

LABORATÓRIO DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL EM TÉCNICAS
LABORATORIAS EM SAÚDE
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Flávia Costa Castro Cruz

REPENSANDO O USO DE ÁGUA NAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS
CONVENCIONAIS

Rio de Janeiro

2017

Flávia Costa Castro Cruz

REPENSANDO O USO DE ÁGUA NAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS
CONVENCIONAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como
requisito parcial para a aprovação no curso técnico de
nível médio em saúde com habilitação em análises
clínicas

Orientador: Leandro Medrado

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Cosmos por reger a minha vida e me pôr nesse caminho

A Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio por me dar a oportunidade de estar aqui

Ao meu orientador Leandro Medrado, pelo suporte, paciência e incentivo.

A minha família, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo revisar as técnicas histológicas (chamando atenção para fixação e coloração) com o intuito de propor soluções viáveis para otimizar o uso de água nas suas etapas convencionais, por conta de problemas ambientais relacionados à água, o que vem sendo um assunto muito discutido atualmente. Introduce a relevância da água em seu contexto biológico e sua composição química. Apresenta tipos de água reagente, a fim de especificar seus usos dentro do ambiente laboratorial e suas funções. Explicando as técnicas histológicas convencionais, foi dado enfoque aos procedimentos que mais utilizam água, exemplificando cada um. Propõe soluções possíveis e simples para minimizar ou aprimorar o uso da água em tais técnicas. Utiliza-se de referências bibliográficas em livros, sites de pesquisa e o segundo volume da série “conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde” disponibilizado pela Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Conclui enfatizando a importância de se economizar água em âmbito laboratorial e apresenta um leque de ideias para amenizar este problema.

Palavras Chave: água em laboratórios, racionalização do uso da água em laboratórios, técnicas histológicas, e uso da água em histotecnologia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 OBJETIVO GERAL	8
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
1.3 METODOLOGIA.....	8
2 ÁGUA: UM RECURSO ESSENCIAL.....	9
2.1 PROPRIEDADES DA ÁGUA E SUA CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM SEU GRAU DE PUREZA.....	9
3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E A UTILIZAÇÃO DA ÁGUA.....	18
3.1 USO DA ÁGUA NAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....	22
4 SOLUÇÕES PARA O USO DE ÁGUA NOS LABORATÓRIOS DE HISTOLOGIA.....	28
5 CONCLUSÕES	30
6 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A água é uma substância química formada por dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio. Sua fórmula molecular é H_2O . Ver gráfico 1.

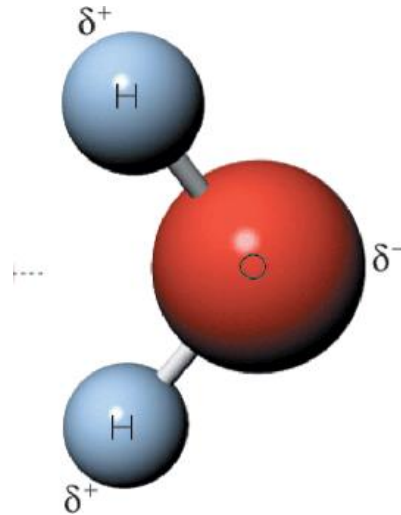


Gráfico 1: Molécula da água

Fonte: UFMG, 2011

A água pura não apresenta cheiro nem cor. Ela pode ser transformada em gelo (solidificação) numa temperatura a $0^{\circ}C$ e entra em ebulição quando atinge a temperatura de $100^{\circ}C$ (no nível do mar).

Quase toda a superfície do planeta Terra está coberta por água: água dos oceanos, água dos rios e lagos, arroios e sangas. Mas, na realidade nem tudo é azul (a cor que cobre a Terra, devido à água, quando é vista do espaço), porque toda a água do planeta é constituída basicamente de dois tipos: água salgada dos mares e água doce dos rios, lagos e subsolo. Mas o mais importante, a saber: a água salgada ocupa 97% do total, sobrando apenas 3% disponível para consumo (VICTORINO, 2007)

O corpo humano é quase todo formado por água (cerca de 70%), sendo um bem indispensável para a vida, não somente do ser humano, mas dos animais e plantas que habitam o planeta Terra, além de ser responsável pelas reações celulares, entre outros processos presentes nos organismos (LOPES *et al*, 2007).

Contudo este contexto biológico não será aprofundado na pesquisa, mas sim aspectos químicos e a utilização desse bem nos laboratórios de citologia e histologia clínica.

A poluição e má distribuição dos recursos hídricos no mundo estão associados a problemas culturais, sociais e de ambientais. Fatores como a cultura e educação são grandes vertentes em uma sociedade, tendo em vista que eles possibilitam o acesso à informação e conscientização. Quando existem muitos problemas sociais relacionados à poluição percebe-se que situações como: jogar um papel de bala no chão ou dejetos no rio se tornam recorrentes (VICTORINO, 2007).

O acesso a esse bem pode estar relacionado também à sua distribuição e à poluição. A comunidade é responsável pelos seus recursos naturais também, e seu uso inapropriado pode gerar algumas consequências. Dessa forma toda a sociedade e todos os seus setores devem colaborar para a preservação e bom uso dos seus recursos hídricos (VICTORINO, 2007).

O problema se agrava com a grande quantidade de água doce sendo utilizada, ao mesmo tempo, por todos os habitantes do planeta e muitas vezes de forma pouco sustentável. Só a agricultura consome 70% da água doce mundial. A irrigação sem tecnologia gera grandes desperdícios e, considerando-se a pecuária, os pastos e a água para os rebanhos, o consumo é ainda maior (RIDDER, 2006).

A escolha do tema está associada à importância do uso da água nos laboratórios de maneira geral e como esse uso pode ser aprimorado levando em conta a relevância do tema, tendo vista que foi um assunto muito discutido nos últimos anos (Leonardo Boff, Senado Federal, entre outras fontes e autores).

