isso também pode ser observado nos gráficos anteriores que mostram uma média mais elevada em todos os itens observados.

Para Cazari *et al.* (2013), que utilizaram amostras de blocos de parafina com objetivo de avaliar qualidade estrutural de diferentes tecidos humanos não evidenciaram diferenças na qualidade de visualização microscópica, já no presente estudo foi observado melhor coloração tecidual e celular mantendo padrão morfológico e distribuição do corante, como observado nas correlações das tabelas 7, 8, 9, 10 e 11.

Ganesan *et al.* (2016) em seu trabalho usaram uma solução de água aquecida com detergente de louça para desparafinar as amostras indo direto para coloração e secagem das lâminas em estufa sem passar pela sequência de álcool e xilol. Para avaliação das lâminas usaram o mesmo sistema de pontuação utilizado por Ankle e Joshi (2011), Falkeholm *et al.* (2001) e do presente trabalho, obtendo resultado similar aos nosso e de Falkeholm *et al.* (2001), conforme o teste, os cortes sem xilol foram considerados tão bons ou melhores que os cortes convencionais correspondentes em 76% das comparações.

No estudo de Ankle e Joshi (2011) que utilizaram detergente de louças em comparação ao xilol, excluindo-o da última etapa da coloração, os itens coloração nuclear, clareza e nitidez da coloração e adequabilidade de diagnóstico foram maiores quando comparadas ao protocolo padrão, coloração citoplasmática e uniformidade obtiveram pontuação maior no protocolo padrão, nos nossos resultados a distribuição do corante foi melhor do que o padrão sendo similar em todas as estruturas que compõem os tecidos estudados, ficando mais destacado as alterações nucleares e citoplasmáticas, bem como, a distribuição de reações inflamatórias auxiliando assim no diagnóstico.

Todos os itens analisados apresentam média estática mais alta nas lâminas do grupo teste em comparação à técnica padrão de coloração, pois a forma e distribuição dos componentes celulares, morfologia celular e tecidual permitiram a visualização com mais nitidez, clareza e uniformidade das amostras na distribuição das camadas dos tecidos e alterações celulares relacionadas ao citoplasma, núcleo e componentes intracitoplasmáticos.

Confirmando as análises de Ankle e Joshi (2011), Cazari *et al.* (2013), Ganesan *et al.* (2016), Indu *et al.* (2014), Prema *et al.* (2020), Sithara *et al.* (2021), Sravya *et al.* (2018), as amostras do grupo teste assim como as do grupo controle foram consideradas satisfatórias para leitura e diagnóstico, porém cabe ressaltar que a não utilização do xilol é benéfica considerando a exposição

ocupacional, impacto ambiental e custo.

