

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

SILVANIA TAVARES PAZ

METODOLOGIA INOVADORA SEM USO DO XILOL PARA
A TÉCNICA HISTOLÓGICA DE ROTINA

RECIFE

2017

SILVANIA TAVARES PAZ

**METODOLOGIA INOVADORA SEM USO DO XILOL PARA
A TÉCNICA HISTOLÓGICA DE ROTINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys de Medeiros

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª Eliete Cavalcanti da Silva

Linha de Pesquisa: Aspectos biotecnológicos e microbiológicos aplicados à patologia

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P348m Paz, Sylvania Tavares.
Metodologia inovadora sem uso do xilol para a técnica histológica de rotina / Sylvania Tavares Paz. – 2017.
68 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Paloma Lys de Medeiros.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Inovação. 2. Óleo mineral. 3. Técnicas histológicas. 4. Xilenos. I. Medeiros, Paloma Lys de (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-307)

SILVANIA TAVARES PAZ

**METODOLOGIA INOVADORA SEM USO DO XILOL PARA
A TÉCNICA HISTOLÓGICA DE ROTINA**

**Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Pernambuco como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.**

DATA DE APROVAÇÃO: 28/07/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues (Membro externo)

Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB/UFPE)

Assinatura: _____

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Membro interno)

Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia (CB/UFPE)

Assinatura: _____

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Presidente)

Instituição: Departamento de Patologia (CCS/UFPE)

Assinatura: _____

*“Dedico este trabalho as minhas filhas Emanuela e
Rafaela, e a minha neta Leticia maravilhosos presentes de
Deus em minha vida”*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força, coragem em todo tempo para superar as dificuldades, me dá sabedoria e conhecimento. Por colocar pessoas maravilhosas em minha vida, para que contribuíssem com este trabalho. Tudo é Dele, por Ele e para Ele. A ti sou grata meu Pai, meu Rei, e Deus Todo poderoso! Todo louvor, honra e glória a Ti!

Às minhas filhas e Neta, Emanuela, Joana Rafaela e Letícia Gabriela Paz que estiveram ao meu lado para me ajudar em todos os momentos. Obrigada por serem anjos na minha vida, pois vocês são companheiras de todos os dias. Mas também tem a filha do coração Rafaelly Alves da Silva, que está sempre presente como amiga dedicada.

Aos meus pais (*in memoriam*) que lutaram para que eu chegasse onde hoje estou, por todo amor, cuidado, carinho, dedicação e palavras de incentivo, amo vocês. Às minhas irmãs Maria das Graças Paz Machado e Maria do Socorro Paz, em especial sou grata pelo amor, carinho e palavras de ânimo, de força e esperança, que jamais esquecerei.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Paloma Lys Medeiros, atenciosa, calma e generosa, se empenhou todo tempo, me deu forças, me ensinou, me guiou em todo o trabalho com muita sabedoria, e me deu todas as coordenadas que foram essenciais neste trabalho, sendo uma verdadeira orientadora, uma mãe. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Prof^a. Dra. Eliete Cavalcante da Silva, muito obrigada por colaborar com seu apoio e conhecimentos.

A Margarete Valdevino da Silva, secretária do Mestrado em Patologia, pela atenção, paciência e disponibilidade em solucionar as burocracias vivenciadas.

Aos meus amigos e alunos do Mestrado de Patologia, Marilene Gomes, Zenaide Brito, Rafael Padilha, Sidcley Araújo, Francisco Paes, Carla Silva, Rafaelly Silva, Lidier Nogueira, Agnieszka Ferreira, entre outros. Estes, que estão presentes no dia a dia, colaborando, me dando força para seguir em frente. Sou grata por tudo!

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia Prof^ª. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas pelo grande incentivo e contínuo apoio. Também, não poderia esquecer o Prof. Dr. Adônis Reis Lira (*in memoriam*), grande patologista, fundador do Mestrado de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, que me ajudou a estar onde estou com a graça de DEUS. Agradeço, com grande consideração, aos professores Dr. Roberto Vieira de Melo, Dr. Roberto Jaques da Silveira Neiva de Oliveira, Dr. Nicodemos Pontes Filho e tantos outros professores do Mestrado de Patologia pela amizade, por todo apoio e colaboração nos conhecimentos adquiridos nas disciplinas.

Aos alunos do Programa de pós-graduação, que me permitiram contribuir na confecção do material de suas pesquisas e que de certa forma fazem parte da rotina do meu trabalho e aos Departamentos de Patologia, Nutrição, de Histologia e Embriologia, que abriram suas portas para realização das colaborações necessárias ao desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigada!

Por fim e não menos importante agradeço aos avaliadores que fazem parte da minha banca, contribuindo para o avanço das pesquisas com novas tecnologias.

A todos, que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado torcendo ou participando para que esse sonho se tornasse realidade.

Muito Obrigada!

"Vitória não é para quem quer, mas para quem luta, persevera e jamais desiste. A vitória vem para aqueles que mesmo cansados seguem lutando, mesmo em circunstâncias difíceis seguem acreditando e que mesmo tudo sendo contrário seguem crendo que Deus está no controle. A vitória é desejo de muitos, mas troféu para poucos, pois muitos se entregam ao cansaço, outros desistem pelo caminho, mas somente os que tem fé continuam, não por serem mais fortes, mas por ter um Deus forte ao seu favor"!!!

Autor desconhecido

RESUMO

A produção contínua de um Laboratório de Histotecnologia está voltada para o processamento de órgãos e tecidos, usualmente corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os danos causados pelo xilol à saúde dos histotecnologistas e pesquisadores da área de estudo têm sido bem documentados e a busca por um substituo seguro se torna uma necessidade diária. O principal objetivo da presente pesquisa foi propor a utilização de um produto em substituição ao xilol na técnica histológica de rotina e que não apresentasse as características tóxicas deste. Diferentes órgãos ou tecidos (humanos, animais e vegetais) foram submetidos ao processamento com óleo mineral (clareamento e desparafinização) e corados com H&E. Algumas amostras também foram coradas com colorações especiais (P.A.S., tricrômico de Masson e Prata PAZ). Um tempo de aproximadamente 20 minutos foi requerido para o processamento com óleo mineral quando comparado à técnica convencional (em torno de 67 minutos). Foram estabelecidos critérios para avaliação das preparações (clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica). A análise do material foi realizada por três pesquisadores da área de estudo, sem terem o prévio conhecimento do tipo de processamento. Todas as preparações foram avaliadas com o auxílio da microscopia óptica e constatou-se concordância significativa entre os observadores com K_w (teste Kappa) indo de 0,42 a 0,85. O processamento histológico com uso do óleo mineral ao invés do xilol apresenta-se como uma inovadora proposta de protocolo a ser inserida na rotina dos Laboratórios de Histotecnologia, assegurando redução no tempo de exequibilidade, confiabilidade diagnóstica e no âmbito profissional, biosseguridade pessoal e ambiental.

Palavras-chave: Inovação. Óleo Mineral. Técnicas Histológicas. Xilenos

ABSTRACT

The continuous production of a Histotechnology Laboratory is focused on the processing of organs and tissues, usually stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Damage caused by xylol to the health of histotechnologists and researchers in the study area has been well documented and the search for a safe replacement becomes a daily necessity. The main objective of the present research was to propose the use of a product replacing xylol in the routine histological technique and that did not present the toxic characteristics of this product. Different organs or tissues (human, animal and vegetable) were submitted to mineral oil processing (bleaching and dewaxing) and stained with H&E. Some samples were also stained with special stains (P.A.S., Masson's trichrome and Prata PAZ). The time of approximately 20 minutes was required for processing with mineral oil when compared to the conventional technique (about 67 minutes). Criteria for evaluation of the preparations (clarity and uniformity of staining, sharpness, adequacy of nuclear and cytoplasmic staining, presence of artifacts, integrity of the structures and suitability for histological evaluation) were established. The analysis of the material was carried out by three researchers of the study area, without knowing the type of processing. All preparations were evaluated with the aid of optical microscopy and significant agreement was found between the observers with K_w (Kappa test) ranging from 0.42 to 0.85. Histological processing using mineral oil instead of xylol presents itself as an innovative protocol proposal to be inserted in the routine of Histotechnology Laboratories, ensuring a reduction in the time of feasibility, diagnostic reliability and in the professional scope, personal and environmental biosecurity.

Keywords: Innovation. Mineral Oil. Histological Techniques. Xylenes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS	<i>Págs.</i>	
Figura 1	Foto de Friedrich August Kekulé Von Stradnitz (1829-1896), descobridor da fórmula do benzeno.....	19
Figura 2	Estrutura química dos principais constituintes do xilol.....	20
Figura 3	Biotransformação do xilol (similar ao tolueno).....	22
Figura 4	Fotomicrografias de diferentes órgãos obtidos de ratos saudáveis (<i>Wistar</i>) processados por meio da técnica convencional com xilol e corados com H&E. A e F) testículo, B e G) ovário, C e H) útero, D e I) fígado e E e J) baço. Magnitude das imagens: A, B, C, D E (100x) e F, G, H, I, J (400x).....	42
Figura 5	Fotomicrografias de diferentes órgãos obtidos de ratos saudáveis (<i>Wistar</i>) processados por meio da técnica com óleo mineral e corados com H&E. A e F) testículo, B e G) ovário, C e H) útero, D e I) fígado e E e J) baço. Magnitude das imagens: A, B, C, D E (100x) e F, G, H, I, J (400x).....	42
Figura 6	Fotomicrografias do intestino grosso de ratos saudáveis (<i>Wistar</i>) processado por meio das técnicas: convencional com o xilol (A e B) e com o óleo mineral (C e D); ambos os procedimentos corados com H&E. Magnitude das imagens: A e C (100x) e B e D (400x), representam ampliações da região da mucosa intestinal.	43
Figura 7	Fotomicrografias de embriões de <i>Gallus gallus domesticus</i> processados na presença de xilol (A e B) e com óleo mineral (C e D). Observam-se nos cortes seriados transversais formações de estruturas e regiões do SNC como telencéfalo (asterisco), formação de cálice óptico (seta longa) e rombencéfalo (losângulo), formação de cristalino (c), vesícula ótica (vo). Preparações coradas com Hematoxilina: aumento de: 100x (A, B, C e D).....	46
Figura 8	Fotomicrografias de biópsias renais humanas processadas com óleo mineral, e coradas com diferentes colorações: H&E (A), P.A.S. (B); tricrômico de Masson (C) e Prata PAZ (D). Magnitude de todas as imagens (400x).....	47
Figura 9	Fotomicrografias de necropsias de cérebro humano processadas com o óleo mineral e coradas com a prata PAZ: A) notam-se placas amilóides,	

B) degeneração granulo-vacuolar e **C)** angiopatia amilóide (deposição amilóide na camada média do vaso. Magnitude de todas as imagens (1000x)..... 48

Figura 10 Fotomicrografias de material vegetal (folha de mangueira) processado com xilol (**A**) e com o óleo mineral (**B**). Destacam-se estruturas do mesofilo da planta em corte transversal: epiderme (ep); parênquima paliçádico (pp); parênquima esponjoso (pj); parênquima fundamental (pf). Preparações coradas com Hematoxilina. Aumento: 100x (**A** e **B**)..... 49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS		<i>Págs.</i>
Quadro 1	Processamento de fixação dos tecidos (Etapas de pré-fixação e fixação propriamente dita).....	39
Quadro 2	Desparafinização/Coloração/Montagem (Etapa de pós-fixação).....	40
Quadro 3:	Vantagens do óleo mineral em relação ao xilol.....	49

TABELAS		<i>Págs.</i>
Tabela 1	Propriedades físico-químicas do xilol e do óleo mineral.....	31
Tabela 2	Resultados do questionário de três observadores com relação aos critérios de uniformidade da coloração e presença de artefatos, após observação de órgãos (fígado, artéria, glândula adrenal, baço, intestino grosso, testículo e útero) processados pela técnica convencional (xilol) ou com o uso do óleo mineral. A acurácia ou precisão (número de respostas corretas/número de perguntas tentadas) foram expressas em números absolutos e em porcentagem. A exatidão geral das observações foi expressa como uma porcentagem.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACGIH	- <i>American Conference of Governmental Hygienist</i>
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATSDR	- <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CB	- Centro de Biociências
CCS	- Centro de Ciências da Saúde
CETESB	- Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CICADS	- <i>Concise International Chemical Assessment</i>
CNS	- Comissão Nacional de Saúde
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
EPA	- <i>Environmental Protection Agency</i>
FISPQ	- Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos
LE-DHE	- Laboratório de Embriotoxicidade do Departamento de Histologia e Embriologia
LEI	- Limite Explosivo Inferior
LES	- Limite Explosivo Superior
NBR	- Norma Brasileira
OMR	- Óleo mineral refinado
OSHA	- <i>Occupational Safety and Health Administration</i>
POSPAT	- Programa de Pós-graduação em Patologia
RQR	- Resíduo químico de risco
SNC	- Sistema Nervoso Central
SVO	- Serviço de Verificação de Óbitos

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Introdução.....	17
2.2	Revisão Integrativa.....	19
2.2.1	Breve descrição histórica da descoberta do Benzeno.....	19
2.2.2	Considerações sobre o xilol.....	20
2.2.3	Uso do xilol na histotécnica e seus efeitos no organismo.....	23
2.2.4	Considerações sobre a técnica histológica de rotina.....	25
2.2.5	Métodos de histoprocessamento sem uso do xilol.....	26
2.2.6	Vantagens para utilização do óleo mineral.....	29
2.3	Objetivos.....	32
2.3.1	Objetivo geral.....	32
2.3.2	Objetivos específicos.....	32
2.4	Justificativa.....	33
3	SISTEMA ANALÍTICO.....	34
3.1	Local de estudo.....	34
3.2	Período de referência.....	34
3.3	Tipo de estudo.....	34
3.4	Comitê de Ética.....	34
3.5	Métodos de Coleta.....	35
3.5.1	Animais experimentais (ratos <i>Wistar</i>).....	35
3.5.2	Modelo com embrião de ave.....	36
3.5.3	Amostras de tecidos humanos.....	36
3.6	Processamento histológico com xilol ou óleo mineral.....	37
3.7	Método de Análise.....	38

3.8	Geração de Patente.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICE A – Critérios para Avaliação Histológica.....	60
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais-CEUA/UFPE.....	61
	ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais - CEUA/UFPE.....	62
	ANEXO C – Aprovação do: Comitê de Ética-Pesquisa com seres Humanos/UFPE.....	63
	ANEXO D - Certificado de qualidade do Óleo Mineral.....	67
	ANEXO E - Depósito do Pedido de Patente- DINE/UFPE.....	68

1 APRESENTAÇÃO

A técnica histológica de rotina consiste em uma série de etapas com o objetivo de preparar determinados tecidos, obtidos a partir de organismos vivos ou mortos respeitando-se os meios de obtenção, para serem analisados microscopicamente enfatizando-se o diagnóstico patológico, a pesquisa científica ou o ensino nas áreas da Saúde e Ciências Biológicas. A produção diária de um Laboratório de Histotecnologia está voltada para o processamento de diferentes tecidos (humano, animal ou vegetal); todavia nos dias atuais, a realização desses procedimentos ainda expõe os técnicos e pesquisadores da área, a um produto muito tóxico e bastante conhecido, o xilol.