A água é de extrema importância para os laboratórios, principalmente laboratórios de técnicas histológicas, onde suas técnicas necessitam desse recurso em diversos momentos, como será observado nos capítulos seguintes.

Sendo um tema atual e muito discutido na sociedade contemporânea, o desperdício é um assunto que deve ser retomado sempre que possível independentemente do setor (agroindústrias, saúde, populacional, laboratorial, entre outros).

1.1 OBJETIVO GERAL

Repensar o uso da água nas técnicas histológicas convencionais e apresentar possíveis soluções para otimizá-lo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mostrar a importância da água nas técnicas histológicas convencionais, especificando os tipos de água usados no laboratório de histologia;
- Apontar suas características físicas e químicas e suas aplicações;
- Apresentar propostas para a redução do desperdício de água nas técnicas histológicas;

1.3. METODOLOGIA

O trabalho tem como método a revisão de literatura usando como base a busca das palavras-chave: água em laboratórios, racionalização do uso da água em laboratórios, técnicas histológicas, e uso da água em histotecnologia, em base de dados confiáveis, de reconhecido teor científico, como Lilacs, Scielo, PubMed, MedLine e BVS, por exemplo.

A análise dos dados obtidos na revisão de literatura foi realizada através de uma abordagem qualitativa, que permite correlacionar as informações de maneira crítica e integrada.

2 ÁGUA: UM RECURSO ESSENCIAL

Entende-se que a água deixou de ser um bem comum e passou a ser produto de alta demanda e pouca disponibilidade tendo em vista que sua poluição, seu uso em excesso e sua má distribuição são fatores que dificultam o acesso a esse bem (BARROS *et al*,2007).

Dessa forma é preciso valorizar a conscientização da população em relação à importância da água e criar (gradativamente) costumes que a preservem de forma a manter seu “status” de “abundância” (BARROS *et al*,2007).

2.1. PROPRIEDADES DA ÁGUA DE ACORDO COM SEU GRAU DE PUREZA

A água, em seu estado natural é um líquido transparente com uma densidade máxima de 1 g/cm^3 a 4°C e seu calor específico é de $1 \text{ cal/}^\circ\text{C}$. No estado sólido, sua densidade diminui até $0,92 \text{ g/cm}^3$. Suas temperaturas de fusão e ebulição à pressão de uma atmosfera são de 0 e 100°C , respectivamente (temperaturas bem superiores a outros compostos parecidos). Ela é uma substância composta que não se decompõe em seus elementos até 1.300°C . Reage com os metais alcalinos formando uma base e despreendendo hidrogênio: $\text{Na} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaOH} + \text{H}_2$. Reage com alguns óxidos metálicos para formar hidróxidos, como por exemplo: $\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2$, e com os não-metálicos para formar ácidos, $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_3$ (CLAVICO *et al*, 2005).

A água possui uma estrutura molecular simples, composta por uma molécula de oxigênio e duas de hidrogênio. Os átomos de hidrogênio compartilham um par de elétrons e se ligam de forma covalente ao átomo de oxigênio. O oxigênio apresenta um par de elétrons não compartilhados, assim ele possui quatro elétrons em torno de si, dois não compartilhados e dois formando ligações covalentes (CLAVICO *et al*, 2005).

A água é polar, ou seja, sua distribuição da densidade de elétrons é desigual, possuindo cargas parciais positivas (dos átomos de hidrogênio) e negativas (dos átomos de oxigênio). Isso gera uma atração eletrostática entre as cargas formando uma interação intermolecular chamada “ponte de hidrogênio”; As pontes de hidrogênio permitem que as moléculas da água permaneçam unidas, sendo quebradas em altas temperaturas (100°C , sua temperatura de ebulição) (CLAVICO *et al*, 2005).

As pontes de hidrogênio afetam propriedades peculiares a água, como por exemplo, a alta temperatura de ebulição, tensão superficial e suas propriedades solventes universais (CLAVICO *et al*, 2005). Ver gráfico 2.

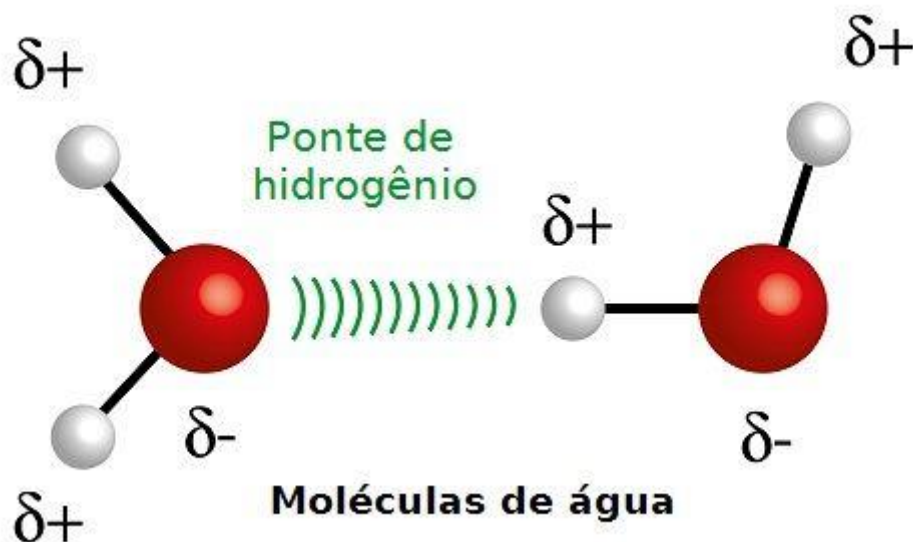


Gráfico 2: representação das pontes de hidrogênio

Fonte: Toda matéria: conteúdos escolares, 2011- 2017.

