

O USO DO ÓLEO DE COCO COMO ALTERNATIVA AO XILOL NO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE TECIDOS DE AVES

Carvalho, Tatiana Nunes ¹

Oliveira, Juliano Karvat ²

RESUMO

Os técnicos de anatomia patológica têm demonstrado função pulmonar diminuída e dispneia, devido ao fato de estarem sendo expostos de forma crônica ao xilol, mas não só a parte pulmonar que é afetada existe outros efeitos que também foram citados como: palpitações, dores no peito, náuseas e vômitos. Esta pesquisa teve como objetivo investigar a possível substituição do xilol por óleo de coco na etapa de diafanização durante a rotina histológica em tecidos de aves. Os materiais escolhidos foram previamente fixados em formol 10%. Os órgãos clivados para o processo foram: intestino, rim, traqueia e coração. Foram separados em dois grupos: tratamento I: álcool 70%, álcool 96% e três álcoois 100%, dois banhos de xilol e dois banhos de parafina histológica. Tratamento II: álcool 70%, álcool 96% e três álcoois 100%, dois banhos de óleo de coco e dois banhos de parafina histológica. Entre os dois tratamentos (I e II), houve uma pequena diferença de rigidez na etapa de diafanização, que foi notada no momento da inclusão dos materiais, nas etapas de impregnação e emblocagem não houveram diferenças. Pode-se concluir que o óleo de coco pode ser utilizado na etapa de diafanização por não danificar a estrutura celular dos tecidos e ser uma solução não tóxica para a saúde e ao meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: histologia, xilol, clarificação, diafanização, histotécnico.

INTRODUÇÃO

Segundo Caputo et al (2010) a técnica histológica foi defendida entre vários profissionais das ciências naturais, como os botânicos e zoologistas, sendo usadas também pelos anatomistas e histologistas da época. Por volta de 1828, Rudolph Virchow, médico alemão e antropologista, fez uso da análise histopatológica como ferramenta básica e primordial em laboratórios de histologia e/ou anatomia patológica para estabelecer as bases da patologia celular. De acordo com Zigoni e colaboradores (2022) para que o estudo das células e tecidos possa ser realizado é preciso que se produza as lâminas histológicas, para que assim, com o auxílio de microscópio óptico seja possível a observação dos mesmos.

Para se confeccionar as lâminas histológicas Bacha e Bacha (2003) relatam que após a remoção o tecido deve ser inserido em uma substância fixadora (formoldeído ou solução de

1. Graduando de Ciências Biológicas, bacharelado do Centro Universitário FAG. tatiananunes003@gmail.com

2. Orientador. Mestre em Ciências Ambientais, UNIOESTE. Docente do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário FAG. julianokarvat@fag.edu.br

Bouin). Após a fixação, a amostra deve ser desidratada em álcool em graduações crescentes, até a concentração de 100%. Em seguida, os tecidos são diafanizados em xileno, substância miscível em álcool 100%, o qual é importante para a última etapa, em que ocorre a impregnação do tecido em parafina.

De acordo com CETESB (2016) os xilenos são substâncias encontradas em combustíveis fosseis e são utilizados em fragrância sintéticas, na fabricação de tintas, vernizes, borracha e também é utilizado como solvente e matéria prima para produção de ácido benzoico, anidrido ftálico e ácido tereftálico.

Vale (2019), diz que o xileno é extremamente absorvido por via respiratória, oral e com menor frequência pela via cutânea. Uma vez absorvido, o xileno entra rapidamente na circulação sanguínea e é distribuído para todo o organismo. Os estudos relatam que técnicos de anatomia patológica demonstraram função pulmonar diminuída e dispneia, devido ao fato de serem expostos de forma crônica ao xilol. Porém não só os pulmões são afetados, já que outros efeitos também foram citados como, palpitações, dores no peito, náuseas e vômitos. Além disso, o sistema nervoso também é comprometido, podendo ocasionar cefaleia, tonturas, ansiedade, dificuldade de concentração e esquecimentos que ocorrem devido a frequente exposição ao xilol.