Devido à toxicidade inerente ao xilol, com riscos para a saúde humana e ao meio ambiente, modificações metodológicas vêm sendo realizadas, para a retirada desse solvente da rotina laboratorial ou mesmo no intuito de reduzir ao máximo a sua utilização. Embora vários substitutos para o xilol tenham sido propostos (incluindo agentes como limoneno, hidrocarbonetos alifáticos, óleos vegetais e misturas de óleos minerais), a busca por um substituto seguro continua sendo uma necessidade diária.

O conhecimento dos princípios físicos e químicos das diferentes etapas do processamento histotécnico, aliado à experiência laboratorial de mais de vinte anos, possibilitaram através da presente pesquisa a geração de um processo inventivo relacionado a uma metodologia inovadora sem uso do xilol na técnica histológica de rotina, com substancial eficiência para realização das etapas de diafanização e desparafinização.

Em função do exposto, o processamento histopatológico livre de xilol, implicará num conjunto de benefícios tais como baixo custo, fácil exequibilidade e biossegurança para os profissionais da referida área de estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Introdução

A industrialização fez surgir uma imensa variedade de novas substâncias para suprir as necessidades do homem conforme a demanda socioeconômica e com isso um forte incentivo com relação ao uso de agentes químicos; dentre os quais se destaca o xilol que tem sido utilizado como solvente em diversas indústrias (tinturas, corantes, farmacêutica, produção de plásticos e petróleo) e em procedimento laboratoriais com fins diagnósticos, estudo ou pesquisa, relacionado às áreas da Histologia e da Patologia (LANGMAN, 1994; FREITAS; PORTO; MOREIRA, 2002; MORALES et al., 2004; COSTA et al., 2007; KERETETSE et al., 2008).

Os xilenos (dimetilbenzenos) são constituídos por uma mistura de três hidrocarbonetos aromáticos, com as seguintes formas isoméricas: orto-xileno (*o*-xileno), para-xileno (*p*-xileno) e meta-xileno (*m*-xileno), sendo essa última apresentação o componente mais abundante (CETESB, 2012).

O xilol (nome comercial da mistura de isômeros) é obtido a partir do petróleo e possui baixo teor de enxofre (GARDNER, 1996; JACOBSON; McLEAN, 2003). De acordo com Gardner (1996) o xilol é um líquido inflamável, incolor, de odor adocicado característico; sendo insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como acetona, benzeno, etanol absoluto e éter.

Apesar de ser considerado um resíduo químico de risco (RQR) para a saúde do trabalhador e o meio ambiente (IARC, 2006), Metegud et al. (2013) demonstraram que, em laboratórios da área da saúde, o xilol foi considerado um importante produto utilizado nos procedimentos para diagnósticos histológicos e citológicos, durante a

realização da técnica histológica. As notáveis capacidades de diafanizar e de desparafinizar do xilol, também foram referidas como essenciais aos procedimentos de coloração (COSTA et al., 2007 a e b).

Até hoje, um dos grandes problemas enfrentados pelos profissionais do setor histotécnico envolve o contato direto com o xilol, podendo causar graves irritações na pele e mucosas, bem como devido a sua ação narcótica sobre o sistema nervoso, causar depressão. No tecido pulmonar, a produção de um aldeído, na biotransformação do xilol, pode resultar na ação deletéria de vários componentes celulares (RITCHIE et al., 2003; KAVCAR et al., 2006; COSTA et al., 2007; CASTRO et al., 2010; FUENTE, 2012).

Independente de sua grande utilização tem sido bem documentado que o xilol foi considerado perigoso para o meio ambiente e altamente tóxico para os seres humanos (CHATTERJEE et al., 2005; KUM et al., 2007; SANDIKCI et al., 2009).

Os métodos histológicos livres de xilol vêm sendo desenvolvidos e estudados desde 1995 por pesquisadores do Laboratório de Patologia e Citologia do Hospital de Vrinnevi, em Norrköpin na Suécia (FALKEHOLM, 1996). Com o avançar das investigações, o óleo mineral refinado (OMR) foi referido como um possível substituto do xilol nas práticas histológicas (RASMUSSEN et al., 1992; BUESA, 2000; BUESA, 2009; PREMALATHA et al., 2013). Logo, no intuito de se utilizar o óleo mineral em processamentos laboratoriais especializados, as pesquisas nessa área continuam em várias partes do mundo pela busca de um substituto seguro.

Neste contexto, a presente pesquisa tem como principal objetivo introduzir na técnica histológica de rotina o uso do óleo mineral em substituição ao xilol.

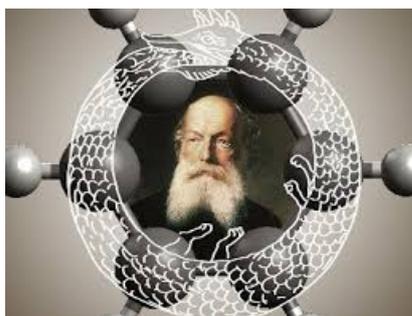
2.2 Revisão Integrativa

2.2.1 Breve descrição da história sobre a descoberta do benzeno

O benzeno constitui o hidrocarboneto aromático mais importante para a Química Orgânica. A sua descoberta se deu em 1825 pelo físico e químico Michael Faraday (1791-1867) no gás de iluminação, utilizado em Londres naquela época. Em 1834, outro cientista, o químico Eilhard Mitscherlich, conseguiu determinar a fórmula molecular do benzeno, composto por seis átomos de carbono e seis átomos de hidrogênio (C_6H_6) (PERUZZO; CANTO, 2010).

A determinação da sua estrutura em 1865 foi realizada pelo químico alemão Friedrich August Kekulé Von Stradnitz (**Figura 1**), que explicou o comportamento químico do benzeno, justificando como seis átomos de carbono poderiam estar associados a somente seis átomos de hidrogênio, em uma substância altamente estável e resistente a muitos ataques por combinação química. De início, ele acreditava que só haveria ligações simples entre os carbonos. Porém, mais tarde, ele propôs que haveria uma alternância entre ligações simples e duplas. Dessa forma, ele antecipou a idéia da ressonância do anel benzênico, que surgiu apenas em 1930 (PALMER, 1959 *apud* WOTIZ; RUDOFISKY, 1993).

Figura 1 - Foto de Friedrich August Kekulé Von Stradnitz (1829-1896), descobridor da fórmula do benzeno.

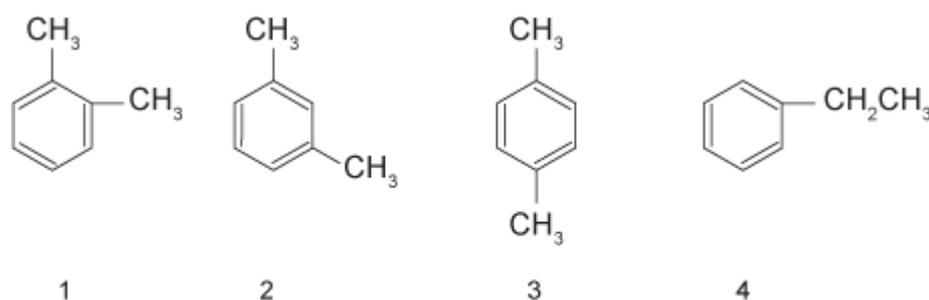


Fonte: JAPP (1898) *apud* ROTHEMBERG (1995).

2.1.2 Considerações sobre o xilol

O xilol, denominado de 1,2 dimetilbenzeno, dimetiltolueno ou xilol, tem origem da palavra grega *Xylon* (que significa madeira) e apresenta-se como um líquido incolor, muito volátil, insolúvel em água e miscível em etanol, éter e outros solventes orgânicos. É um produto de odor característico, nocivo e inflamável, e a sua solução comercial resulta de uma mistura de três isômeros de xilol, etilbenzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos, nas seguintes proporções: *orto*-xileno (23%), *meta*-xileno (46%), *para*-xileno (21%), etilbenzeno (0,9%) e outros hidrocarbonetos aromáticos (9%) (**Figura 2**); apresentando as seguintes características como fórmula química C_8H_{10} , molecular $C_6H_3(CH_3)$, peso molecular de 106,2 g/Mol e ponto de ebulição igual a 138° C (MERCK, 1996; GARDNER, 1996; JACOBSON; McLEAN, 2003; EPA, 2003).

Figura 2 - Estrutura química dos principais constituintes do xilol



1 – orto-xileno; 2 – meta-xileno; 3 – para-xileno; 4 – etilbenzeno

Fonte: Merck, 1996.

De acordo com a resolução nº 358, de 29 de abril de 2005, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), o xilol está classificado no grupo B, que enquadra substâncias químicas que podem apresentar riscos à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade (BRASIL, 2005).

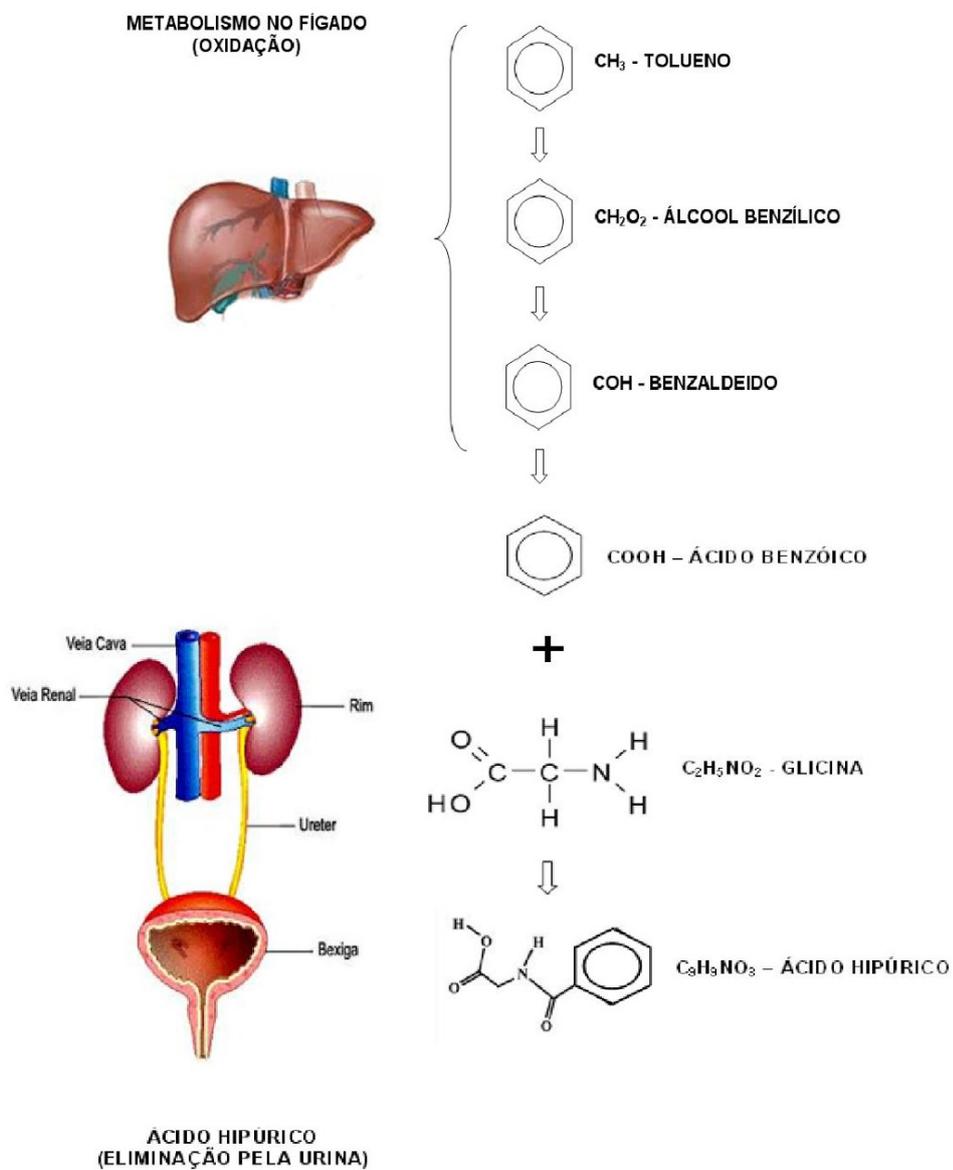
O uso freqüente do xilol em laboratórios de ensino e pesquisa, bem como para análises clínicas e patológicas pode causar agravos à saúde dos trabalhadores que ficam expostos a esse solvente. Logo, faz-se necessário realizar a avaliação toxicológica dessas pessoas, através da detecção do ácido metil-hipúrico, um metabólito do xilol excretado na urina, que constitui o indicador proposto pela Legislação Brasileira incluso na Norma Regulamentadora (nº15) para a monitorização biológica de exposição a este agente químico (BRASIL, 2006).