Se tratando ainda das propriedades mais importantes da água é imprescindível mencionar a dissolução, a tensão superficial, a densidade, a viscosidade, a salinidade e a capilaridade (MORETTI *et al*, 2007).

Dissolução.

Uma propriedade muito importante que a qualifica como “solvente universal”, que é a “capacidade de dissolver substâncias polares ou iônicas transformando-as em soluções aquosas”. Gerando grande estabilidade às soluções, os íons negativos e positivos são atraídos pelas suas extremidades, nas moléculas de água ali presentes, formando um acúmulo dessas moléculas fortemente ligadas a eles. Também chamada de “hidratação dos íons”, a dissolução nada mais é que a solvatação de cátions e ânions pelas moléculas da água (CLAVICO *et al*, 2005).

Tensão superficial

Uma propriedade baseada nas forças de atração das moléculas da água. A força de atração das moléculas no seu interior vem de todas as direções, fazendo com que seu

módulo seja nulo, porém, na superfície da água as forças são laterais e interiores, ou seja, essa força vinda dos lados e de baixo cria uma tensão na superfície a deixando com aspecto de “película de plástico” (CLAVICO *et al*, 2005). Ver gráfico 3.



Gráfico 3: Tensão superficial da água

Fonte: Considere a possibilidade, 2012

Densidade

A densidade é que a razão entre a “massa da substância e seu volume” ($d= m/v$), e tem como objetivo medir a consistência da substância. Em geral, os sólidos são mais resistentes que os líquidos e os gases, e quando há o aumento da temperatura sua densidade diminui. A água possui a peculiaridade de ser a única substância que possui maior densidade em seu estado líquido (especificamente a 4°C), sendo que o gelo mesmo em estado sólido possui densidade menor e por isso flutua sobre a água (CLAVICO *et al*, 2005). Ver gráfico 4.



Gráfico 4: Densidade da água

Fonte: plato.if.usp, 2006

Calor Específico

Mede a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de um grama de uma determinada substância (sendo que a unidade de medida é a caloria). Outra característica singular da água é o fato de ganhar e perder mais calor quando comparada a outras matérias submetidas à mesma temperatura. Isso ocorre devido as pontes de hidrogênio que proporcionam maior estabilidade à substância (CLAVICO *et al*, 2005).

Viscosidade

É uma forma de medir o atrito interno ou a resistência do fluxo entre as moléculas. Nos líquidos as moléculas estão muito próximas umas das outras e a força de atração é efetiva, assim a viscosidade vem do atrito entre as camadas que se dividem ao escoar (CLAVICO *et al*, 2005).

A água apresenta viscosidade relativamente baixa, dessa forma suas moléculas deslizam facilmente entre as outras. Tendo como característica a capacidade de passar por finos capilares principalmente a altas temperaturas (CLAVICO *et al*, 2005).

Nos gases a situação é diferente porque as moléculas estão mais distantes, assim a viscosidade não vem de seu atrito, mas sim da quantidade de movimento entre as suas camadas (CLAVICO *et al*, 2005).

Salinidade

É medida pela quantidade de sais dissolvidos na água por meio da condutividade elétrica (definida pelo peso de sais inorgânicos em 1 Kg de água), sendo que quanto maior os níveis de sais na água, mais facilmente ela conduz a eletricidade (CLAVICO *et al*, 2005).

Seus componentes principais são os íons de Na^+ e Cl^- que compõem mais de 85% das substâncias encontradas na água do mar (CLAVICO *et al*, 2005).

Em média a água do mar possui uma salinidade de 35, ou seja, cada litro de água do mar possui 35 gramas de sais, em sua maioria cloreto de sódio (NaCl) (CLAVICO *et al*, 2005).

Capilaridade

É a propriedade que define a interação das moléculas entre si e entre substâncias diferentes e mede o fluxo de determinado líquido dentro de pequenos tubos chamados de capilares, isso se deve pelos fenômenos de adesão e coesão (MORETTI *et al*, 2007).

Aferir essa característica a um líquido depende de alguns parâmetros como o diâmetro do tubo, o tipo de líquido, viscosidade e a temperatura (tendo em vista que quanto mais quente, menos viscoso é) (MORETTI *et al*, 2007).

A água possui elevado grau de adesão e coesão, pois por conta das pontes de hidrogênio a afinidade entre as moléculas é alta, sendo a água uma substância polar isso gera interações eletrostáticas com outras moléculas polares, o que ocorre nas plantas por exemplo (MORETTI *et al*, 2007).

Apesar de ser o suprimento mais importante do laboratório de análises clínicas a água de abastecimento têm sido muito mal utilizada e seu uso negligenciado. (BASQUES, 2010).

Classificá-la como “PURA” é relativo, pois depende da situação em que ela vai ser utilizada (BASQUES, 2010).

A água “PURA” para uso doméstico é livre de patógenos e toxinas; Para uso farmacêutico é livre de pirogênios (substâncias liberadas por bactérias, vírus e fungos que causam febre) e micro-organismos; Para utilizar em laboratório de análises clínicas ela

deve ter uma quantidade mínima de contaminante (íons, matéria orgânica e micro-organismos), isso se dá por que a água é considerada reagente químico no laboratório e essas substâncias podem alterar reações e resultados (BASQUES, 2010).

Dessa forma, a água deve ser purificada o máximo possível, e para isso existem vários procedimentos que possibilitam essa limpeza: (BASQUES, 2010).

Destilação

É um processo que utiliza a vaporização e a condensação de um líquido para se obter uma concentração de determinada substância ou separar uma substância volátil de outras menos voláteis. Essa técnica é a mais antiga de purificação da água (BASQUES, 2010). Ver gráfico 5.

