

# Substituição da formalina neutra a 10% por agave na fixação de material biológico em histologia

Beatriz Almeida<sup>1</sup>, Joana Silva<sup>1</sup>, Mariana Maria<sup>1</sup>, Gilda Cunha<sup>1,2</sup>, Paula Mendonça<sup>2,3</sup>, Carina Ladeira<sup>2,4,5\*</sup>  
1. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal; estesl@estesl.ipl.pt.  
2.H&TRC- Health & Technology Research Center, ESTeSL - Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, 1990-096 Lisbon, Portugal.  
3.Centro de Investigação em Modelação e Otimização de Sistemas Multifuncionais, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.  
4.NOVA National School of Public Health, Public Health Research Centre, Universidade NOVA de Lisboa, Lisbon, Portugal.  
5.Comprehensive Health Research Center (CHRC), Lisbon, Portugal.  
\* Correspondência: carina.ladeira@estesl.ipl.pt

III CONGRESSO  
BioMedLab  
ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS LABORATORIAIS

## Introdução

A fixação de tecidos biológicos é essencial para preservar a estrutura celular ao evitar a autólise.<sup>1</sup> O formaldeído, comumente usado sob a forma de formalina (solução aquosa de 37-40% de formaldeído), é o mais usado, por ter baixo custo e grande poder de penetração nos tecidos, com artefactos de retração reduzidos, no entanto apresenta riscos para a saúde humana e ambiente, devido à sua toxicidade e potencial carcinogénico.<sup>2, 3-6</sup>

O mel, demonstrou ser uma alternativa eficaz, agindo de forma semelhante à formalina. Este possui um possível mecanismo de ação em que a frutose reduz o pH e forma pontes aldeído com os grupos amina das proteínas.<sup>7-10</sup>

### Objetivo

Dado que as propriedades do mel e agave são semelhantes, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do agave como fixador biológico, comparando os seus efeitos com os da formalina neutra tamponada a 10% (FNT a 10%) na preservação das estruturas histomorfológicas.<sup>11,12</sup>

## Métodos

### Preparação das soluções fixadoras

Soluções de agave a 10% e 20% (m/v) em água destilada, com base em estudos que sugerem o mel como fixador biológico. A FNT a 10% usada pertence à empresa DiaPath®, Bergamo, Itália.

### Amostras biológicas e fixação

Fragmentos de coração, fígado e rim de porco doméstico (*Sus domesticus*), distribuídos entre as três soluções fixadoras. A fixação ocorreu por 24h à temperatura ambiente.

### Processamento e análise histológica

Os cortes histológicos (3 µm) foram corados com hematoxilina-eosina. A avaliação dos cortes histológicos foi feita por dois avaliadores independentes segundo 4 parâmetros: Membrana Celular (MC), Detalhe Nuclear (DN), Qualidade de Coloração (QC) e Morfologia Tecidual (MT), aos que atribuíram pontuações de 0 a 3. A pontuação final (PF) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$PF = (MC \times 2) + (DN \times 2) + (QC \times 1) + (MT \times 3)$$

As PF foram convertidas numa escala de 0-100 e os dados foram analisados estatisticamente (software IBM SPSS Statistics versão 29.0.2.0), recorrendo a médias e desvios padrão.

## RESULTADOS

### Soluções fixadoras

Tabela 1- Estatística descritiva com respetivas médias e desvios padrão das diferentes soluções fixadoras em estudo.

Estatística descritiva				
Solução fixadora		n	Média	Desvio padrão
Agave a 10%	Membrana Celular		1,83	0,90
	Detalhe Nuclear		1,90	0,54
	Qualidade da Coloração		2,27	0,42
	Morfologia Tecidual		1,93	0,42
	Pontuação final		1,53	3,81
	Pontuação final (0-100)		64,73	15,90
	n (válido completo)		15	
Agave a 20%	Membrana Celular		1,78	0,42
	Detalhe Nuclear		1,97	0,44
	Qualidade da Coloração		2,23	0,37
	Morfologia Tecidual		2,00	0,33
	Pontuação final		15,70	2,02
	Pontuação final (0-100)		65,42	8,40
	n (válido completo)		15	
Formalina Neutra Tamponada a 10%	Membrana Celular		2,20	0,49
	Detalhe Nuclear		2,37	0,23
	Qualidade da Coloração		2,30	0,32
	Morfologia Tecidual		2,10	0,28
	Pontuação final		17,73	1,69
	Pontuação final (0-100)		73,90	7,04
	n (válido completo)		15	

Capacidade de fixação (ordem de eficácia): FNT a 10% > agave a 20% > agave a 10%. Todas as soluções fixadoras foram capazes de preservar os tecidos, com resultados próximos entre si. O tempo de isquémia a frio pode ter influenciado os resultados e deve ser controlado em estudos futuros.<sup>10, 13-15</sup>

### Amostras biológicas

Tabela 2- Estatística descritiva com respetivas médias e desvios padrão das amostras biológicas em estudo.