A biotransformação do xilol é similar a do tolueno (**Figura 3**) e compreende a oxidação de um dos grupos metila (-CH₃) com formação do ácido metil-benzóico, o qual ao se conjugar à glicina, é excretado na urina como ácido metil-hipúrico, a maior parte nas primeiras oito horas após a exposição (LANGMAN, 1994; JACOBSON; McLEAN, 2003).

De acordo com a ABNT NBR 14725-1 (2001) no que se refere à ficha de informação de segurança de produtos químicos (FISPQ) e a Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1992), o xilol possui densidade de 0,866 na atmosfera de 20-24°C, ponto de congelamento correspondente a -25°C e ponto de ebulição a 143°C na pressão atmosférica de 760 mmHg. No que diz respeito à explosividade, seu limite de explosividade inferior (LEI) é de 1,0% e o superior (LES) é de 6,6%. A densidade do vapor equivale a 3,66 e a pressão do vapor igual a 7 mmHg na atmosfera de 20°C. A solubilidade em água é de 0,00003 g/100 mL de água e em solventes orgânicos é miscível em éter, etanol, cetonas e ésteres (CETESB 1992; ABNT 2001; ANVISA, 2010).

Os resíduos de xilol que são lançados no meio ambiente não são degradados e seus vapores podem causar explosão nas instalações de esgotos; existindo, portanto, um limite de tolerância ao xilol estipulado de 76 ppm ou 340 mg/m³ (CETESB 2012).

Figura 3 - biotransformação do xilol (similar a do tolueno)



Fonte: EPA, 2016.

O xilol foi declarado nos Estados Unidos pela OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*) e a ACGIH (*American Conference of Governmental Hygienist*) como um produto perigoso, tendo sido estipulado um limite de exposição de 100 ppm; verificou-se, ainda, que a contaminação do solo e de mananciais de água por esse produto poderia permanecer por meses, contudo devido a sua fácil evaporação, ao entrar em contato com a luz o xilol degradar-se-ia em outros químicos menos perigosos (ANKLE et al., 2015).

2.2.3 Uso do xilol na histotécnica e seus efeitos no organismo

O xilol, tradicionalmente, tem sido empregado como agente diafanizador (clareador) para tornar um tecido translúcido, assim como, agente de montagem na histologia (BUESA; PESHKOV, 2009; CHEN et al., 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2014). Tem sido bem documentado na literatura que o xilol é um perigo para o ambiente, bem como é altamente tóxico para os seres humanos, havendo evidências de exposições repetidas ou excessivas ao referido solvente, o que pode causar danos irreversíveis nos órgãos do sistema nervoso e na pele, fígado, rins e pulmão (GAMBERALE et al., 1978; HASS et al., 1995; CHATTERJEE et al., 2005; KUM et al, 2007; SANDIKCI et al., 2009).

Além disso, o xilol tem sido responsável por muitos problemas, em função de suas características químicas por ser altamente inflamável e volátil. No entanto, o xilol mesmo sendo muito tóxico, continua sendo utilizado como agente de diafanização em processamentos histológicos; sabendo-se, ainda que alguns substitutos tenham sido comercialmente desenvolvidos, muitos desses falharam em substituir completamente o xilol, devido à eficácia variável e custos elevados (BUESA, 1997).

A toxicidade do xilol pode provocar uma série de reações no organismo humano como dores de cabeça, perda de memória, leucopenia, trombocitopenia, anemia, cianose, irritação ocular, dermatite, infertilidade, além de alterações neurofisiológicas como ansiedade, fadiga, tremores e vertigem (JACOBSON; McLEAN, 2003; COSTA et al., 2007; KERETETSE et al., 2008, CASTRO et al., 2010). Outros efeitos tóxicos foram relatados como lesões cardíacas e renais, infecções secundárias, e alterações musculares causada pelo esgotamento do ATP mitocondrial nas células afetadas (BUESA; PESHKOV, 2009; COSTA et al., 2012).

Segundo Ramamoorth et al. (2016), pessoas que trabalham com tolueno e xilol têm o risco aumentado de desenvolverem uma alteração vascular conhecida como fenômeno de Raynaud e a chance de ser uma forma severa, aumenta se esses produtos são combinados com acetona ou solventes a base de cloro.

Muitos dos danos causados pelo xilol no organismo estão relacionados ao binômio exposição-efeito, que está associado às vias de absorção, tipo e concentração do agente químico, frequência e duração da exposição, susceptibilidade individual, dentre outros fatores (TAMBELLINI; CÂMARA, 1998; FREITAS, 2002; XELEGATI et al., 2006).

Devido ao fato do xilol ser bastante volátil, seu principal mecanismo de absorção ocorre pela via aérea, de forma rápida; contudo, pode ser absorvido mais lentamente pela via cutânea ou ainda pela via oral, embora essa última via seja mais rara (RITCHIE et al., 2003; KAVCAR et al., 2006; CASTRO et al., 2010).

No geral, menciona-se que 95% do xilol absorvido passam por uma biotransformação no fígado, sendo oxidado em ácido metil-hipúrico. Boa parte desse metabólito é excretada na urina e uma pequena percentagem de xilol inalterado deve ser eliminada pelos pulmões (JACOBSON; McLEAN, 2003). Neste contexto, muitos

estudos tendem a alertar como compostos orgânicos voláteis, por exemplo, o xilol, podem ser altamente prejudiciais à saúde humana e ao ambiente, tendo-se em conta que a concentração do mesmo na água ou no tratamento de resíduos não pode exceder 28 mg/Kg (WANG et al., 2007; JANASIK; JAKUBOWSKI; JAIOWIECKI, 2008; JANASIK et al., 2010; KANDYALA et al., 2010; PREMALATHA et al., 2013).

2.2.4 Considerações sobre a técnica histológica de rotina

A técnica histológica representa um conjunto de procedimentos técnicos aplicados na histotecnologia como citoquímica, histoquímica, imunohistoquímica, voltados para pesquisa científica e para o diagnóstico patológico; assim como para análises especializadas incluindo-se a microscopia eletrônica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2014).

A invenção do microscópio por Johannes e Zacharias Janssen (1590) e a melhoria do mesmo com a intervenção de estudiosos como Galileu Galilei (1609), Robert Hooke (1665) e Antoni van Leeuwenhoek (1674) impulsionaram ao longo dos anos a técnica histológica até determinado momento da história, quando esse procedimento foi caracterizado como uma metodologia necessária para o diagnóstico histopatológico. Inicialmente, foi difundida entre os diversos profissionais das ciências naturais, como os botânicos e zoologistas, sendo empregada também pelos anatomistas e histologistas da época e só por volta de 1828, Rudolph Virchow, médico alemão e antropologista, utilizou a análise histopatológica como ferramenta básica e essencial em Laboratório de Histologia ou de Anatomia Patológica para elaborar as bases da Patologia Celular (MAXWELL, 1978; MICHELANY, 1981; MOLINARO, 2010).

Nos dias atuais, com a modernização dos equipamentos nos Laboratório de Histotécnica, o processamento histológico tem sido otimizado e com a adequação de protocolos existentes em função de novas metodologias tem-se buscado garantia na exequibilidade e qualidade diagnóstica das amostras processadas.

2.2.5 Métodos de histoprocessamento sem uso do xilol

A utilização do xilol na desparafinização, diafanização e montagem de preparações histológicas têm sido documentadas, juntamente com achados de toxicidade para o homem e o meio ambiente (CHATTERJEE et al., 2005; BUESA; PESHKOV 2009; CHEN et al., 2010).

Estudos relacionados com técnicas histológicas livres de xilol têm apontando o óleo mineral refinado (OMR), como um dos possíveis substituto desse solvente, na realização do processamento de rotina (BUESA, 2000; BUESA, 2009; PREMALATHA et al., 2013).

Falkeholm et al. (2001) apresentaram um método livre de xilol para confecção de cortes histológicos equivalentes aos convencionais, pontuando vantagens econômicas e ambientais. A redução de custos foi alcançada através da utilização e redestilação do isopropanol em vez de etanol, para a desidratação e consequente eliminação do xilol. Demonstrou-se com esse estudo, que os cortes histológicos de tecido mamário, intestino e pele (livres de xilol), apresentaram-se qualitativamente (74%) do mesmo aspecto daqueles convencionais para diagnóstico; todavia, o método livre de xilol atendeu até certo as expectativas, exceto por uma alteração na solução de van Gieson que produziu artefatos no momento da visualização dos tecidos histológicos.

Alguns agentes clareadores têm sido usualmente utilizados, como tolueno e benzeno que apresentam propriedades similares ao xilol e são menos danosos aos

tecidos numa exposição prolongada, contudo são extremamente tóxicos; clorofórmio, de ação lenta, custo elevado e também considerado inflamável; óleo de Cedro, recomendado para tecidos delicados, porém com pouco efeito endurecedor, age lentamente e tem custo elevado; metilbenzoato e metilsalicilato, são considerados agentes clareadores lentos e podem ser utilizados misturados (BANCROFT; GAMBLE, 2002).

A utilização de álcool isopropílico durante a desidratação substituindo o etanol permitiu excluir o tratamento com solventes intermediários de parafina (clorofórmio, xileno e benzeno) e isso reduziu o grau de compactação dos tecidos histológicos. Nesse estudo, a qualidade dos resultados obtidos foi dependente das propriedades da parafina utilizada (*paraplast*), todavia com um longo tempo de processamento e de exposição para o técnico (VIKTOROV; PROSHIN, 2003).

A diafanização (clareamento) é uma etapa muito importante na preparação de cortes histológicos, tendo como objetivo a remoção do álcool e outros desidratantes dos tecidos antes da infiltração com parafina. No estudo de Stockert et al. (2012) foi proposto que o *n*-heptano (C₇), um hidrocarboneto alifático, poderia ser um substituto para o xileno nessa etapa. Os hidrocarbonetos alifáticos foram anteriormente empregados como solventes para histopatologia e histoquímica (LILLIE; FULLMER, 1976; LYON et al., 1995). Esses solventes, também, conhecidos como "gás branco", constituíam-se de uma mistura de hidrocarbonetos, principalmente hexano-heptano, sendo relativamente baratos e não tão perigosos e tóxicos como os solventes aromáticos ou clorados. Os resultados do trabalho de Stockert revelaram que o *n*-heptano parece ser um substituto conveniente para os solventes aromáticos usuais utilizados em técnicas histológicas (STOCKERT et al., 2012).

Kunhua et al. (2012) mostraram que o óleo branco (SBO) é um substituto não-tóxico de xilol gerado através de uma mistura de 86% de óleo branco nº 2 e 14% de *n*-heptano. Os autores não detectaram diferenças nas preparações histológicas provenientes do processamento com xilol quando comparadas aquelas processadas com SBO, não havendo quaisquer evidências encolhimento celular.

A avaliação dos cortes obtidos a partir do processamento com SOB, corados com hematoxilina-eosina, revelou adequada manutenção da morfologia celular com nitidez citoplasmática e nuclear. Além disso, resultados comparáveis foram alcançados entre os tecidos processados com SBO e aqueles processados com xilol, por meio de outras colorações histoquímicas e imuno-histoquímicas (KUNHUA et al., 2012).

Um protocolo com dióxido de carbono supercrítico $sc(CO_2)$ foi desenvolvido e patenteado (WO 2005001437), mostrando ser uma forma alternativa livre de solventes para o processamento de tecidos na área da patologia (BLEUEL et al., 2012).

Estudos demonstraram que na fase supercrítica, o $sc(CO_2)$ revelou-se com propriedades físicas (tanto de gás como de líquido) caracterizando-se como um versátil “solvente” na substituição de etilacetato e diclorometano na descafeinização do café ou do hexano na extração de óleos essenciais, o que fez com que essa tecnologia fosse bastante utilizada nas indústrias farmacêuticas e alimentares (BECKEMAN, 2004; BLEUEL; VAN DER VEGET; SMITH, 2008).

Rai et al (2016) realizaram uma revisão sobre possíveis substitutos biosseguros para o xilol, enfatizando-se a toxicidade desse solvente, no sentido de minimizar a sua utilização nos Laboratórios de Histotecnologia, sem comprometer a qualidade das colorações e portanto, garantindo o diagnóstico adequado.

2.2.6 Vantagens para utilização do óleo mineral

O óleo mineral é uma mistura complexa de hidrocarbonetos parafínicos e naftênicos, com aproximadamente 36 átomos de carbono, e apresentam-se como líquidos oleosos transparentes e quimicamente inertes; portanto são tidos como medicinais, pouco volátil, de baixo custo e podem ser aplicados nos campos farmacêutico, alimentício e dos cosméticos (VIEIRA; LAPA, 2006).

O óleo mineral refinado (OMR) proposto por Premalatha et al. (2013) como substituto do xilol nas práticas histológicas, é comercialmente vendido como óleo de cabelo composto de 80% de óleo mineral e 20% de óleo de coco. Segundo os autores, o OMR, facilmente disponível, é um hidrocarboneto não perigoso, alifático incolor, inodoro, produzido a partir de destilados de petróleo (PREMALATHA et al., 2013).