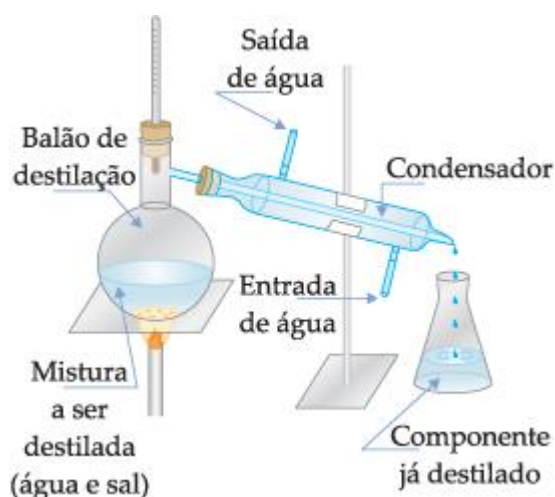


Gráfico 5: Destilação simples

Fonte: sobiologia.com, 2008- 2017.

Deionização

Basicamente é um processo de troca de íons presentes na água original por íons presentes nas resinas localizadas no deionizador (BASQUES, 2010).

Essas resinas podem ser catiônicas ou aniônicas, a primeira faz uma a troca de íons H^+ (hidrogênio) por contaminantes como cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês,

cobre, cromo, alumínio, níquel, entre outros. Já a segunda faz a troca de íons OH^- (hidroxila) por contaminantes como clorato, clorito, cloreto, sulfato, sulfito, sulfeto, nitrato, nitrito, fosfato, fluoreto, entre outros (BASQUES, 2010).

Osmose reversa

A Osmose Reversa é um processo de separação que usa pressão para forçar uma solução através de uma membrana que retém o soluto em um lado e permite que o solvente passe para o outro lado. Mais formalmente, é o processo de forçar a solução de uma região de alta concentração de soluto através de uma membrana para uma região de baixa concentração de soluto, através da aplicação de uma pressão externa que exceda a pressão osmótica (MAJOP, 2017). Ver gráfico 6.



Gráfico 6: filtro de osmose reversa

Fonte: MAJOP, 2017

Filtração através de carvão ativado

Normalmente usado antes da osmose reversa e deionização, esse procedimento se baseia na remoção do cloro por quimioabsorção adsorção (processo pelo qual átomos, moléculas ou íons são retidos na superfície de sólidos através de interações de natureza química ou física) (BASQUES, 2010). Ver gráfico 7.

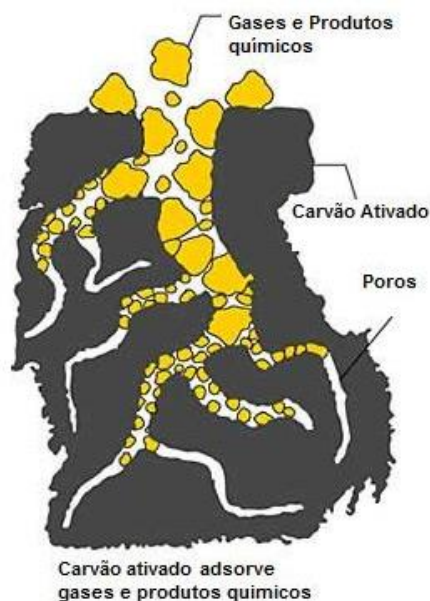


Gráfico 7: filtração por carvão ativado.

Fonte: NATURALTEC, 2017

Tabela de principais contaminante e eficiência da purificação:

	Sólidos Ionizados	Gases Ionizados	Matéria orgânica	Partículas	Bactérias
Destilação	E/B	P	B	E	E
Deionização	E	E	P	P	P
Osmose Reversa	B	P	B	E	E
Carvão Ativado	P	P	E/B	P	P
Ultrafiltração	P	P	B	E	E

E= excelente; B= Boa; P= pobre (BASQUES, 2010)

Tais procedimentos podem ser combinados dependendo do objetivo para o qual a água será utilizada. Dessa forma, podemos obter águas com graus de pureza diferente umas das outras, por isso existe uma escala (de acordo com esse grau de pureza) para os tipos de água, chamada de “água reagente” (BASQUES, 2010).

Tipos de água reagente:

“De acordo com: ACS - American Chemical Society, ASTM-American Society for Testing and Materials, USP-United States Pharmacopeia, NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards e CAP-College of American Pathologists, existem os seguintes tipos de água reagente:

- a - Água reagente tipo I
- b - Água reagente tipo II
- c - Água reagente tipo III
- d - Água reagente especial ” (BASQUES, 2010).

a- Água reagente tipo I

Ideal para uso geral dos laboratórios de análises clínicas. Se filtrada e estocada corretamente não produz interferência no preparo de reagentes e soluções (PNCQ, 2014).

b- Água reagente tipo II

Essa água pode ser utilizada quando a presença de bactérias é tolerada. Utilizada para testes de rotina que não utilizam água tipo I ou especial (PNCQ, 2014).

Essa água é, muitas vezes, encontrada nos laboratórios e possui diversas funções, como: diluir soros controles, preparar algumas amostras e reagentes (PNCQ, 2014).

c- Água reagente tipo III

Normalmente utilizada para rinsar frascos e fazer lavagens superficiais de frascos e vidrarias do laboratório. Também pode ser utilizada nos processos de purificação para se obter as águas tipo I e especial (PNCQ, 2014).

d- Água reagente especial

Deve ser utilizada quando há a necessidade de eliminar determinados contaminantes dependendo do seu objetivo, como por exemplo água para injetáveis. Essa água deve ser livre de íons, silicatos, bactérias, substâncias orgânicas e em suspensão, para isso, é preciso que combine duas ou mais técnicas de purificação da água (PNCQ, 2014).

3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E A UTILIZAÇÃO DA ÁGUA

A histologia é a ciência que estuda os tecidos animais e vegetais, como se organizam, como se relacionam (sua formação, estrutura e funcionamento) e suas composições químicas. A histotecnologia pode ser entendida por um conjunto de técnicas que proporcionam a compreensão e análise dos tecidos, também chamadas de técnicas histológicas (CAPUTO *et al*, 2010).