Cazari e colaboradores (2013) relatam que além de ser prejudicial à saúde, se o descarte do xilol não for realizado de forma correta, ele pode causar danos as redes de esgoto e dissolver as estruturas de PVC, comprometendo não só os encanamentos da empresa responsável por seu uso, mas também de outros edifícios ao seu redor. Portanto, o descarte desse resíduo deve ser realizado por empresas especializadas.

Visto que o uso do xilol compromete a saúde dos trabalhadores e ao ambiente, autores discorrem sobre o uso de substâncias alternativas para a realização de técnicas histológicas. Nesse contexto a utilização do óleo de coco é uma alternativa segura, de baixo custo e com a capacidade de reduzir o uso do xilol na rotina histológica, porque não afeta a morfologia dos tecidos e nem o desenvolvimento das colorações, além de minimizar os riscos à saúde e ao meio ambiente (ABREU et al., 2022).

Uma rotina laboratorial livre de xilol, resultaria em múltiplos benefícios para todos os envolvidos, tanto às empresas, como aos técnicos de laboratório, porque além do óleo de coco não ser prejudicial à saúde, acarretaria em um gasto menor para empresa, visto que o valor do óleo de coco é inferior ao do xilol e ainda o seu descarte pode ser feito de uma maneira mais sustentável, como o reaproveitamento em receitas de sabão, sendo que antes do seu uso deve ser realizada uma filtragem para a retirada das impurezas oriundas da diafanização. Desta forma

esta pesquisa teve como objetivo investigar a possível substituição do xilol por óleo de coco na etapa de diafanização durante a rotina histológica em tecidos de aves.

ENCAMINHAMENTO METODOLÓGICO

O experimento foi realizado dentro do setor de histopatologia de um laboratório na cidade de Cascavel – PR, tendo como objetivo a substituição do xilol na etapa de diafanização de tecidos de origem animal para a preparação de lâminas histológicas.

Os órgãos utilizados no experimento são provenientes de frascos do arquivo de contraprovas do laboratório. Os materiais escolhidos são de aves, previamente fixados em formol 10%. Os órgãos clivados para o processo foram: intestino, rim, traqueia e coração, todos foram seccionados em fragmentos de até 5mm de espessura, acomodados em cassetes histológicos e colocados em um histotécnico, equipamento responsável por realizar de forma automatizada as etapas de desidratação, diafanização e impregnação em parafina histológica de acordo com os seguintes tratamentos (Quadro 1):

Quadro 1: Quadro referente aos tratamentos realizados em cada grupo de materiais utilizados na pesquisa.

PROTOCOLO I (Grupo controle)		PROTOCOLO 2 (Grupo tratado)	
Reagente	Tempo	Reagente	Tempo
Álcool 70%	1h	Álcool 70%	1h
Álcool 96%	1h	Álcool 96%	1h
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	1h
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	1h
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	1h
Xilol I	1h	Óleo de coco I (30°C)	1h
Xilol II	1h	Óleo de coco II (30°C)	1h
Parafina I (60°C a 70°C)	1h	Parafina I (60°C a 70°C)	1h
Parafina II (60°C a 70°C)	1h	Parafina II (60°C a 70°C)	1h

Fonte: próprio autor.

A partir desta etapa os tecidos de ambos os protocolos seguiram o mesmo processo. Os fragmentos foram incluídos em parafina histológica com o auxílio de pinças e formas plásticas, e armazenados em geladeira até a parafina perder temperatura e adquirir consistência e dureza, na sequência, os blocos foram levados ao freezer para resfriamento onde permaneceram até o momento da microtomia.

A microtomia foi realizada em micrótomo Leica RM212RT, com regulagem para cortes de 1µm, com o auxílio de dois banhos maria um em temperatura ambiente e o outro entre

58 °C a 60 °C. Os cortes foram dispostos em e colocados em cesto de lâminas para posteriormente serem levadas a estufa por 1h a temperatura de 70 °C a 80 °C.

Na sequência, foi realizada a coloração das lâminas conforme demonstrado no quadro 2.

Quadro 2: Quadro referente ao processo de coloração comum aos dois tratamentos.

COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA - EOSINA		
Etapa	Reagente	Tempo
Desparafinização	Xilol I	10min
	Xilol II	10min
Reidratação	Álcool 100% I	1min
	Álcool 100% II	1min
	Álcool 100%	1min
	Álcool 96%	1min
	Álcool 80%	1min
	Álcool 70%	1min
	Água corrente	1min
Coloração	Hematoxilina	1min
	Água corrente	1min
	Eosina	2min
Desidratação	Álcool 70%	Passagem rápida ~30seg
	Álcool 80%	Passagem rápida ~30seg
	Álcool 96%	Passagem rápida ~30seg
	Álcool 100% I	Passagem rápida ~30seg
	Álcool 100% II	Passagem rápida ~30seg
Diafanização	Xilol I	Passagem rápida ~30seg
	Xilol II	Passagem rápida ~30seg
Montagem com laminula e Entenllan		

Fonte: próprio autor.

As fotos foram tiradas em câmera acoplada em microscópio, modelo Olympus®, por meio do aplicativo EPview™ versão V3.7.7_20230531.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estruturas de cada tecido são visíveis em ambos os protocolos. As figuras 1.1 e 1.2 apresentam cortes de rim de galinha corados em HE que apresentam coloração uniforme, com citoplasma corado em rosa e núcleos corados em roxo. Em ambas as fotos foram possíveis observar as estruturas renais, como os glomérulos (1) e túbulos renais (2).

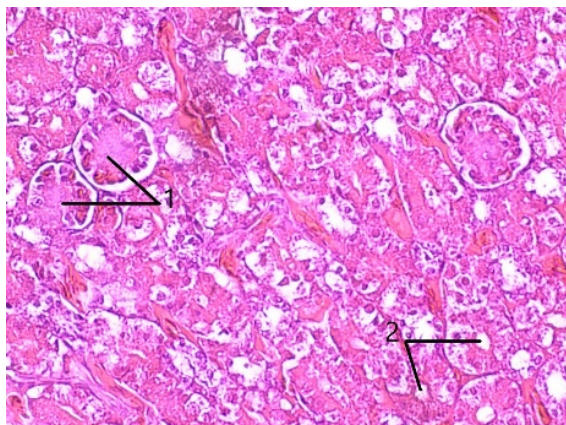


Figura 1.1: rim de galinha corado em HE, protocolo I. Aumento de 10x. 1- corpúsculo renal, 2-túbulos renais. Fonte: próprio autor.

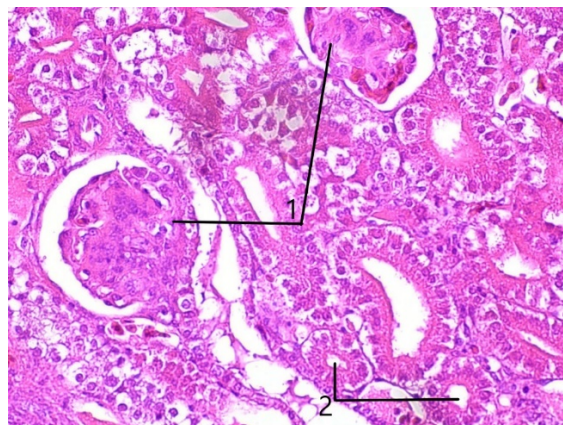


Figura 1.2: rim de galinha corado em HE, protocolo II. Aumento de 40x. 1- corpúsculo renal, 2- túbulos renais. Fonte: próprio autor.

As figuras 2.1 e 2.2 são de traqueia, coradas em HE, as estruturas puderam ser observadas sem diferença na intensidade da coloração entre os protocolos I e II. As células ciliadas (4) são observadas facilmente o que é importante para o diagnóstico de doenças do trato respiratório de aves.

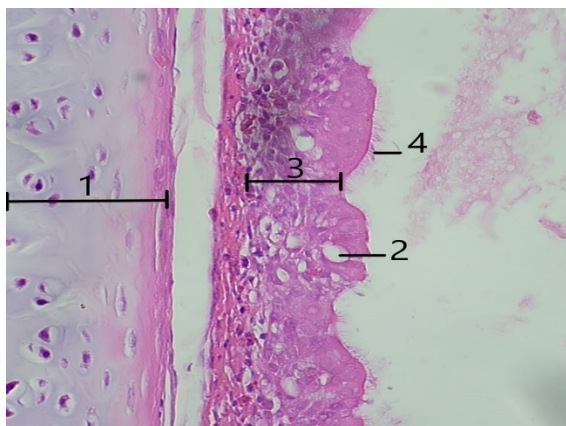


Figura 2.1: traqueia de galinha corado em HE, protocolo I. Aumento de 40x. 1- Anel traqueal cartilaginoso, 2- célula caliciforme, 3- epitélio pseudo-estratificado, 4- células ciliadas. Fonte: próprio autor.