O OMR em substituição ao uso do xilol apresenta algumas vantagens, como a capacidade de poder ser dissolvido completamente na parafina, possibilitando uma desparafinização mais rápida (LIN et al., 2009). De acordo com alguns pesquisadores o óleo mineral pode até mesmo ser usado na desparafinização de amostras incluídas em parafinas para testes genômicos de alta qualidade com extração de DNA (FREDRICKS; RELMAN, 1999; LIN et al., 2009).

Outra vantagem técnica do óleo mineral estaria relacionada à sua densidade, muito parecida com a gordura humana, o que promoveria a remoção da gordura dos tecidos de forma mais rápida facilitando a sua infiltração (BUESA, 2000). Devido a essa capacidade, Premalatha et al. (2013) referiram que a confecção de preparações histológicas foi mais rápida com o óleo mineral refinado (45 minutos) quando comparado com o método convencional (65 minutos).

Estudos realizados por Buesa (2000) mostraram que o óleo mineral puro ou com misturas de etanol e isopropanol tem a mesma equivalência que o xilol no processamento histológico, sendo indicado como um ótimo substituto para diafanizar os tecidos de animais e de humanos. O referido autor também mencionou que a fixação de tecidos com óleo mineral foi tão eficiente quanto aquela proporcionada pelo xilol, tornando-se preferencial em função de não causar danos ao organismo (BUESA 2009).

Em termos ambientais, há um grande ganho com o uso do OMR, pois segundo Buesa (2000), quando comparado ao xilol, não ocorreria conseqüências negativas mediante um grande derramamento para o ambiente.

O descarte do óleo mineral e suas misturas podem ser iniciados com uma filtração para retirada de partículas de parafinas que tenham ficado na mistura. O óleo pode passar por filtros de malha para eliminar particulados remanescentes e no final, obtém-se um óleo básico mineral rerefinado com as mesmas características de óleo básico virgem (SCAPIN, 2008).

Outro ponto de igual importância para o uso de óleo mineral refinado tem relação com a saúde dos histotecnologistas, que manuseiam diariamente as preparações histológicas. A tolerância máxima de exposição ao xilol é de 78 ppm (COSTA et al., 2007), não existindo limites quanto à exposição ao óleo mineral (BUESA, 2000; PREMALATHA et al., 2013). Buesa (2000), inclusive afirmou que não há necessidade de uso de equipamentos de proteção individual (EPI) por profissionais que manipulam o OMR.

Por outro lado, tem-se referido que os estudos realizados com relação à qualidade das preparações histológicas processadas com o óleo mineral, ainda são insipientes no que se refere à questão da durabilidade das mesmas (BUESA 2000). Sabe-se que através do processamento com o xilol, as preparações histológicas

apresentam durabilidade dependente das condições de armazenamento (BUESA, 2000; TEMEL et al., 2005; PREMALATHA et al., 2013).

A comparação das propriedades físico-químicas do xilol e do óleo mineral norteia algumas dessas vantagens mencionadas e podem ser visualizadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do xilol e do óleo Mineral

Propriedades	Xilol	Óleo mineral
Sinônimo	Dimetilbenzeno	Parafina líquida
Estrutura química	Hidrocarbonetos aromáticos	Hidrocarbonetos alifáticos
NFP categorias (0-4)*:		
<i>saúde</i>	2	0
<i>Fogo</i>	3	1
<i>Reatividade</i>	0	0
Limite de explosividade	100 ppm	Sem limite
Flamabilidade	inflamável	Levemente inflamável
Inguição	imediate	Não imediata
Solubilidade em água	Insolúvel (0,00003 g/100 mL)	Praticamente insolúvel em água
Solubilidade em álcool	Solúvel em álcool absoluto, éter, acetona e ésteres	Pouco solúvel em etanol, miscível em hidrocarbonetos
Densidade de massa (g/mL)	0,866 (20 a 24 °C)	0,827-0,890 Viscosidade de 110-230 mPa
Índice de refração	1,5016 (20 ± 0,5 °C)	1,468 (20 °C)
Ponto de Congelamento	-25 °C	-15 °C
Ponto de Ebulição	135-145 °C (numa atmosfera de 760 mmHg)	260-316 °C

Fonte: ANVISA - Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed., vol 1, pags. 86 e 480, 2010.

* NFP- Associação Nacional de Proteção ao fogo (Danos: 0-mínimo; 1-leve; 2-moderado; 3-sério e 4-severo).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo geral

Introduzir na técnica histológica de rotina uma metodologia livre de xilol.

2.3.2 Objetivos específicos

- Substituir o xilol pelo óleo mineral na rotina do processamento histológico.
- Reduzir o tempo do processamento histológico com o uso do óleo mineral.
- Verificar a qualidade das colorações de rotina (HE) e especiais (tricrômico de Masson, PAS e Prata) frente ao processamento com o óleo mineral.
- Avaliar critérios como clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica, segundo opiniões de três observadores (Histologistas ou Patologistas), sem conhecimento prévio do tipo de processamento empregado (com óleo mineral ou xilol).

2.4 Justificativa

Na busca por novas metodologias para melhorar a técnica histológica convencional, alguns pesquisadores investiram na exclusão do xilol, devido à alta volatilidade desse solvente e toxicidade provocada pela inalação de vapores ou mesmo pela exposição direta ao produto. Neste intuito, o presente trabalho fundamentou-se numa inovação metodológica, com a proposta de um protocolo de processamento histológico com o uso do óleo mineral em substituição ao xilol, nas etapas de diafanização e desparafinização, assegurando benefícios principalmente como redução do tempo de exequibilidade, confiabilidade diagnóstica e biossegurança pessoal e ambiental.

3 SISTEMA ANALÍTICO

3.1 Local de estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós-graduação em Patologia do Departamento de Patologia-CCS e no Laboratório de Embriotoxicidade do Departamento de Histologia e Embriologia-CB, pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

3.2 Período de referência

A pesquisa foi realizada no período de setembro de 2015 a julho de 2017.

3.3 Tipo de estudo

O estudo caracterizou-se como do tipo experimental, longitudinal, analítico e comparativo. Foram utilizando tecidos de animais, humanos e vegetais, processados com o óleo mineral ou com o xilol (técnica convencional).

3.4 Comitê de Ética

No presente projeto, a utilização de tecidos animais (ratos *Wistar*) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPE (nº. do processo: 0041/2016, **ANEXO A**). O modelo com embriões de ave foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais - CEUA/UFPE (nº. do processo: 23076.022496/2015-89 - **ANEXO B**). A

investigação de placas senis em material de necropsia humana (cérebros) foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos (Nº. CAAE: 44265315.1.0000.5208 - **ANEXO C**), segundo os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho nacional de Saúde (CNS).

3.5 Métodos de Coleta

3.5.1 Animais experimentais (ratos *Wistar*)

Foram utilizados ratos adultos machos e fêmeas (com peso de aproximadamente 250 gramas) albinos da linhagem *Wistar* (nº. total = 06 animais, 03 machos e 03 fêmeas), procedentes do Biotério de Criação José Paulino Ventura Ramos do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, onde o manejo e cuidado dos mesmos encontram-se de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guid for Care and Use of Laboratory Animals*, as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Centro de Biociências da UFPE. Os animais foram anestesiados com Cloridrato de cetamina (50 mg/Kg) associada ao Cloridrato de xilazina (5 mg/Kg), via intraperitoneal. Após constatação de arreflexia profunda, os animais foram submetidos à laparotomia mediana para retirada de órgãos (testículo, ovário, útero, intestino, fígado e baço). Os órgãos foram colocados em fixador por 24 horas (formol tamponado a 10%) e processados no Laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós-graduação em Patologia/UFPE, conforme a técnica convencional e com o uso do óleo mineral em substituição ao xilol.

3.5.2 Modelo com embrião de ave

Neste trabalho foram utilizados embriões de *Gallus gallus domesticus*, com 48 horas de desenvolvimento, com características morfológicas referentes ao estágio 12 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Os ovos foram doados pela Diretoria da G-3 Agroavícola LTDA (fazenda Santa Teresinha, município de Riacho das Almas Recife-PE) e os experimentos realizados no Laboratório de Embriotoxicidade do Departamento de Histologia e Embriologia (LE-DHE). Foram utilizados vinte ovos da raça *Cobb* nos ensaios para acompanhamento do desenvolvimento embrionário. A estocagem inicial dos ovos foi realizada em sala com temperatura controlada, até o momento de serem higienizados e incubados na chocadeira (NELIPE) à 37,5°C, por um período de 48 horas.

Os embriões foram fixados em *Bouin* e submetidos ao processamento com o óleo mineral, seguiram-se a etapa de emblocamento em parafina e a realização dos cortes histológicos seriados em micrótomo (5 µm). A análise foi realizada com o auxílio de um microscópio MOTIC (BA200), em uma magnitude 100x. As fotomicrografias dos embriões foram realizadas utilizando-se o *software Motic Image Plus 2,0ML*.

3.5.3 Amostras de tecidos humanos

Foram utilizadas algumas amostras de tecido humano provenientes de material encaminhado do Serviço de Verificação de Óbitos (S.V.O.), rotineiramente, para o Departamento de Patologia, com fins diagnósticos. Geralmente, esse processamento já é realizado com a colaboração do Laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós-

graduação de Patologia conforme normas do referido Departamento e como rotina do setor.

3.6 Processamento histológico com xilol ou óleo mineral

O óleo mineral utilizado para o processamento das amostras histológicas foi cedido pela LAPON Indústria Farmacêutica Ltda, situada na Rua Vigário Joaquim Pinto, 163, Limoeiro-PE. CEP: 55.700-000. O produto utilizado veio acompanhado de Certificado de Qualidade expedido em 11/03/2016 (**ANEXO D**).

Inicialmente, os órgãos foram fixados em formol (10%), finalizando-se o processo com a impregnação em parafina. O processamento dos órgãos constou de três etapas essenciais: pré-fixação, fixação propriamente dita e pós-fixação.

Nas etapas de pré-fixação e fixação propriamente dita, foram discriminados os solventes e líquidos necessários ao processamento dos órgãos relacionados à técnica convencional (com xilol) ou com o uso do óleo mineral. O tempo de execução foi contabilizado em cada passagem das amostras em contato com os diferentes solventes e líquidos nos diferentes processamentos. Após obtenção dos blocos de parafina com as amostras incluídas, foram realizados cortes (4 a 6 μm) e as finas fitas foram estiradas em água aquecida de banho Maria (50° C), sendo imediatamente recolhidas para lâminas de vidro previamente recobertas com a seiva da *Aloe Vera* (planta conhecida como Babosa).

Na etapa da pós-fixação foram procedidas a desparafinização, coloração e montagem dos tecidos e, também, foram discriminados os solventes, corantes e líquidos necessários ao processamento dos tecidos relacionados à técnica convencional (com o xilol) ou com o uso do óleo mineral.

3.7 Método de análise

Diferentes tipos de órgãos (animal, humano ou vegetal), independente do tipo de processamento (com xilol ou óleo mineral) foram avaliados qualitativamente. Para oferecer subsídio morfológico quantitativo, foi escolhido um conjunto de preparações histológicas (fígado, artéria, glândula adrenal, baço, intestino grosso, testículo e útero), segundo os tipos de processamentos instituídos e que foram analisadas por três observadores (histologistas), de forma independente, sem o prévio conhecimento do procedimento técnico. Os critérios utilizados para essa avaliação quantitativa foram os seguintes: clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica. Para análise estatística desses resultados quantitativos foi aplicado o teste Kappa de concordância (LANDIS; KOCH, 1977).

3.8 Geração de Patente

O referido trabalho gerou solicitação para depósito do Pedido de Patente, com entrega do Comunicado de Invenção e Termo de Sigilo (**ANEXO E**). Os detalhamentos do processo inventivo deverão ser resguardados em função do Pedido de Proteção junto a UFPE e os examinadores deverão assinar os Termos de Compromisso de Sigilo e Confidencialidade sobre as informações técnicas e quaisquer outras atividades sejam diretas ou indiretas, oriundas da referida Dissertação de Mestrado, como uma das exigências do procedimento para serem anexados ao processo em andamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na presente pesquisa, foi instituído um protocolo de processamento histológico com uso do óleo mineral ao invés do xilol, que constou de três etapas essenciais: pré-fixação, fixação propriamente dita e pós-fixação (**QUADROS 1 e 2**). Foram discriminados os solventes, corantes e líquidos necessários ao processamento dos órgãos relacionados à técnica convencional (com o xilol) ou com o uso do óleo mineral. O tempo de execução foi contabilizado em cada passagem das amostras histológicas em contato com os diferentes solventes, corantes e líquidos necessários ao andamento dos processamentos citados.

QUADRO 1

PROCESSAMENTO DE FIXAÇÃO DOS TECIDOS			
Etapa de Pré-fixação			
Xilol	<i>Tempo</i>	Óleo Mineral	<i>Tempo</i>
Formol (10%)	24hs	Formol (10%)	24hs
Água corrente	30 seg	Água corrente	30 seg

Etapa de Fixação propriamente dita			
Xilol	<i>Tempo</i>	Óleo Mineral	<i>Tempo</i>
Álcool 70%	24hs	Álcool 70%	24hs
Álcool 80%	1h	Álcool 80%	30min (estufa 50°C)
Álcool 90%	1h	Álcool 90%	30min (estufa 50°C)
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	30min (estufa 50°C)
Álcool 100%	1h	Álcool 100%	30min (estufa 50°C)
Álcool-xilol	1h	Óleo mineral I	30min (estufa 50°C)
Xilol I	1h	Óleo mineral II	30min (estufa 50°C)
Xilol II	1h	Parafina I	30min (estufa 60°C)
Parafina I	1h	Parafina II	30min (estufa 60°C)
Parafina II	1h	-----	-----
Tempo total:	57hs e 30seg	Tempo total:	52hs e 30seg

Fonte: Silvania Paz (a autora).