As técnicas histológicas se baseiam em um conjunto de procedimentos em ordem específica para preparar materiais diversos, permitindo a visualização dos materiais em microscópios ópticos, por exemplo são eles: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia (corte) e coloração. Nos tecidos calcificados é necessário que se faça uma descalcificação logo após a fixação, assim a técnica segue normalmente (CAPUTO *et al*, 2010).

I. Coleta

É a remoção de uma amostra de tecido de um determinado organismo. Pode ser feita uma biópsia (pequeno procedimento cirúrgico onde se colhe pequenos fragmentos de tecido da pessoa ou animal ainda vivos) ou necropsia (procedimento de coleta tecidual ou de secreções de animais ou seres humanos pós morte), sempre respeitando as normas de biossegurança e de registro do material para sua identificação. (CAPUTO *et al*, 2010).

II. Fixação

Uma das etapas mais importantes para se obter um bom resultado é a fixação. Esse procedimento consiste em utilizar procedimentos físicos ou químicos para interromper o metabolismo celular e manter a estrutura das células ali presentes, e não só evitar a putrefação, mas permitir que outras substâncias (provenientes das próximas etapas) interajam com a amostra (CAPUTO *et al*, 2010). Ver gráfico 8.

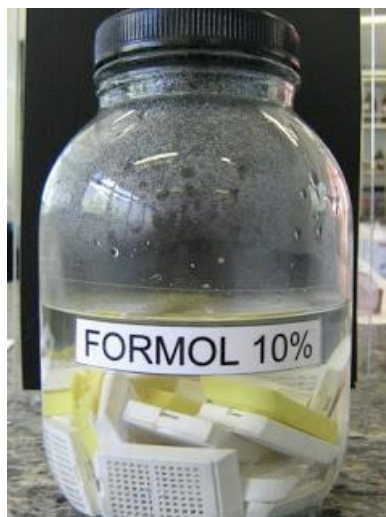


Gráfico 8: processo de fixação, fixador aldeído.

Fonte: SORANADIA, 2014

A escolha de um fixador depende do processo patológico presente no tecido, o tipo de tecido, suas estruturas celulares e sua compatibilidade com determinadas substâncias. Ter essa noção de compatibilidade é muito importante para um histotécnico, porque essas informações auxiliam na escolha do melhor procedimento para se obter o melhor resultado possível, dessa forma, facilitando a leitura final (CAPUTO *et al*, 2010).

III. Clivagem

O objetivo dessa etapa é reduzir o tamanho das amostras obtidas, tendo como ideal, atingir cerca de 3mm de espessura. Essa parte da técnica deve ser muito bem executada para evitar mudanças na estrutura tecidual (CAPUTO *et al*, 2010).

A forma na qual o tecido é clivado vai influenciar muito na sua visualização, o histotécnico deve ter uma noção muito boa de corte para tentar mostrar da melhor maneira possível as estruturas celulares daquela amostra (CAPUTO *et al*, 2010).

IV. Descalcificação

Essa técnica consiste em retirar os minerais presentes em alguns tecidos por meio de processos químicos e manter somente sua porção orgânica (CAPUTO *et al*, 2010).

Esses minerais presentes em determinados tecidos (ex. tecido ósseo) podem atrapalhar as etapas subsequentes, portanto é de grande importância que seja bem-feita (CAPUTO *et al*, 2010).

Para a descalcificação ser bem-feita é preciso paciência e atenção, pois tentar acelerar o processo pode alterar, ou até mesmo destruir, a morfologia tecidual, dessa forma, deve ser escolhida a melhor técnica possível de descalcificação tendo atenção no tempo em que o tecido vai sofrer a ação (CAPUTO *et al*, 2010).

V. Processamento

Consiste em propagar reagentes para o interior do tecido e retirar todo o líquido presente no mesmo, que no caso é o fixador proveniente da técnica anterior (CAPUTO *et al*, 2010).

Esse procedimento deixa o fragmento de tecido um pouco mais rígido, possibilitando um corte de finas “fatias”, o que será muito importante em etapas futuras (CAPUTO *et al*, 2010).

Esse mecanismo se baseia em: desidratação, clarificação e infiltração na parafina (CAPUTO *et al*, 2010).

A desidratação consiste em retirar a água dos tecidos, pois a água não permite que a amostra seja infiltrada na parafina, as substâncias não se combinam homogeneamente. O mesmo ocorre na clarificação, essa etapa visa remover o álcool no interior dos tecidos, porque a parafina também não se mistura bem com o álcool. Já a infiltração em parafina, etapa final do processamento, deve ser feita com a parafina aquecida entre 56°C a 60°C, onde ela é líquida, depois de infiltrada e em temperatura ambiente, ela ajuda a deixar o tecido firme o suficiente para aguentar os cortes do micrótomo (etapa futura) (CAPUTO *et al*, 2010). Ver gráfico 9.



Gráfico 9: aparelho utilizado para processamento nas técnicas histológicas.

Fonte: LUPTEC, 2017

VI. Inclusão

Essa etapa se resume em colocar os tecidos (que já foram infiltrados na parafina) em um molde contendo parafina líquida com sua parte a ser cortada no micrótomo para baixo (CAPUTO *et al*, 2010).

Os tecidos são postos em “cassetes”, que servem de molde para a parafina. O tecido deve ficar com a sua parte clivada para baixo, assim será possível cortar da melhor maneira possível para sua visualização depois (CAPUTO *et al*, 2010).

Para a inclusão ser bem efetuada é preciso que o processamento tenha sido bem feito, pois alguns fatores podem atrapalhar a inclusão, como: uma desidratação incompleta, uma má clarificação e impregnação. Se essas etapas não forem bem concluídas deve-se retroceder o processo, dando vários banhos de xilol para remover a parafina, dar banhos de álcool para remover o xilol, e recomeçar o processamento (CAPUTO *et al*, 2010).