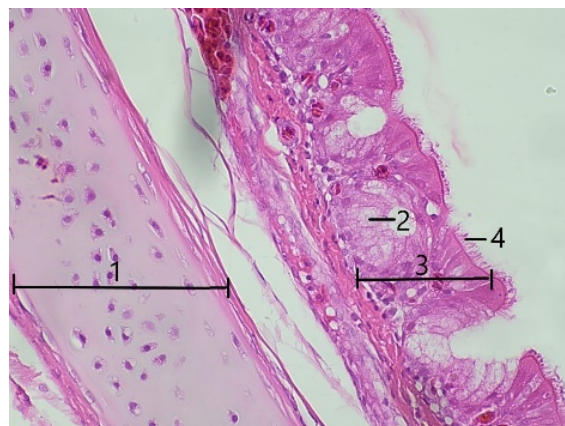


Figura 2.2: traqueia de galinha corado em HE, protocolo II. Aumento de 40x. 1- Anel traqueal cartilaginoso, 2- célula caliciforme, 3- epitélio pseudo-estratificado, 4- células ciliadas. Fonte: próprio autor.

As figuras 3.1 e 3.2 são lâminas de coração de galinha também coradas em HE, a fibra muscular (1) pode ser visualizada nitidamente.

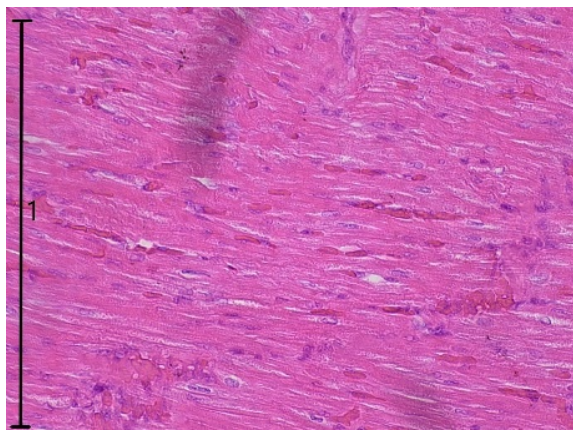


Figura 3.1: coração de galinha corado em HE, protocolo I. Aumento de 40x. 1- fibra muscular. Fonte: próprio autor.

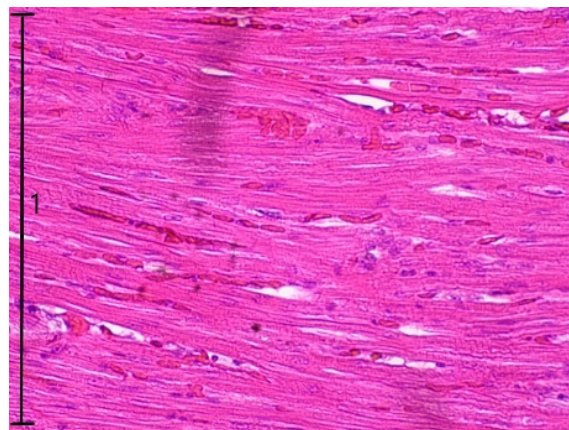


Figura 3.2: coração de galinha corado em HE, protocolo II. Aumento de 40x. 1- fibra muscular. Fonte: próprio autor.

As figuras 4.1 e 4.2, são de intestino de galinha, coradas em HE. É possível observar de forma nítida as vilosidades (1) e as criptas (2) estruturas que são de extrema importância para a análise de mensuração intestinal.