QUADRO 2

DESPARAFINIZAÇÃO/COLORAÇÃO/MONTAGEM			
Etapa de Pós-Fixação			
Xilol	<i>Tempo</i>	Óleo Mineral	<i>Tempo</i>
Desparafinização		Desparafinização	
Xilol I	5 min	Óleo mineral na estufa	10 min
Xilol II	5 min	Secagem	10 seg
Álcool-xilol (03 banhos)	30 seg	Álcool 100% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 100%	5 min	Álcool 90% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 90%	5 min	Álcool 80% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 80%	5 min	Álcool 70% (03 banhos)	30 seg (estufa 50°C)
Álcool 70%	5 min	Água corrente	30 seg
Água corrente	1 min	-----	-----
Coloração		Coloração	
Hematoxilina	2 min	Hematoxilina	120 seg
Água corrente	1 min	Água corrente	30 seg
Eosina	1 min	Eosina	60 seg
Água corrente	1 min	Água corrente	30 seg
Montagem		Montagem	
Álcool 70%	5 min	Álcool 70%	30 seg
Álcool 80%	5 min	Álcool 80%	30 seg
Álcool 90%	5 min	Álcool 90%	30 seg
Álcool 100%	5 min	Álcool 100%	30 seg
Álcool-Xilol	1 min	Secagem	60 seg
Xilol I	5 min	Cobertura com Entellan®	-----
Xilol II	5 min	-----	-----
Cobertura com Entellan®		-----	-----
Tempo total	67 min e 30 seg	Tempo total	19,66 min

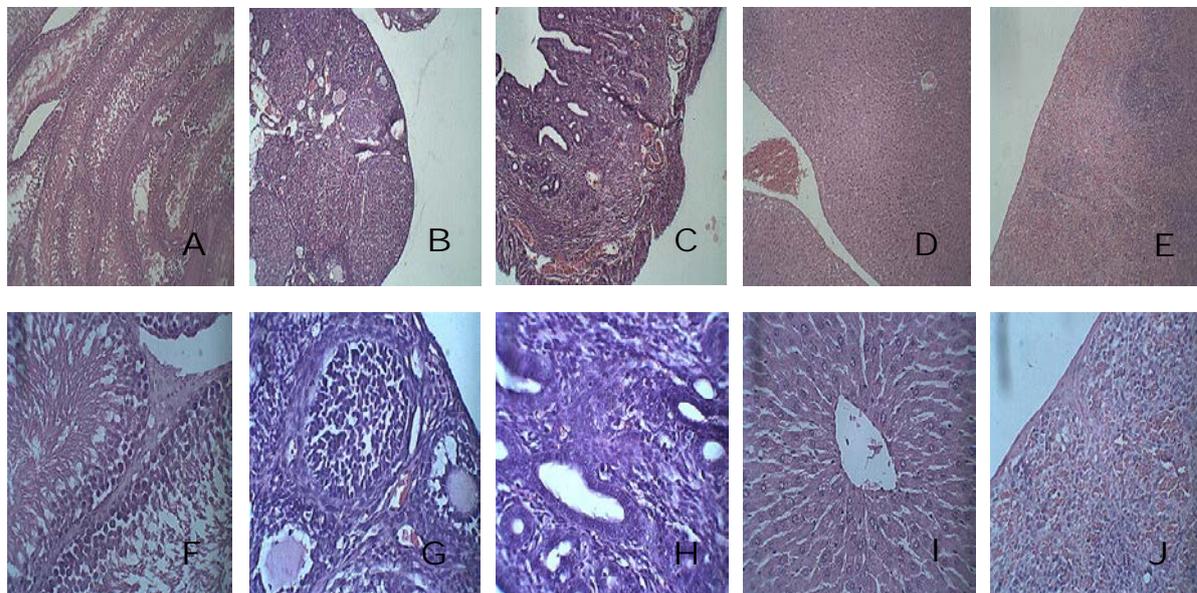
Fonte: Silvania Paz (a autora).

Nas etapas de fixação e pós-fixação (QUADRO 1), somando-se o tempo de cada passagem nas substâncias foi contabilizado um total de 52 horas e 30 segundos para o processamento histológico com uso do óleo mineral quando comparado ao método convencional com o xilol (57 horas e 30 segundos).

Na etapa da pós-fixação (**QUADRO 2**), o processamento histológico com uso do óleo mineral foi realizado num tempo extremamente rápido (19 minutos e 66 segundos) quando comparado com o método convencional com uso do xilol (67 minutos e 30 segundos). Nossos resultados superam aqueles encontrados por Falkeholm et al (2001) que referiram um mínimo de 28 minutos para o método livre de xilol e 80 minutos para o processamento convencional. Esses mesmos autores relataram que a qualidade das preparações avaliadas (tecido mamário, intestino e pele) variou em função das colorações utilizadas (H&E e PAS apresentaram-se equivalentes, e van Gienson não foi eficiente).

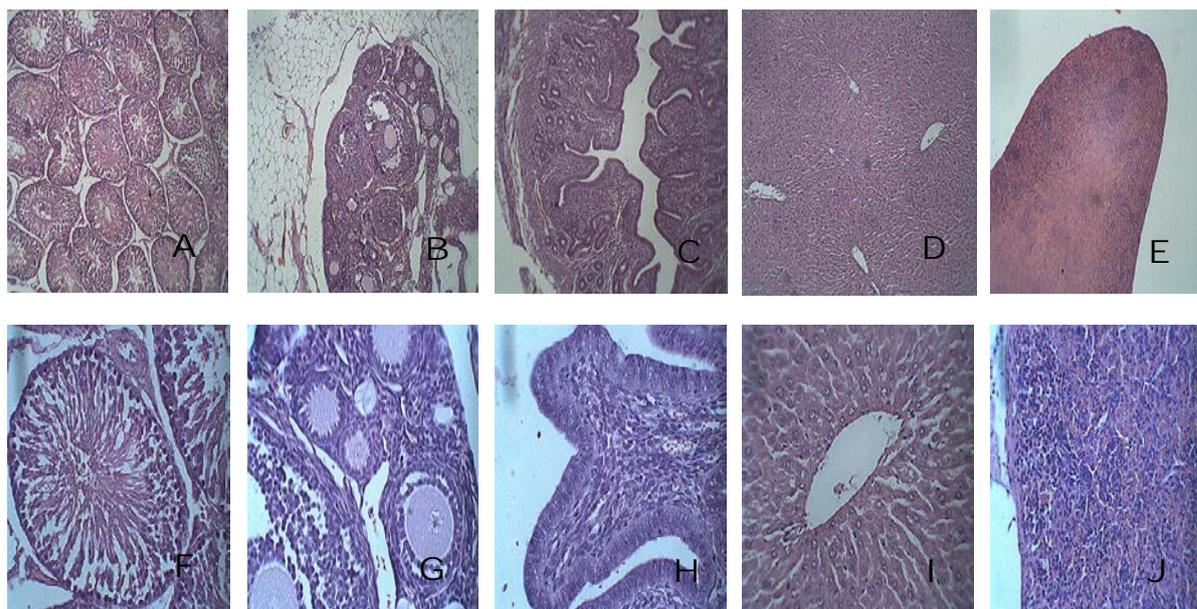
No estudo em questão, diferentes órgãos (testículo, ovário, útero, fígado e baço) obtidos de ratos saudáveis (*Wistar*) foram analisados, qualitativamente, com relação ao processamento utilizando-se o xilol (**Figura 4**) e com o uso de óleo mineral (**Figura 5**). Nossos resultados corroboram com o estudo de Rai et al (2016) que realizaram uma revisão sobre possíveis substitutos biosseguros para o xilol, enfatizando-se a toxicidade desse solvente, no sentido de minimizar a sua utilização nos Laboratórios de Histotecnologia, sem comprometer a qualidade das colorações e portanto, garantindo a qualidade diagnóstica.

Figura 4 - Fotomicrografias de diferentes órgãos obtidos de ratos saudáveis (*Wistar*) processados por meio da técnica convencional com xilol e corados com H&E. **A e F**) testículo, **B e G**) ovário, **C e H**) útero, **D e I**) fígado e **E e J**) baço. Magnitude das imagens: **A, B, C, D E** (100x) e **F, G, H, I, J** (400x).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

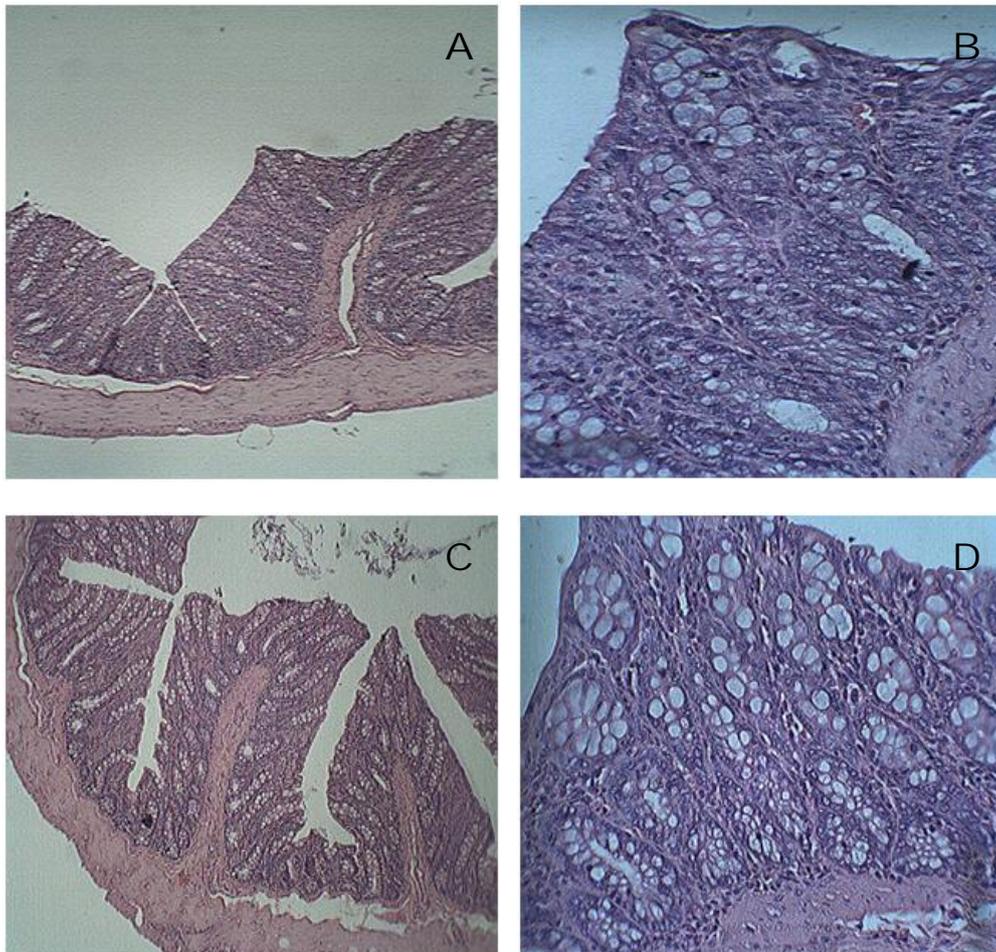
Figura 5 - Fotomicrografias de diferentes órgãos obtidos de ratos saudáveis (*Wistar*) processados por meio da técnica com óleo mineral e corados com H&E. **A e F**) testículo, **B e G**) ovário, **C e H**) útero, **D e I**) fígado e **E e J**) baço. Magnitude das imagens: **A, B, C, D E** (100x) e **F, G, H, I, J** (400x).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

Preparações do intestino grosso de ratos saudáveis (*Wistar*) foram obtidas através de processamentos com o xilol (**Figura 6 A e B**) e com o uso do óleo mineral (**Figura 6 C e D**). As células caliciformes na mucosa do intestino grosso foram observadas com forma mais detalhada e sem compactação das estruturas vizinhas, possivelmente devido à ação do óleo mineral em promover maior plasticidade e adequado estiramento dos finos cortes na água morna do banho Maria.

Figura 6 - Fotomicrografias do intestino grosso de ratos saudáveis (*Wistar*) processado por meio das técnicas: convencional com o xilol (**A e B**) e com o óleo mineral (**C e D**); ambos os procedimentos corados com H&E. Magnitude das imagens: **A e C** (100x) e **B e D** (400x), representam ampliações da região da mucosa intestinal.



Fonte: Silvania Paz (a autora).

No sentido de oferecer subsídio morfológico quantitativo, alguns órgãos de ratos *Wistar* saudáveis (fígado, artéria, glândula adrenal, baço, intestino grosso, testículo e útero) foram processados com óleo mineral ou xilol. As preparações histológicas desses órgãos foram analisadas por três observadores (Histologistas), sem conhecimento prévio do tipo de processamento empregado. Os critérios analisados foram clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica (**APÊNDICE A**). Todos os critérios avaliados pelos três observadores, independente do tipo de processamento histológico, apresentaram acurácia geral de 100%, com exceção da uniformidade da coloração e presença de artefatos (**TABELA 2**).

TABELA 2 - Resultados do questionário de três observadores com relação aos critérios de uniformidade da coloração e presença de artefatos, após observação de órgãos (fígado, artéria, glândula adrenal, baço, intestino grosso, testículo e útero) processados pela técnica convencional (xilol) ou com o uso do óleo mineral.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO	PROCESSAMENTO	OBSERVADORES			ACURÁCIA GERAL
		A	B	C	
Uniformidade da coloração	Óleo	6/7 (85,71%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	95,24%
	Xilol	6/7 (85,71%)	7/7 (100%)	6/7 (85,71%)	90,47%
Presença de artefatos	Óleo	2/7 (28,14%)	1/7 (14,28%)	1/7 (14,28%)	18,90%
	Xilol	5/7 (71,42%)	3/7 (42,86%)	2/7 (28,57%)	47,61%

Nota: A acurácia ou precisão (número de respostas corretas/número de perguntas tentadas) foram expressas em números absolutos e percentagem. A exatidão geral das observações foi expressa como percentagem.