É importante que a inclusão seja feita logo após o processamento para evitar que a amostra fique quebradiça (CAPUTO *et al*, 2010).

VII. Microtomia

Nada mais é que a secção dos blocos de parafina (com a ajuda de um aparelho chamado micrótomo) em “fatias” para serem coradas e visualizadas em microscopia de luz (CAPUTO *et al*, 2010).

Para a visualização dos tecidos é necessário que os cortes sejam bem finos e uniformes (com espessura ideal de 4 a 6 μm) (CAPUTO *et al*, 2010).

Após cortadas as “fatias” são postas em lâminas histológicas para serem coradas, ou seja, a próxima etapa (CAPUTO *et al*, 2010).

VIII. Coloração

Resumidamente, é a utilização de corantes específicos nas amostras de tecido já cortadas e postas nas lâminas histológicas para serem observadas em microscopia de luz (CAPUTO *et al*, 2010).

Essa etapa é crucial pois é uma das últimas, para que ocorra da maneira ideal existem diferentes formas de corar os tecidos, cada uma com sua especificidade para determinadas células e estruturas, facilitando a visualização (CAPUTO *et al*, 2010).

O histotécnico deve saber as especificidades de compatibilidade entre os corantes e as amostras para que seja possível diferenciar as estruturas teciduais ou celulares da amostra (CAPUTO *et al*, 2010).



Gráfico 10: processo de coloração em histologia.

Fonte: SORANADIA, 2014

IX. Microscopia

É a etapa final, onde as estruturas celulares serão analisadas ao microscópio de luz pelo pesquisador ou patologista (CAPUTO *et al*, 2010).

3.1. O USO DA ÁGUA NAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Dentre todos as etapas descritas anteriormente, duas se destacam em relação à alta demanda de água em seu desenvolvimento: a fixação e a coloração .

Detalhadamente, a fixação é um processo de interrupção do metabolismo celular. Quando se remove o material (tecido ou órgão) de um organismo, automaticamente, inicia-se o processo chamado de autólise (destruição do tecido vivo por conta do excesso do dióxido de carbono nas células) (CAPUTO *et al*, 2010).

Existem dois tipos de fixação: a física e a química. A fixação química utiliza substâncias químicas que formam reações com as células, impedindo que seus metabolismos as destruam e conseqüentemente mantendo suas estruturas. Alguns exemplos de fixadores físicos são as ondas eletromagnéticas (micro-ondas) e agitação molecular (ultrassom) (CAPUTO *et al*, 2010).

Atualmente os fixadores receberam classificações diferentes, cada um com suas especificidades que auxiliam o histotécnico a escolher o melhor fixador que seja compatível com as propriedades dos tecidos e as etapas subseqüentes da técnica (CAPUTO *et al*, 2010).

Dentre os mais utilizados: fixadores aldeídos, agentes oxidantes, agentes desnaturantes (ou coagulantes de proteínas), combinação de reagentes, fixação a seco e micro-ondas (CAPUTO *et al*, 2010).

Apesar de existirem diversas formas de fixar um tecido, os fixadores químicos mais utilizados são os aldeídos, especificadamente o formaldeído, por possuir um custo reduzido, ser mais fácil de manusear, preparar e ter bons resultados. Porém, para retirar seu excesso do tecido, são necessárias lavagens em água corrente por um período de até duas horas (CAPUTO *et al*, 2010).

Dentro desse grupo de fixadores aldeídos mais utilizados, alguns se destacam em suas longas lavagens em água corrente, e têm como principais características as seguintes:

Formalina 10%:

- Muito utilizada
- Baixo custo
- Fixa bem as proteínas
- Tempo de fixação entre 24 e 48 horas
- Lavagem em água corrente por 1 ou 2 horas (CAPUTO *et al*, 2010).

Formol salino

- Pode lavar ao acúmulo de pigmento formalínico
- Indicado para algumas reações histoquímicas
- Tempo de fixação entre 24 e 48 horas
- Lavagem em água corrente por 1 ou 2 horas (CAPUTO *et al*, 2010).

Formalina tamponada de Carson ou formalina em tampão de Milloning

- Indicado para microscopia eletrônica ou de luz
- Provoca menor extração de elementos celulares
- Preserva a imunorreatividade de hormônios gastrintestinais com paraformaldeído
- Tempo de fixação entre 24 e 72 horas
- Lavagem em água corrente por 1 ou 2 horas (CAPUTO *et al*, 2010).

Formalina neutra tamponada 10%

- Solução hipotônica (células com muita presença de água)
- É indicada para células pancreáticas, bactérias, alguns carboidratos, células do tecido conjuntivo, fungos, minerais, tecido nervoso, pigmentos e glândulas.
- Tempo de fixação entre 24 e 72 horas
- Lavagem em água corrente por 1 ou 2 horas (CAPUTO *et al*, 2010).

Após citar diferentes fixadores e chamar atenção para suas longas lavagens em água corrente (vale saltar que essa água é de torneira), agora o mesmo será feito com algumas técnicas de coloração (CAPUTO *et al*, 2010).

Após a microtomia começa a coloração, procedimento crucial para visualização dos tecidos em microscopia, e para escolher determinado tipo de corante que irá proporcionar melhor visão para tecidos específicos, é necessário ter um conhecimento prévio sobre as diferentes técnicas de coloração que irão combinar melhor com as características químicas de determinados componentes teciduais (CAPUTO *et al*, 2010).

Assim como os fixadores, existem inúmeras técnicas de coloração, algumas mais utilizadas em laboratório de patologia clínica que outros, e dentre esses mais utilizados temos aqueles que se destacam por possuírem algumas lavagens em água corrente (tanto de torneira como destilada), porém não tão longas como nos fixadores (CAPUTO *et al*, 2010).