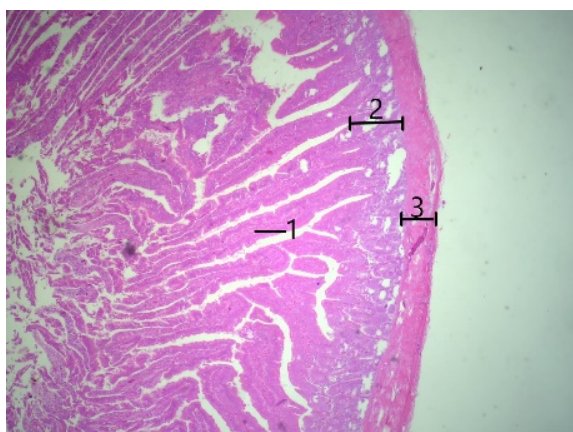


Figura 4.1: intestino de galinha corado em HE, protocolo I. Aumento de 4x. 1- vilosidade, 2- cripta, 3- músculo liso. Fonte: próprio autor.

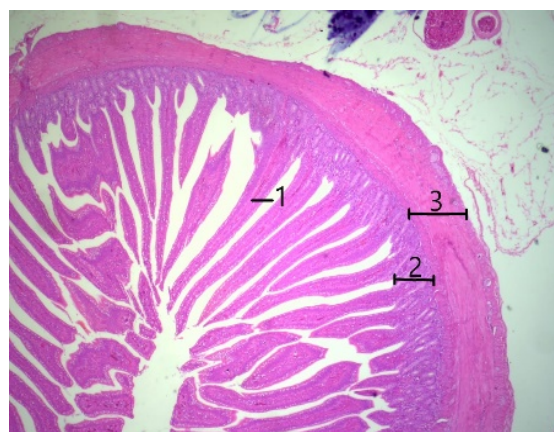


Figura 4.2: intestino de galinha corado em HE, protocolo II. Aumento de 4x. 1- vilosidade, 2- cripta, 3- músculo liso. Fonte: próprio autor.

Chandraker e colaboradores (2019) e Tanwar et al (2022) utilizaram tecidos de partes moles em suas pesquisas e abordaram o uso do óleo de coco como agente clarificador na etapa de diafanização. Os estudos demonstraram que entre o xilol e o óleo de coco houve uma diferença mínima entre a rigidez e o tamanho da amostra ao fim do processamento. Contudo, quanto a translucidez, não houve diferenciação entre os dois protocolos. Sermadi e colaboradores (2014), conduziram um estudo em que os materiais que foram submetidos ao xilol tiveram maior redução de tamanho quando comparados as amostras que foram feitas com o óleo de coco.

Os mesmos achados também puderam ser observados nesta pesquisa, porque entre os dois protocolos (I e II) houve uma pequena diferença de rigidez na etapa de diafanização e foi

notada no momento da inclusão dos materiais. Já durante as etapas de impregnação e emblocamento não houveram diferenças.

Chandraker e colaboradores (2019) citaram que houve dificuldade para realizar os cortes no processo realizado com o óleo de coco, o que também foi constatado no presente estudo na etapa de microtomia pois os blocos que foram gerados a partir do tratamento II (óleo de coco) se apresentaram mais macios. Entretanto, quando as fitas foram colocadas em banho-maria, as estruturas de traqueias se repeliam, se separando da parafina com maior frequência. Porém mesmo com essa dificuldade, os cortes puderam ser realizados com sucesso. Os outros tecidos testados (intestino, rim e coração) não apresentaram essa variação.

Em algumas estações do ano devido as baixas temperaturas ambientais na região do estudo, o óleo de coco se solidificou o que poderia ser um empecilho para seu uso. No entanto com o auxílio de canecas de inclusão pode-se manter temperatura controlada 30 °C para liquefazer o óleo, possibilitando o seu uso. Sermadi et al (2014) também relataram a mesma dificuldade para a liquefação do óleo de coco em baixas temperaturas, porém foi facilmente resolvido com o uso da estufa.

Segundo Cazari et al (2013) os funcionários de laboratórios de anatomia patológica estão expostos a toxicidade do xilol, correspondendo a cerca de 75% dos casos de doenças ocupacionais. A principal forma de exposição relatada é a inalação, que afeta principalmente o sistema nervoso central causando fortes dores de cabeça, tontura e vômitos. Além disso contato direto com o xilol pode causar dermatites, ressecamento, descamação e rachaduras de pele.