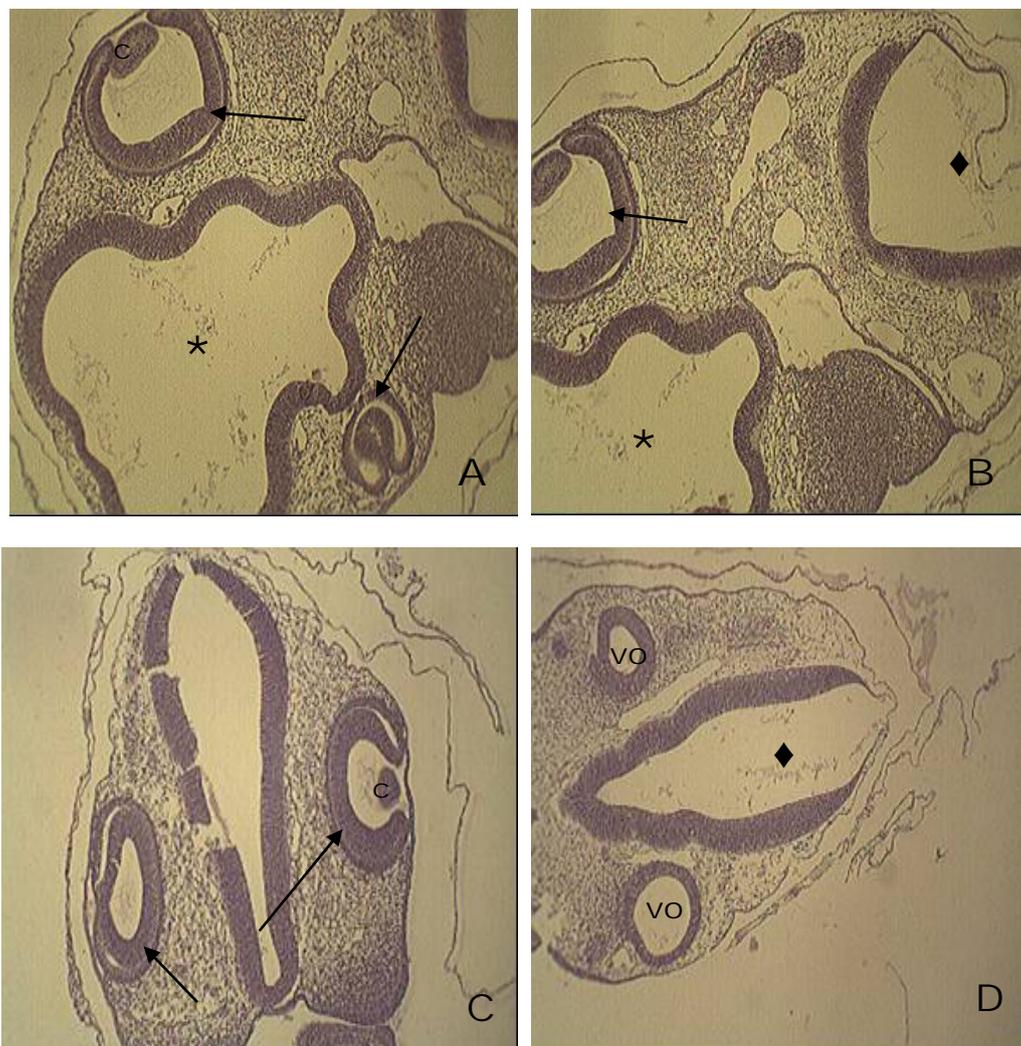
A partir da análise independente realizada por dois observadores (A e B, B e C, A e C), constatou-se concordância significativa em relação aos critérios (uniformidade da coloração e presença de artefatos), com K_w (teste Kappa) na faixa de 0,42 a 0,85 e percentagens de 18,90 a 95,24% (**TABELA 2**).

Conforme os critérios avaliados na **tabela 2**, com o uso do óleo mineral foram obtidas as seguintes concordâncias: A com B ($K= 0,71$, Boa); B com C ($K= 0,85$, excelente) e A com C ($K= 0,84$, excelente); e com o uso do xilol foram obtidas as seguintes concordâncias: A com B ($K= 0,42$, Boa); B com C ($K= 0,57$, boa) e A com C ($K= 0,57$, boa). Segundo Landis e Koch (1977), a concordância com valores de K menor que 0,40 é considerada fraca, maior que 0,75 é excelente e entre 0,40 e 0,75, deve ser definida como boa ou intermediária.

Independente dos resultados percentuais da acurácia geral para os dois critérios avaliados, a concordância entre os observadores foi satisfatória e os métodos de processamento histológico (com o xilol ou o óleo mineral) foram considerados eficientes.

Tecidos de embriões de ave (*Gallus gallus domesticus*) foram processados com a técnica histológica de rotina ou com o uso do óleo mineral. Independente do processamento histológico utilizado foi possível avaliar o desenvolvimento das estruturas e regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (**Figura 7**).

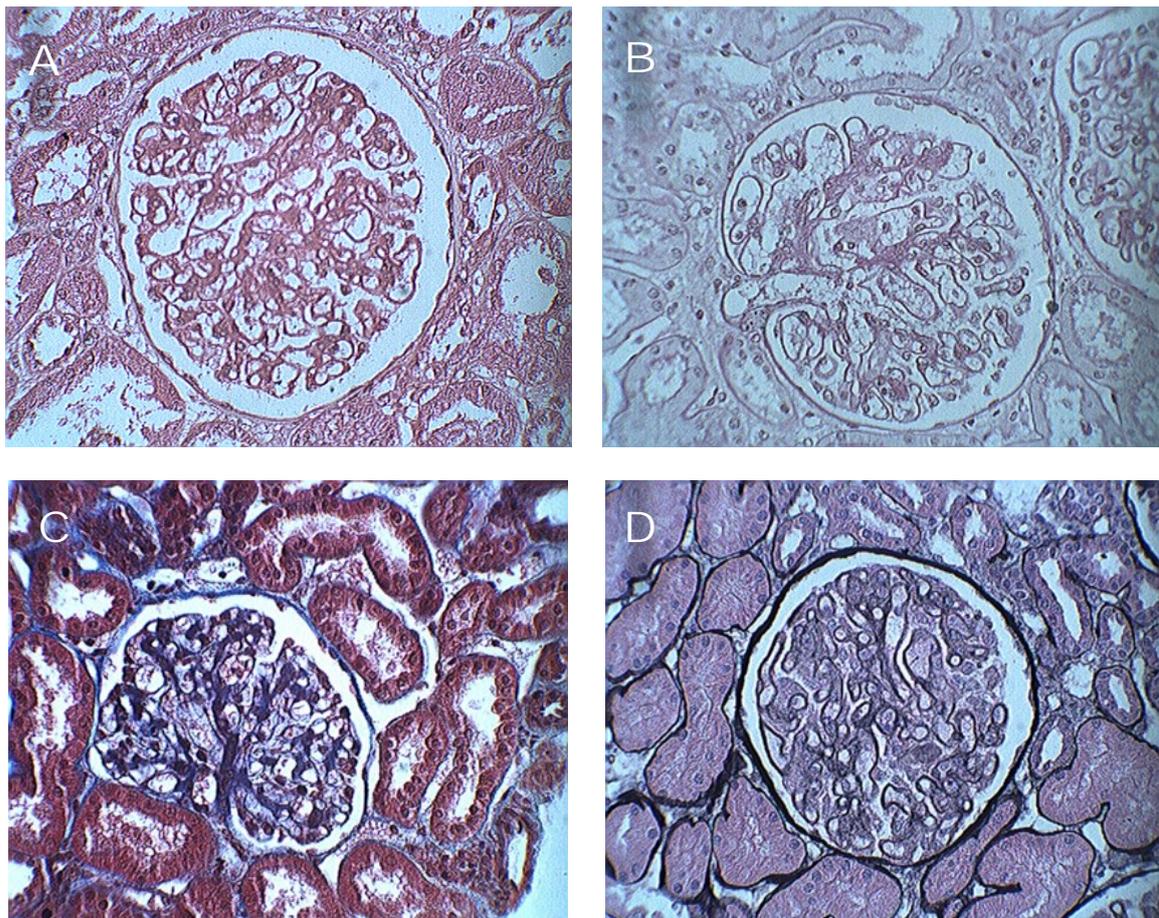
Figura 7 - Fotomicrografias de embriões de *Gallus gallus domesticus* processados na presença de xilol (**A** e **B**) e com óleo mineral (**C** e **D**). Observam-se nos cortes seriados transversais formações de estruturas e regiões do SNC como telencéfalo (asterisco), formação de cálice óptico (seta longa) e rombencéfalo (losângulo), formação de cristalino (c), vesícula ótica (vo). Preparações coradas com Hematoxilina: aumento de: 100x (**A**, **B**, **C** e **D**).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

No intuito de avaliarmos a durabilidade de materiais processados com o óleo mineral, realizamos a checagem de preparações de biópsias renais humanas confeccionadas há mais de vinte anos (**Figura 8**) e as mesmas se apresentaram inalteradas e estáveis quanto à preservação dos cortes e qualidade das colorações. Os resultados apresentados discordam daqueles apresentados por Buesa (2000) que menciona ser incipiente a durabilidade de preparações histológicas processadas com o óleo mineral.

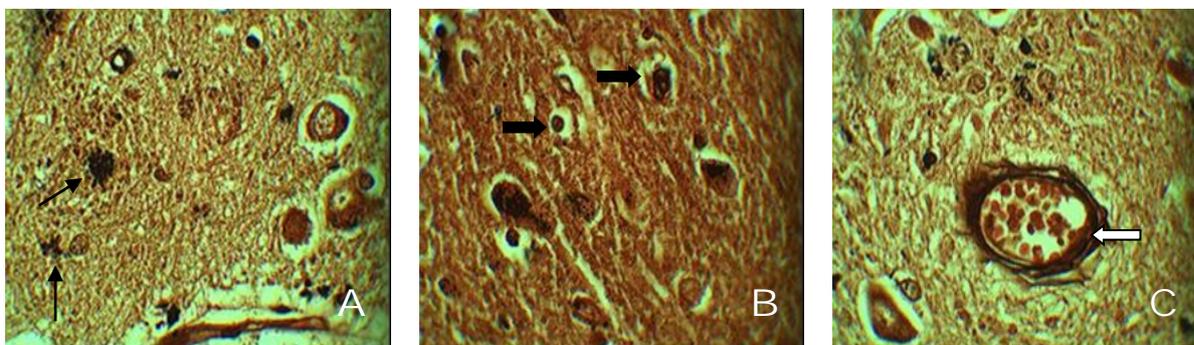
Figura 8 - Fotomicrografias de biópsias renais humanas processadas com óleo mineral, e coradas com diferentes colorações: H&E (**A**), P.A.S. (**B**); tricrômico de Masson (**C**) e Prata PAZ (**D**). Magnitude de todas as imagens (400x).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

Paz et al., em 2016 processaram com óleo mineral necropsias de encéfalo humano corados com uma adaptação da coloração de prata (prata PAZ) para identificação de placas senis. O tecido encefálico processado pelo método da prata PAZ (**Figura 9 A, B e C**) mostraram-se com satisfatória qualidade para diagnóstico e o tempo de realização desse processamento foi reduzido em aproximadamente 40 minutos quando comparado à técnica adaptada da prata com xilol (em torno de 3 horas). Na literatura tem-se relatado que protocolos convencionais, em função do uso de óxido de prata amoniacal, demandaram um longo tempo para sua realização (em torno de 16 horas, método de Bielschowsky), especialmente devido às lavagens sequenciais (FERNANDEZ, 1958).

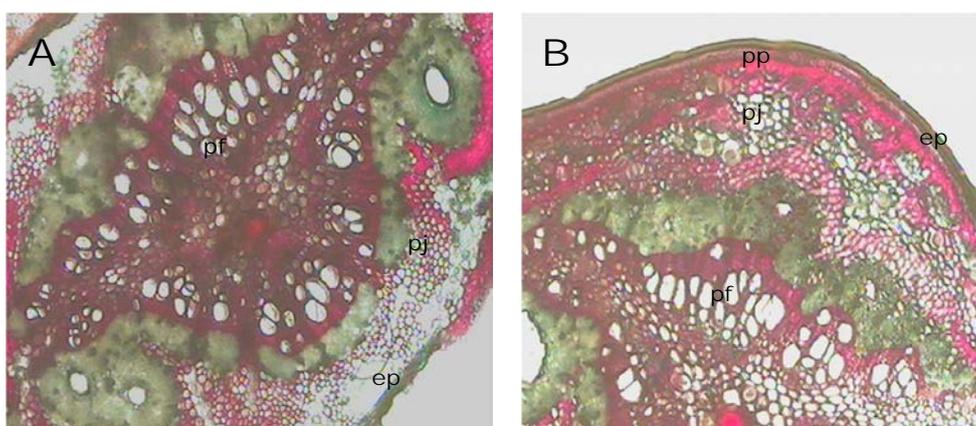
Figura 9 - Fotomicrografias de necropsias de cérebro humano processadas com o óleo mineral e coradas com a prata PAZ: **A**) notam-se placas amilóides (setas finas), **B**) degeneração granulo-vacuolar (setas pretas cheias) e **C**) angiopatia amilóide (deposição amilóide na camada média do vaso (seta branca cheia). Magnitude de todas as imagens (1000x).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

Os ensaios foram ampliados com a utilização de material vegetal (folhas de mangueira) processado com o xilol ou com o uso do óleo mineral (**Figura 10**). As estruturas do mesofilo da folha de mangueira (*Mangifera indica* L.) foram visualizadas sem apresentar diferenças em função do tipo de processamento realizado (com xilol ou óleo mineral).