Algumas dessas técnicas necessitam de banhos recorrentes para que a visualização seja a ideal, como:

Coloração pela Hematoxilina de Mayer e Eosina-Floxina.

- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada
- Corar com hematoxilina de mayer por 20 minutos
- Lavar em água corrente por 25 minutos
- Começar a desidratação com álcool 70% por 1 minuto
- Corar pela eosina-floxina por 2 minutos
- Lavar rapidamente em álcool 95%
- Desidratar em 3 banhos de álcool absoluto por 1 minuto cada
- Clarificar em 3 banhos de xilol e selar

Resultado: núcleos azuis e citoplasmas em tons de rosa (CAPUTO *et al*, 2010).

Coloração pela Hematoxilina de Harris e Eosina-Floxina.

- Desparafinizar e hidratar até a água destilada
- Corar com solução de hematoxilina de Harris por 6 a 10 minutos
- Lavar em água de corrente por 5 minutos
- Diferenciar em álcool-ácido, com 1 ou 2 mergulhos
- Lavar rapidamente em água corrente
- Colocar em solução fraca de água amoniacal ou de carbonato de lítio saturada até que os cortes fiquem azul
- Lavar completamente em água corrente por 10 minutos
- Colocar em álcool etílico a 80% por 1 a 2 minutos

- Desidratar a partir do álcool 95%
- Desidratar com 3 banhos de álcool absoluto
- Clarificar com 3 banhos de xilol e selar

Resultado: núcleos azuis e citoplasmas em tons de rosa (CAPUTO *et al*, 2010).

Coloração de Sirius red em pH 10,2 (Bogomoletz, 1980; Luque, 1989)

- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada
- Corar por 5 minutos pela hematoxilina de mayer
- Lavar em água corrente por 5 minutos
- Lavar em água destilada por 2 minutos
- Passar pelo álcool 70% por 3 minutos
- Corar pela solução de *sirius* red pH 10,2 por 1 hora ou mais
- Lavar em água corrente por 10 minutos
- Desidratar, clarificar e selar

Resultado: grânulos dos eosinófilos em vermelho e os núcleos das células em azul (CAPUTO *et al*, 2010).

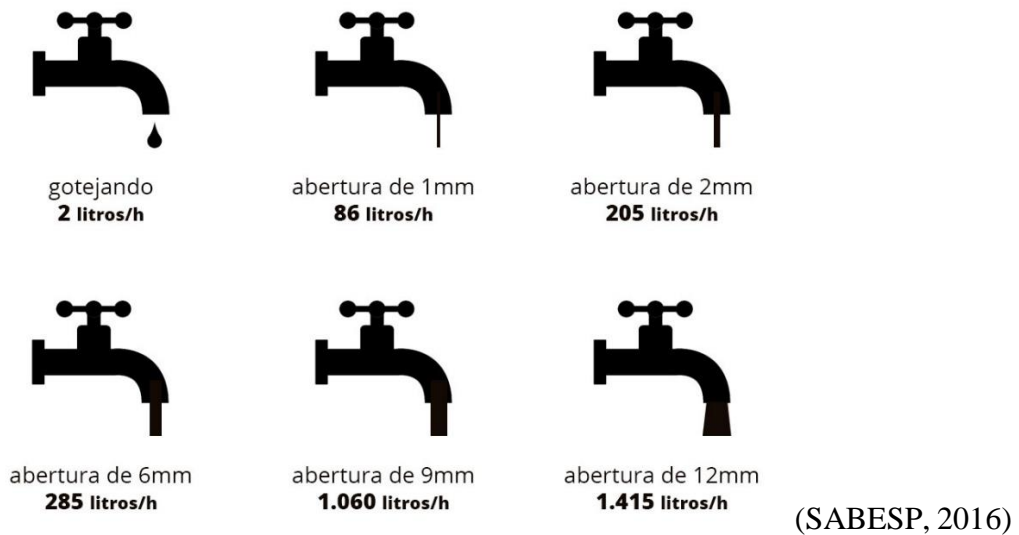
Método de Mucicarmim (Southgate, 1927)

- Desparafinizar e hidratar até a água destilada
- Deixar na solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weight por 7 minutos
- Lavar em água corrente de torneira por 10 minutos
- Corar na solução de trabalho de mucicarmim de Southgate por 30 minutos e descartá-la após o uso
- Enxaguar rapidamente em água destilada
- Contra corar na solução de amarelo metanil por 1 minuto
- Desidratar a partir de etanol 95%
- Clarificar e selar

Resultados: Mucina em rosa escuro; cápsula de *Cryptococcus sp* em rosa escuro; núcleos celulares em preto e o fundo em amarelo (CAPUTO *et al*, 2010).

Como pode-se observar, as técnicas de coloração também utilizam a água corrente com frequência e dependendo do tipo de coloração a amostra pode ficar mais ou menos tempo sendo lavado (CAPUTO *et al*, 2010).

Em relação à quantidade de água utilizada:



Dessa forma, é possível calcular que em 1 hora de lavagem para a fixação, é gasto em torno de 1.060 a 1.415 litros. Portanto nas lavagens de 25 minutos utilizam em média 353,7 litros e em apenas 5 minutos de lavagem é utilizado (em média) 70 litros de água.

4 SOLUÇÕES PARA O DESPERDÍCIO DE ÁGUA EM LABORATÓRIOS DE HISTOLOGIA.

Como anteriormente citado, em algumas etapas da técnica histológica existe uma grande demanda de água (em alguns casos na fixação e coloração), e o uso da água nesses procedimentos deve ser levado em conta assim como seu destino final.