Segundo Abreu e colaboradores (2022) por ser um produto de origem vegetal, o Brasil possui grande produção do óleo de coco, o que facilita a sua compra e reduz o seu custo. Além disso não é relatado histórico de toxicidade para a população. Portanto o óleo de coco se torna uma ótima escolha para a utilização na praticas histológica, reduzindo os custos laboratoriais, pois o valor do óleo de coco é em média 50% menor que o xilol. Dessa forma, a técnica se torna mais barata e segura para os técnicos que estão expostos aos vapores exalados no ambiente.

CONCLUSÃO

A partir da presente pesquisa pode-se concluir que o óleo de coco é um substituto adequado ao uso do xilol no processamento histológico de tecidos, já que não houve qualquer dano as estruturas morfológicas e nem perda da qualidade da coloração dos tecidos analisados.

Ainda, o óleo de coco não alterou o tempo de desenvolvimento da preparação da lâmina histológica, sendo uma alternativa barata, saudável e sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, B. O.; MESSIAS, I. M. O.; ARAÚJO, R. J. O.; FLORÊNCIO, M. S.; FILHO, J. F. S.; MESSIAS, J. B. Substituição do xilol por óleo de coco extravirgem na etapa de diafanização da rotina histológica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2022. Disponível em <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24609>. Acessado em 03 de setembro de 2023.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2ed. São Paulo: ROCA, 2003, 1 p.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. **CONCEITOS E MÉTODOS PARA A FORMAÇÃO DE PROFISSIONAIS EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE**. 89p., 2010. Acessado em 24 de setembro de 2023.

CAZARI, V. R. R.; PEREIRA, T. R.; ROMERA, A. M.; BRNADÃO, M. C.; FILHO, C. Z.; FAVARETO, A. P. A. Redução do uso do xilol na técnica de coloração hematoxilina e eosina. **Colloquium Vitae**, v. 5, n. 2, p. 135-148, 2013. Disponível em <https://revistas.unoeste.br/index.php/cv/article/view/892>. Acessado em 24 de setembro de 2023.

CETESB. **Avaliação de benzeno; tolueno; o-xileno; m, p-xileno e etilbenzeno na atmosfera da estação de monitoramento de pinheiros**, 2016. Disponível em <https://cetesb.sp.gov.br/ar/wp-content/uploads/sites/28/2013/12/Relatorio-BTEX.pdf>, acessado em 01 de outubro de 2023.

CHANDRAKER, R.; RATHOD, V. C.; CHANDRAKER, N. K.; PUNDIR, S.; DIXIT, S.; DESAI, V. Comparison between xylene and coconut oil in tissue processing. *Modern medical lab jornal*. v. 2, n. 1, p. 96-99, 2019. Disponível em: <http://modernmedlab.com/article-1-55-en.html> Acessado em 01 de novembro de 2023.

SERMADI, W.; PRABHU, S.; ACHARYA, S.; SB, J. Comparing the efficacy of coconut oil and xylene as a Clearing agente in the histopathology laboratory. **Journal of oral and maxillofacial pathology**. V. 18, p. S49-S53, 2014. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211238/>. Acessado em 01 de novembro de 2023.

TANWAR, M.; SHARMA, M.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, M.; TYAGI, V.; Usage of coconut oil as a biofriendly xylene substitute in tissue processing and stainig. **International jornal of health sciences**, v. S1, p. 660-675, 2022. Disponível em <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS1.4813>. Acessado em 01 de novembro de 2023.

VALE J. M. **Toxicidade da exposição profissional a formaldeído e a xilol nos laboratórios de anatomia patológica e patologia forense: utilização de reagentes alternativos**, 2019 Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/124108/2/366571.pdf>. Acessado em 08 de outubro de 2023.

ZINGONI, A. F.; XAVIER, A. C. V.; CUNHA, C. T.; SILVA, F. K.; BETITO, G. A. V.; PEREIRA, L. V. M.; GOMES, L. M. R.; RANGEL, T. F. B. **Projeto de histotécnicas**, 2022. Disponível em <http://ibict.unifeob.edu.br:8080/jspui/bitstream/prefix/5204/1/PROJETO%20DE%20HISTOT%C3%89CNICAS.pdf>, acessado em 01 de outubro de 2023.