Figura 10 - Fotomicrografias de material vegetal (folha de mangueira) processado com xilol (**A**) e com o óleo mineral (**B**). Destacam-se estruturas do mesofilo da planta em corte transversal: epiderme (**ep**); parênquima paliçádico (**pp**); parênquima esponjoso (**pj**); parênquima fundamental (**pf**). Preparações coradas com Hematoxilina. Aumento: 100x (**A** e **B**).



Fonte: Silvania Paz (a autora).

Todos os tecidos processados com uso o óleo mineral (animal, humano ou vegetal) apresentaram excelente qualidade, na macroscopia (pela naturalidade) como na microscopia (pela nitidez, integridade das estruturas, entre outros critérios avaliados). Neste intere, algumas vantagens do processamento histológico com uso do óleo mineral ao invés do xilol, também foram pontuadas (**QUADRO 3**).

QUADRO 3 - VANTAGENS DO ÓLEO MINERAL EM RELAÇÃO AO XILOL		
Parâmetros avaliados	XILOL	ÓLEO MINERAL
Risco para saúde	Perigoso	Sem risco
Equipamento de proteção pessoal	Necessário	Não requer
Custo	Alto	Baixo
Exequibilidade experimental	Lenta	Rápida
Necessidade de álcool no procedimento de coloração	Necessário	Requer quantidade reduzida
Qualidade da coloração	Boa	Boa ou Melhor

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O óleo mineral foi capaz de substituir o xilol quando utilizado no processamento de tecidos humanos, animais ou vegetais.
- O processamento de amostras histológicas com o uso do óleo mineral ao invés do xilol demonstrou ser rápido e seguro.
- Independente das colorações utilizadas (rotina ou especiais), a qualidade das preparações histológicas obtidas através do processamento com o óleo mineral possibilitou a identificação de estruturas com credibilidade diagnóstica.
- A concordância entre três observadores independentes (Histologistas) com relação a determinados critérios (clareza e uniformidade da coloração, nitidez, adequação da coloração nuclear e citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas e adequação para avaliação histológica) confirmou quantitativamente eficiência do processamento histológico com uso do óleo mineral.

Diante do exposto, acreditamos que a inclusão da nova metodologia com o uso do óleo mineral nos Laboratórios de Histopatologia, além de acelerar o processamento das amostras histológicas com qualidade diagnóstica, solidifica a garantia da biossegurança pessoal e ambiental. Estudos com relação à incorporação de colas naturais para a montagem das preparações histológicas estão em andamento e deverá fortalecer a questão da substituição por completa do xilol no referido procedimento.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **ABNT NBR 14725-1**: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ. Rio de Janeiro: ABNT, jul 2001.

ANKLE, M.; MADHURI, A.R.; PRIYA, S.J. Study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: an experimental study. **Journal of Oral Maxillofacial Pathology**, v. 15, n. 2, p. 161-167, 2015.

ANVISA - **Farmacopéia Brasileira**, 5ª Ed., vol 1, pp. 86 - 480, 2010

BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 5ª. edition. Churchill Livingstone Publication, pp. 63-108, 2002.

BECKMAN, E. Supercritical and near critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **Journal Supercritical Fluids**, v. 28, p. 121-191, 2004.

BLEUEL, E.P.; VAN DER VEGET, B.; SMITH, P. Xylene free tissue processing: a novel approach using supercritical carbon dioxide. **Histopathology**, v. 53, p.116, 2008.

BLEUEL, E.P.; ROEBERS, T.P.; SCHULTING, E.; DEN DUNNEN, W. F. Solvent-free tissue processing using supercritical carbon dioxide. **Histopathology**, v.61, p. 1198–1208, 2012.

BUESA, J.R. **Histology Review**. Science & Bus Institute, North Miami Beach, 1997, pp. 141.

BUESA, R. J. Mineral oil: the best xylene substitute for tissue processing yet? **The Journal Histotechnology**, v. 23, n. 2, p. 143-148, 2000.

BUESA, R.J. Microwave-assisted tissue processing: real impact on histology workflow. **Annals of Diagnostic Pathology**, v.11, p. 206-211, 2007.

BUESA, R.J.; PERSKOV, M.V. Histology without xylene. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 13, p. 246-256, 2009.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego (MET) – Secretaria de Inspeção do Trabalho (SIT). Norma Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde (NR 32). Aprovada pela portaria N°. 485 de 11 de novembro de 2005. D.O.U 16 de novembro de 2005.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego (MET) – Riscos Biológicos – Guia Técnico. Os riscos biológicos no âmbito da Norma regulamentadora N°. 32. MET 2006.

CASTRO, T.M. et al. Biossegurança e biosseguridade do manuseio do xilol em laboratórios de anatomia patológica. **Brasília Médica**, v. 47, n. 1, p. 100-107, 2010.

CETESB. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Sistema integrado de gestão para prevenção, recuperação e resposta aos acidentes com produtos químicos: Manual de Orientação. Marcos Antônio José Lainha, colaboração Edson Haddad, 1992, 45 pp.

CHATTERJEE et al. The effect of occlusive and unocclusive exposure to xylene and benzene on skin irritation and molecular responses in hairless rats. **Archives of toxicology**, v. 79, p. 294-301, 2009.

CHEN, C.Y.; HE, T.; MAO, X.L.; FRIIS, T. E.; QIN, R. H.; JIAN, Y. T. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. **Biotechnology & Histochemistry**, v. 85, p. 231 - 240, 2010.

COSTA, K.N.S.; PINHEIRO, I.O.; CALAZANS, G.T.; NASCIMENTO, M.S. Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 32, n, 16, p. 50- 56, 2007a.

COSTA, K. N. S., et al. Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 32, p. 50-56, 2007b.

COSTA, T.F.; FELLI, V.E.A. Periculosidade dos Produtos e Resíduos Químicos da Atenção Hospitalar. **Cogitare Enfermagem**, v. 17, n. 2, p.322-30, 2012.

FALKEHOLM, L. Going green: Using water, not xylene (Letter). **Laboratory Medicine**, v. 27, p.638, 1996.

FALKEHOLM, L.; GRANT, C. A; MAGNUSSON, A.; MÖLLER, E. Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 1213–1221, 2001.

FERNANDEZ, J. Modificação do método de Bielschowsky para cortes em parafina. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, p. 29-40, 1958.

FREDRICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Paraffin removal from tissue sections for digestion and PCR analysis. **Biotechniques**, v.26, p.198 – 200, 1999.

FREITAS, C. M.; PORTO, M. F. S.; MOREIRA, J. C. Segurança química, saúde e ambiente: perspectivas para a governança no contexto brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 249-256, 2002.

FUENTE et al. A Hearing Loss Associated With Xylene Exposure in a Laboratory Worker. **Journal American Academic Audiology**, v. 23, n. 10, p. 824-830, 2012.

GAMBERALE, F.; ANNWALL, G.; HULTENGREN, M. Exposure to xylene and ethylbenzene. III. Effects on central nervous functions. **Scandinavian Journal of Work Environmental Health**, v. 4, p. 204-211, 1978.

GARDNER, R. A statistical analysis of data on exposure to xylene at selected workplaces in the U.K. **Annals of Occupational Hygiene**, v.40, n.4, p. 411-22, 1996.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.

HASS, U.; LUND, S.P.; SIMONSEN, K.; FRIES, A.S. Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats. **Neurotoxicology Teratology**, v.17, p. 341-349, 1995.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans. Press release n°.153. **International Agency for Research on Cancer**: Lyon, 2006

JACOBSON, G.A.; McLEAN, S. Biological monitoring of low level occupational xylene exposure and the role of recent exposure. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 47, n. 4, p. 331-336, 2003.

JANASIK, B.; JAKUBOWSKI, M.; JAIOWIECKI, P. Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure. **International Archives of Occupational Environment Health**, v. 81, p. 443-449, 2008.

JANASIK, B.; *et al.* Unmetabolized VOCs in urine as biomarkers of low level occupational exposure. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 23, n. 1, p. 21 – 26, 2010.

JAPP, F. R. Kekulé memorial lecture. *Journal of the Chemical Society*, v.73, p.97-108, 1898, *apud* ROTHENBERG, A. Creative Cognitive Processes in Kekule's discovery of the structure of the Benzene Molecule. **The American Journal of Psychology**, v. 108, n. 3, p. 419-438, 1995.

JUNQUEIRA C. L.; CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 12^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KANDAYALA, R.; RAGHAVENDRA, S.P.; RAJASEHARAN, S.T. Xylene: Na overview of its health hazards and preventive measures. **JOMFP**, v. 14, n. 1, p. 1-5, 2010.

KAVCAR, P.; ODABASI, M.; KITIS, M.; INAL, F.; SOFUOGLU, S. C. Occurrence, oral exposure and risk assessment of volatile organic compounds in drinking water for Izmir. **Water Research**, v. 40, n. 17, p. 3219-30, 2006.

KERETETSE, G. S. et al. DNA damage and repair detected by the comet assay in lymphocytes of African petrol attendants: a pilot study. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 52, n. 7, p. 653-62, 2008.

KUNHUA, W.; CHUMING, F.; TAO, L.; YANMEI, Y.; XIN, Y. XIAOMING, Z.; *et al.* A novel non-toxic xylene substitute (SBO) for histology. **African journal of Traditional Complementary Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 43-49, 2012.

KUM, C. et al. Effect of xylene and formaldehyde inhalations on oxidative stress in adult developing rats livers. **Experimental animals**, v. 56, p. 35-42, 2007.

LANDIS, J.R.; KOCK, G.G. The measurement of observer agreement for contrasts among multinomial populations. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1997.

LANGMAN, J. M. Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. **Pathology**, v. 26, n. 3, p. 301-309, 1994.

LILLIE R. D.; FULLMER, H. M. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 4th ed. New York: McGraw Hill, pp 526-527, 1976.

LIN, J. KENNEDY, S.H.; SVAROVSKY, T.; ROGERS J.; KEMNITZ, J.W.; XU, A. et al. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. **Annals of Biochemistry**, v. 395, p. 265-267, 2009.

LYON, H.; HOLM, I.; PRENTØ, P.; BALSLEV, E. Non-hazardous organic solvents in the paraffin-embedding technique: a rational approach. Aliphatic monoesters for clearing and dewaxing: butyldecanoate. **Histochemistry Cell Biology**, v.103, p. 263-269, 1995.

MAXWELL, M. H. Safer substitutes for xylene and propylene oxide in histology, haematology, and electron microscopy. **Medicine Laboratory Science**, v.35, p. 401-403, 1978.

MERCK. **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. New Jersey: Whitehouse Station, p. 1722-1723, 1996.

METGUD, R., et al. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue section. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 88, n. 5, p. 235-241, 2013.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 3^a. ed. São Paulo: Michelany, 1981.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

MORALES A.R.; NASSIRI, M.; KANHOUSH, R.; VINCEK, V.; NADJI, M. Experience with an Automated Microwave-Assisted Rapid Tissue Processing Method Validation of Histologic Quality and Impact on the Timeliness of Diagnostic Surgical Pathology. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, p. 528-536, 2004.

PALMER, W. G. **Valency Classical and Modern**. 2nd edn. Cambridge: Univ. Press: p.10, 1959 *apud* WOTIZ, J. H.; RUDOFISKY, S. Herr professor doktor Kekulé: wy dreams? In: WOTIZ, J. H. (ed). *The Kekulé Riddle. A Challenge for Chemists and Psychologists*. New York: Glenview Press, 1993, p. 247-274.

PERUZZO, F.M.; CANTO, E. L. do. **Química Orgânica**. v. 3, 3^a.ed. São Paulo, Moderna. 2003.

PREMALATHA, B.R.; PATIL, S.; RAO, R.S.; INDU, M. Mineral oil – a biofriendly substitute for xylene in deparaffinization; a novel method. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 14, p. 281-286, 2013.

RAI, R. YADAV, R.; BHARDWAJ, A. Biosafe substitutes to xylene: Review. **International Journal of Information Research and Review**, v. 3, n. 6, p. 2529-2532, 2016.

RAMAMOORTH, A.; RAVI, S.; JEDDY, N.; THAGAVELU, R.; JANARDHANAN, S. Natural alternatives for chemicals used in histopathology Lab-A Literature Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 11, p. EE01-EE04, 2016.

RASMUSSEN, B.; NORRING HJORT, K.; MELLERUP, I.; SETHER, G.; CHRISTENSEN, N. Vegetable oils instead of xylene in tissue processing. **APMIS**, v. 100, p 827-831, 1992.

REID, K. J.; YOUNG, F. J. Are trichloroethane-based substitutes safer than xylene? **Med. Lab. Sci.** v.38, p.145 – 149, 1981.

RITCHIE, G.; STILL, K.; ROSSI, J. R. D.; BEKKEDAL, M.; BOBB, A.; ARFSTEN, D. Biological and health effects of exposure to kerosene-based jet fuels and performance additives. **Journal of Toxicological Environment Health B critical Review**, v. 6, n.4, p. 357-451, 2003.

ROTHENBERG, A. Creative Cognitive Processes in Kekule's discovery of the structure of the Benzene Molecule. **The American Journal of Psychology**, v. 108, n. 3, p. 419-438, 1995.

SCAPIN, M. A. **Estudo de remoção de elementos inorgânicos e degradação de compostos orgânicos por radiação gama em óleos lubrificantes usados**. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANDIKC, M. et al. Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in lung tissue. **Toxicological an Industrial Health**, v. 24, p. 455-461, 2009.

STOCKERT, J.C.; LÓPEZ-ARIAS, B.; DEL CASTILLO, P.; ROMERO, A.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Replacing xylene with *n*-heptane for paraffin embedding **Biotechnic & Histochemistry**, v. 87, n. 7, p. 464-467, 2012.