De acordo com o perfil dos tipos de filtração da água citados nos capítulos anteriores, seria possível purificar a água utilizada nas técnicas histológicas e utilizá-la em outros procedimentos laboratoriais. Dessa forma, a água usada no laboratório seria totalmente reaproveitada e impediria o lançamento dessa água não-tratada no esgoto, evitando a poluição.

Substituir fixações químicas por físicas (como a utilização das ondas eletromagnéticas e agitação molecular) seria uma opção de diminuir a utilização da água nessa técnica, mas prolongaria o tempo necessário à adequada fixação, gerando outros problemas para o laboratório de anatomia patológica.

O mais apropriado é buscar uma tecnologia híbrida, que integre a fixação química e a física, reduzindo o tempo de fixação, reduzindo o volume de fixador necessário, e retirando a água deste processo.

Esta nova tecnologia possibilita uma técnica mais rápida, eficaz, precisa e econômica e está presente em modelos mais avançados de processadores automáticos. Um exemplo de equipamento que agrega estas funções a outras etapas do processo histotecnológico é o “PATHOS DELTA *hybrid tissue*”, um equipamento responsável por diversos processos, que promete reduzir o tempo de técnica em até 40% e já deixa as amostras prontas até a inclusão, faltando apenas a microtomia e coloração dos tecidos (MILESTONEMED, 2016).

Além do tempo otimizado, várias técnicas que exigem total atenção do técnico seriam automatizadas. Sem lavagens na etapa da fixação, o gasto de água se resumiria apenas na coloração:

Em relação à coloração por Hematoxilina, para evitar a lavagem em água corrente pode ser utilizada uma solução aquosa básica, também chamada de solução “azuladora” ou “solução de Scott” ($MgSO_4 + 7H_2O / NaHCO_3$) (LEICA, 2016).

Essa solução promove uma coloração azul da cromatina nuclear e membranas nucleares de maneira rápida e prática. Da mesma forma que minimiza uma perda tecidual e celular causada pela constante passagem da água pelas lâminas de vidro. (LEICA, 2016)

5 CONCLUSÕES

Entrando na discussão sobre a importância da água como bem econômico (essencial para mover os setores da sociedade), como um recurso indispensável para a vida na terra e equilíbrio dos ecossistemas; a abordagem desse trabalho focaliza na utilização desse bem no setor laboratorial, mais especificadamente no laboratório de histologia. A questão do uso da água em grande escala nos laboratórios de histologia, apesar de ser muito importante, não é muito discutida.

O setor laboratorial, em geral, necessita de água constantemente, seja tipo I, II, III... para práticas laboratoriais ou até mesmo em segurança nos equipamentos de proteção coletiva ou individual, por isso que foram especificados os tipos de água mais usados, afim de diferenciar seus tipos e apontar seus usos no laboratório.

As técnicas histológicas em geral utilizam bastante água (tanto de torneira, quanto destilada), e isso bate de frente com a questão proposta por esse trabalho, de pensar em soluções ecológicas para o uso da água.

Para além de boas práticas laboratoriais, esse trabalho aponta questões de relevância ambiental e econômica.

As propostas apresentadas por esse trabalho visam minimizar ou aprimorar o uso da água nas técnicas histológicas convencionais por meio de análise dos procedimentos e observações em relação ao uso da água. Dessa forma algumas recomendações e propostas para solucionar ou amenizar a problemática da água foram feitas com o intuito de tornar o procedimento ecologicamente correto.

6 REFERÊNCIAS

- BASQUES, Frida Wilke Alves. **Água como reagente**. LABTEST. 2010. Disponível em: file:///C:/Users/Fam%C3%ADia%20Cruz/Desktop/Coisas%20da%20FI%C3%A1via/MONOGRAFIA/A_agua_como_Reagente.pdf. P 2 e 3
- BARROS, Fernanda Gene Nunes/ Amin, Mário M. **Água: um bem econômico de valor para o brasil e o mundo**. 2007. Disponível em: http://www.rbgdr.net/012008/artigo_4.pdf. P 75
- CAPUTO, Luzia/ Molinaro, Etelcia / Amendoeira, Regina. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 2010. Capítulo 3, pag 89-188.
- FERREIRA, Tônico. O GLOBO. 2015. **Escassez de água já afeta mais de 40%da população do planeta terra**. Disponível em: <http://g1.globo.com/jornal-da-globo/noticia/2015/08/escassez-da-agua-ja-afeta-mais-de-40-da-populacao-do-planeta-terra.html>. Acessado em: 15/12/2016
- GOMES, Abílio Soares/ CLAVICO, Etiene. 2005. **Propriedades físico químicas da água**. Disponível em: <http://www.uff.br/ecosed/PropriedadesH2O.pdf>.
- LEICA. 2016. **Concentrado de solução de uso para substituição de água de torneira Scott**. Disponível em: <http://www.leicabiosystems.com/pt/preparacao-das-amostras/reagentes-e-solucoes/reagentes/detalhes/product/scotts-tap-water-substitute-working-solution-concentrate/>. Acessado em: 15/12/2016
- MILESTONE. 2016. Synergy. **Rapid tissue processing and auto-embedding all-in-one**. Disponível em: <http://www.milestonemed.com/products/tissue-processing/synergy.html> . Acessado em:15/12/2016
- MORETTI, Jorge Luiz. 2007. **Propriedades físicas da água**. Disponível em: http://www.moretti.agrarias.ufpr.br/raspa/U_I02_propriedades_da_agua.pdf.
- PNQ, 2014. **PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE =EDUCAÇÃO CONTINUADA=ÁGUA REAGENTE NO LABORATÓRIO CLÍNICO**.
- RIDDER, André. 2006. **Água para vida. Água para todos**. Disponível em: http://www.redeambientalescoteira.org.br/arquivos/wwf_livro_das_aguas.pdf . acessado em: 22/12/2016

VICTORINO, Célia Jurema Aito. 2007. EDIPUCRS. **Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos.** Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/planetaagua.pdf>. P 6,12 e 13.