5 CONCLUSÕES

As lâminas do grupo teste foram consideradas satisfatórias para leitura e diagnóstico, mantendo distribuição de coloração, morfologia celular e tecidual, comprovando que o uso do xilol pode ser reduzido na técnica de coloração HE e diminuir os custos relacionados a compra e descarte do xilol. Além disso, é válido destacar que com a redução do xilol na etapa da coloração o contato da equipe técnica do laboratório com o produto é reduzido, melhorando a saúde ocupacional.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. O. DE; MESSIAS, I. M. DE O.; ARAÚJO, R. J. DE O.; FLORÊNCIO, M. S.; SILVA FILHO, J. F. DA; MESSIAS, J. B. *Research, Society and Development*. **2022**. 11, 1, e5911124609 [http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24609].
- AKPULU, S. P.; HAMMAN, S. O.; OLADELE, S. B. & AHMED, S. A. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, **2021**, 8, 4, 122-130. [http://dx.doi.org/10.17148/IARJSET.2021.8423]
- ALWAHAIBI, N.; ALJARADI, S.; ALAZRI, H. *Journal of Laboratory Physicians*, **2018** 10, 2, 189-193. [http://dx.doi.org/10.4103/JLP.JLP_111_17]
- ANKLE, M. R.; JOSHI, P. S. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, **2011**, 15, 2, 161-167. [http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.84482]
- ASHITHA, A. S; Tese de mestrado , Medical University of Tamil Nadu Dr. M.G.R. Medical University – Índia, 2018.
- BUESA, R. J.; PESHKOV, M. V. *Ann Diagnostic Pathol*, **2009**, 13, 4, 246-256, [http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005]
- CALADO, A. M. *História da Ciência e Ensino: construindo interfaces*, **2019**, 20, 455-466., [http://dx.doi.org/10.23925/2178-2911.2019v20espp455-466]
- CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. *Técnicas histológicas*. 1th ed; Rio de Janeiro: EPSJV, p. 2010.
- CAZARI, V. R. DA R.; PEREIRA, T. R.; ROMERA, A. M.; BRANDÃO, M. DA C.; ZELANDI FILHO, C.; FAVARETO, A. P. A. *Colloquium Vitae*, **2014**, 5, 2, 135–148 [http://dx.doi.org/10.5747]
- COSTA, K. N. S.; PINHEIRO, I. O.; CALAZANS G. T.; NASCIMENTO, M. S. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. **2007**, 32, 116, 50-56. [http://dx.doi.org/10.1590/S0303-76572007000200007]
- DO VALE, J. M. B. Tese de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Porto – Portugal, 2019.
- FALKEHOLM, L.; GRANT, C.; MAGNUSSON, A. *et al. Lab Invest*, **2001**, 81, 9, 1213–1221. [http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3780335]
- GANESAN, G.; ANANTH, S.; BOOPATHY, T. *Tropical Journal of Pathology and Microbiology*, **2016**, 2, 2, 55-63. [http://dx.doi.org/10.17511/jopm.2016.i02.04]
- GARTNER, L. P. *Tratado de Histologia em Cores*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1-10, 2007.
- INDU, S., RAMESH, V., INDU, P. C., PRASHAD, K. V., PREMALATHA, B. & RAMADOSS, K. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, **2014**, 5, 2, 284-287. [http://dx.doi.org/10.4103/0976-9668.136167]

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUNHUA, W.; CHUMING, F.; TAO, L.; YANMEI, Y.; XIN, Y.; XIAOMING, Z.; XUEZHONG, G.; XUN, L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **2011**, 9, 1, 43–49. [<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v9i1.6>]

MAGALHAES, A. M.; Ramadinha, R. R.; Barros, C. S. L.; Peixoto, P. V. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. **2001**, 21, 1 2001. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000100006>]

MIKOWSKI, A.; MIKOWSKI, G.; GRASSI, H.A.; PERES, J.A.; KERPPERS, I.I. *CISP VET – Congressos Iberoamericano de saúde pública veterinária*. ISBN N: 978-65-89908-81-4.

PREMA, V.; PRASAD, H.; SRICHINTHU, K. K.; KUMAR, S. S.; RAJKUMAR, K.; MARUDHAMANI, C. *J Pharm Bioall Sci*, **2020**, 12, 623-630. [http://dx.doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_164_20]

PREMALATHA B. R.; PATIL S.; RAO R. S.; INDU M. *J Contemp Dent Pract*, **2013**, 14, 2, 281-286. [<http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1314>]

RASMUSSEN B. B., HJORT K. N., MELLERUP I, SETHER G, CHRISTENSEN N. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*. **1992**, 100, 9. 827-31. [<http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1992.tb04006.x>].

SANTOS, R. L. *Revista CFMV*. **2016**, 69, 33-35.

SAMUELSON, D. A. *Tratado de Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: ELSEVIER. 2007.

SRAVYA, T.; RAO, G. V.; KUMARI, M. G.; SAGAR, Y. V.; SIVARANJANI, Y.; SUDHEERKANTH, K. *Journal Oral Maxillofacial Pathology*, 2018, 22, 1, 148. [http://dx.doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_172_16]

SERMADI, W.; PRABHU, S.; ACHARYA, S. & JAVALI, S.B. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, **2014**, 18, 1, 49-53. [<http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.141348>]

SITHARA, K.; GANESH, P. B.; DINKAR, D. *Paripex Indian Journal of Research*, **2021**, 10, 2, 33-35. [<http://dx.doi.org/10.36106/paripex>]

https://www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol8/JPCS_8_02.pdf , acessada em fevereiro de 2023

VISWASINI, R. D.; RAMANI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. *Journal of Pharmaceutical Research International*, **2021**, v. 33, n. 46A, p. 519-525. [<http://dx.doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i46A32895>]