TAMBELLINI, A. T.; CAMARA, V. M. A temática saúde e ambiente no processo de desenvolvimento do campo da saúde coletiva: aspectos históricos, conceituais e metodológicos. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 47-59, 1998.

TEMEL, S. G; NOYAN, S; CAVUSOGLU, I; KAHVECI, Z. A simple and rapid microwave-assisted hematoxylin and eosin staining method using 1,1,1 trichloroethane as a de-waxing and a clearing agent. **Biotechnology & Histochemistry**, v. 80, p. 123–132, 2005.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Toxicological Review of Xylenes** (CASRN 1330-20-7). National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2003. Available from: <http://www.epa.gov/IRIS/Toxreviews/0270-tr.pdf>. Access 17 nov 2016.

VIEIRA, V. M.; LAPA, R. Riscos em laboratório: prevenção e controle. **Cadernos de Estudos Avançados**, v. 3, n. 1, p. 25-43, 2006.

VIKTOROV, I. V; PROSHIN, S. S. Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, embedding into paraffin, and processing of paraffin sections. **Bull. Experimental Biology and Medicine**, v.136, p. 105-106, 2003.

XELLEGATI, R.; ROBAZZI, M. L. C. C.; MARZIALE, M. H. P.; HAAS, V. J. Chemical occupational risks identified by nurses in a hospital environment. **Revisão Latino-americana de Enfermagem**, v. 14, n. 2, p. 214-9, 2006.

XING, M.; DU, Y.; WANG, X.; NIU, L.; CHEN, X. A simplified paraffin embedding method for small botanical samples. **Biotechnology & Histochemistry**, v.85, p. 241-246, 2010.

WANG B. L.; *et al.* Unmetabolized VOCs in urine as biomarkers of low level occupational exposure indoor environments. **Journal of Occupational Health**, v. 49, p. 104-110, 2007.

APÊNDICE A – Critérios para a avaliação das preparações histológicas de diferentes órgãos (fígado, artéria, glândula adrenal, baço, intestino grosso, testículo e útero), realizada por três histologistas (A, B e C), sem o conhecimento prévio do tipo de processamento (com uso do óleo mineral ou xilol).

PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS	Processamento (TIPOS)	CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DAS PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS																							
		Clareza da coloração			Uniformidade da coloração			Nitidez da coloração			Adequação da coloração nuclear			Adequação da coloração citoplasmática			Presença de artefatos			Integridade das estruturas			Adequação para avaliação histológica		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Fígado	Óleo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Artéria	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Glândula adrenal	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Baço	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Intestino	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Testículo	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Útero	Óleo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Xilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

NOTA: Os critérios foram avaliados segundo a presença (+) ou ausência (-) de concordância de opinião dos observadores A, B e C com relação aos parâmetros considerados (clareza da coloração, uniformidade da coloração, nitidez da coloração, adequação da coloração citoplasmática, presença de artefatos, integridade das estruturas, adequação para avaliação histológica).

ANEXO A - Aprovação: Comitê de Ética no uso de Animais-CEUA/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 23 de novembro de 2016.

Ofício nº 110/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Paloma Lys de Medeiros**
Departamento de Histologia e Embriologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0041/2016

Certificamos que a proposta intitulada “Metodologia inovadora sem uso de xilol para a técnica histológica de rotina”, registrada com o nº 0041/2016, sob a responsabilidade de Prof.ª Paloma Lys de Medeiros - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 23/11/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 20/10/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos <i>Wistar</i> albinos
Nº de animais	06
Peso/Idade	250g/adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE

Atenciosamente,

ANEXO B - Aprovação: Comitê de Ética no uso de Animais-CEUA/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 31 de julho de 2015

Ofício nº 73/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.^a Eliete Cavalcante da Silva
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.022496/2015-89

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização Morfológica de Embriões de Gallus gallus domesticus L., expostos a produtos naturais e sintéticos bioativos com ênfase no desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardiovascular**".

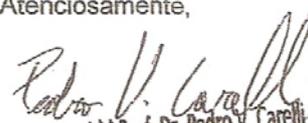
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

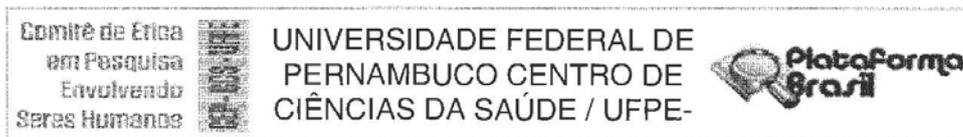
Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério comercial localizado em moreno é (ovos incubados): Animais; aves; Linhagem; Gallus gallus domesticus; Idade; serão embrião com 72 horas; O projeto vai usar 800 ovos em três anos.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO C - Aprovação: Comitê de Ética-Pesquisa com seres Humanos/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DE PLACAS E EMARANHADOS NA DOENÇA DE ALZHEIMER ATRAVÉS DA HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Pesquisador: Lidier Roberta Moraes Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44265315.1.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.100.327

Data da Relatoria: 03/06/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação em Patologia para realização de Mestrado em Patologia pelo CCS/UFPE. Trata-se de um estudo comparativo de placas e emaranhados na doença de Alzheimer através da histologia e imunohistoquímica do tipo observacional e analítico transversal. O estudo será realizado no laboratório do departamento de Pós Graduação em Patologia (POSPAT) da UFPE em conjunto com o Serviço de Verificação de Óbito (SVO) da UFPE. O estudo será composto por todos os blocos parafinados de tecido cerebral (hipocampo) de indivíduos com diagnóstico de Doença de Alzheimer e indivíduos não portadores. Os quais foram obtidos, identificados e arquivados pelo Profº Dr. Roberto José Vieira de Melo do Departamento de Patologia da UFPE após as necropsias realizadas desde de 2000 até 2014.

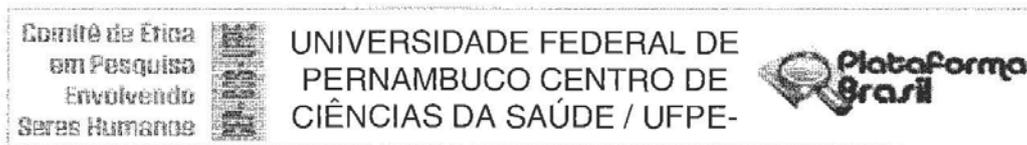
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares em cortes histológicos de hipocampus de portadores de Doença de Alzheimer avaliando aspectos clínicos, sócio-demográficos, histológicos e imunohistoquímico.

Objetivos Secundários:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.100.327

Em cortes histológicos de hipocampo de indivíduos portadores de Doença de Alzheimer e de indivíduos não portadores:

- Verificar dentre os métodos de coloração utilizados qual o melhor para identificação e quantificação de placas senis e emaranhados neurofibrilares na histologia;
- Identificar e quantificar o número de placas senis e emaranhado neurofibrilares através da imunohistoquímica;
- Traçar o perfil clínico, sócio-demográficos dos indivíduos cujos hipocampos foram analisados;
- Correlacionar o número médio de placas senis e emaranhados neurofibrilares, observados através da histologia e imunohistoquímica e o perfil do indivíduo;
- Estimar uma escala numérica de quantificação das placas senis e emaranhados neurofibrilares obtidas pelos métodos de coloração em comparação com a imunohistoquímica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores envolvidos declaram que não há risco para a pesquisa, pois a análise será baseada em dados e amostras de arquivos. Além disso, declaram que os riscos são relacionados a extravios de material coletado e quebra de sigilo, porém nos comprometemos a manter o sigilo de todas as informações que serão coletadas por meio do termo de confidencialidade dos dados.

Benefícios:

O estudo tem como benefício a obtenção de dados relacionados ao melhor método de avaliação neuropatológica de tecido cerebral na Doença de Alzheimer. Esses resultados permitirão que futuramente possam ser eleitos a melhor coloração para identificar as placas senis e os emaranhados neurofibrilares e assim evitados os subdiagnósticos, além de trazer conhecimento para toda comunidade científica.

Os resultados do estudo poderão ser publicados, porém o nome dos indivíduos e sua identidade não serão revelados, de forma que ele não poderá ser identificado, mantendo-se sua identidade em sigilo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando o grande número de indivíduos que podem desenvolver doenças neurodegenerativas causadoras de demências como a DA, através da realização desta pesquisa será possível identificar dentre alguns métodos de coloração utilizados para o diagnóstico de DA, qual o mais eficiente e confiável para observar as placas senis e os emaranhados neurofibrilares,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.100.327

além de correlacionar os achados histológicos obtidos por esta melhor técnica com as características clínicas e sócio-demográficas. Os resultados também contribuirão para diminuir o número de diagnósticos falso – negativos ou subdiagnóstico de DA. O trabalho está bem escrito, com uma boa bibliografia e dentro das normas necessárias para sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a- Carta de anuência - o documento foi devidamente apresentada.
- b- Folha de rosto – o documento foi devidamente apresentado.
- c- Autorização para uso dos dados – O documento foi devidamente apresentado.
- d- Termo de confidencialidade – o documento foi devidamente apresentado.

Recomendações:

Verificar e corrigir o ano inicial dos prontuários que serão usados na pesquisa; se será a partir de 2000 ou 2008.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendencia

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

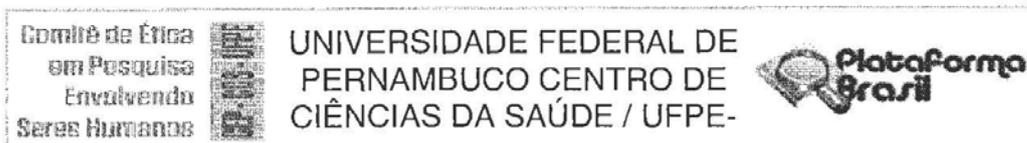
O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.100.327

Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 10 de Junho de 2015

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO D - Certificado de qualidade do Óleo Mineral


CERTIFICADO DE QUALIDADE

EMPRESA: LAPON QUIMICA E NATURAL LTDA
PRODUTO: OLEO MINERAL USP
NR NOTA FISCAL: 321.008 **DANFE:** 293.909
DATA FABRICAÇÃO: 08/01/2016 **VALIDADE:** 01/2019
NR LOTE: 21817 **QUANTIDADE:** 800,00
DATA: 11/03/2016

CARACTERÍSTICAS	ESPECIFICAÇÕES	MINIMO	MAXIMO	RESULTADOS
VISCOSIDADE 40°C cSt		10,8000	13,6000	11,9400
VISCOSIDADE,SUS 100 F		65,0000	75,0000	69,6000
GRAVIDADE 60 °F		32,1000	37,5000	34
GRAVIDADE ESPECIFICA, 60/60F		0,8370	0,8650	0,8546
GRAVIDADE ESPECIFICA (25° C)		0,8330	0,8610	0,8502
PONTO DE FLASH,COC,F		325,0000	400,0000	375,0000
COR SAYBOLT		30,0000		30,0000
INDICE DE REFRAÇÃO N25/D		1,4400	1,4800	1,4657
SUBSTANCIAS CARBONIZAVEIS	PASSA TESTE			0,0000
ACIDEZ	PASSA TESTE			CONFORME
ODOR,USP/NF	PASSA TESTE			CONFORME
FDA 21 CFR 172.878	PASSA TESTE			CONFORME
LIMITES DE HIDROCARBONETO AROMATICO	PASSA TESTE			CONFORME
LIMITES DE COMPOSTO SULFURICO	PASSA TESTE			CONFORME
IDENTIFICAÇÃO A - IR	PASSA TESTE			CONFORME
PONTO FLASH °C		162,0000	205,0000	191,0000
PARAFINA SOLIDA	PASSA TESTE			CONFORME
GRAVIDADE ESPECIFICA 20/20 °C		0,8350	0,8630	0,8526

OBSERVAÇÃO:

Laudo emitido eletronicamente, não necessita de assinatura

Mauricio Fuin - Resp.Tecnico CRQ 04230019 - 4a Região
 Rua João Tibiriça, 1262 - Fone (011) 2133-6600 - Cep: 05077-000 - São Paulo - SP

Nota Importante: Prezado cliente, gentileza analisar a especificação contida neste certificado de análise e nos contactar em 15 dias caso encontre divergência com a sua especificação.
 Na ausência do contato neste prazo será considerado a aprovação de nossa especificação

ANEXO E - Depósito do Pedido de Patente- DINE/UFPE



POSITIVA
DIRETORIA DE INOVAÇÃO

Universidade Federal de Pernambuco
Diretoria de Inovação

COMPROVANTE DE RECEBIMENTO DE DOCUMENTOS

Declaro para os devidos fins que esta diretoria recebeu às 12:15h de hoje, dia 20/07/2017, Comunicado de Invenção e Termo de Sigilo, da solicitação para depósito do Pedido de Patente de título: "Protocolo de redução do tempo de processamento histológico com uso de óleo mineral ao invés do xilol".

Para:

- estudo por esta diretoria;
- busca prévia;
- análise e emissão de parecer de patenteabilidade;
- depósito dos documentos para Pedido de Patente de Invenção.

A presente solicitação pertence a um grupo tendo como inventor(a) vinculado(a) à UFPE Silvania Tavares Paz, Portador do RG: 849.548 SSP/PB e CPF: 467.208.554-68, nascido em Itambé-PE, estado civil: divorciada. A referida é Técnico de Laboratório Área da UFPE, do Departamento de Patologia, do Centro Ciências da Saúde. Os outros membros do Grupo, co-inventores da tecnologia são: Paloma Lys de Medeiros.

Recife, 20 de julho de 2017.

Atenciosamente,

Carolina Borba
Assistente em Administração
SIAPE: 2156155
UFPE