Estatística descritiva				
Amostras biológicas		n	Média	Desvio padrão
Coração	Membrana Celular		2,33	0,41
	Detalhe Nuclear		2,20	0,32
	Qualidade da Coloração		2,40	0,21
	Morfologia Tecidual		2,07	0,37
	Pontuação final		17,67	1,58
	Pontuação final (0-100)		73,62	6,57
	n (válido completo)		15	
Fígado	Membrana Celular		2,03	0,64
	Detalhe Nuclear		2,10	0,54
	Qualidade da Coloração		2,40	0,21
	Morfologia Tecidual		2,07	0,42
	Pontuação final		16,87	2,98
	Pontuação final (0-100)		70,28	12,41
	n (válido completo)		15	
Rim	Membrana Celular		1,43	0,56
	Detalhe Nuclear		1,93	0,50
	Qualidade da Coloração		2,00	0,46
	Morfologia Tecidual		1,90	0,21
	Pontuação final		14,43	2,69
	Pontuação final (0-100)		60,14	11,22
	n (válido completo)		15	

A capacidade de fixação, de acordo com o órgão, foi na seguinte ordem: coração > fígado > rim. As diferenças estruturais e metabólicas dos órgãos podem ter influenciado significativamente os resultados.<sup>1, 16-22</sup>

### Aspetos microscópicos das amostras biológicas-Pontuações finais superiores

#### Rim

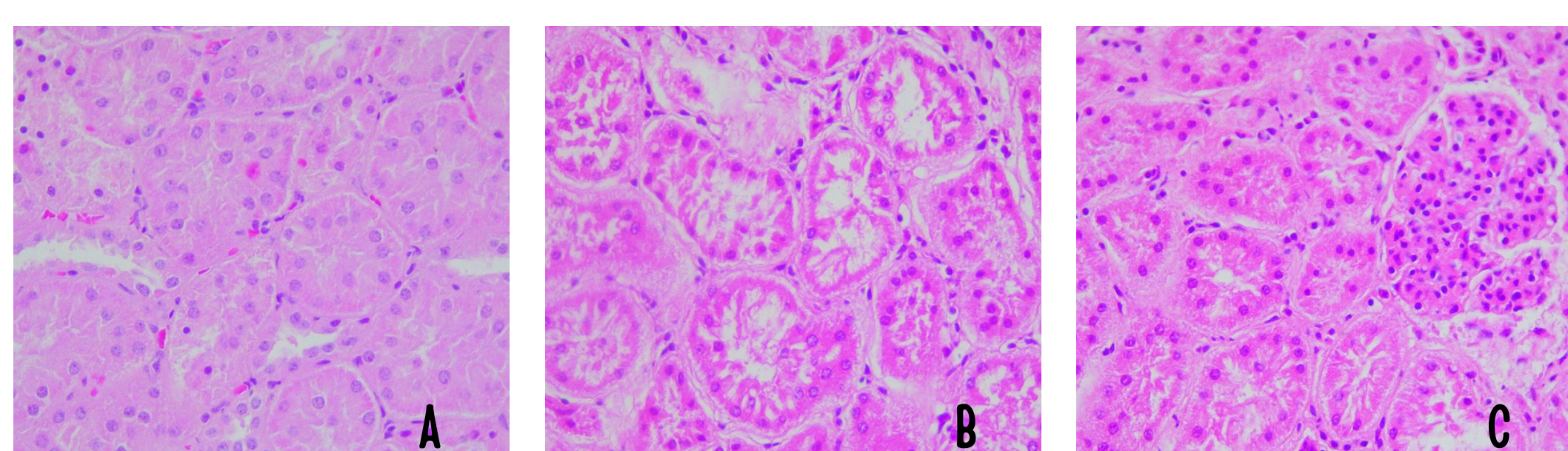


Figura 1- Cortes histológicos sob ampliação 400x. A- FNT a 10%; B- agave a 10%; C- agave a 20%.

#### Coração

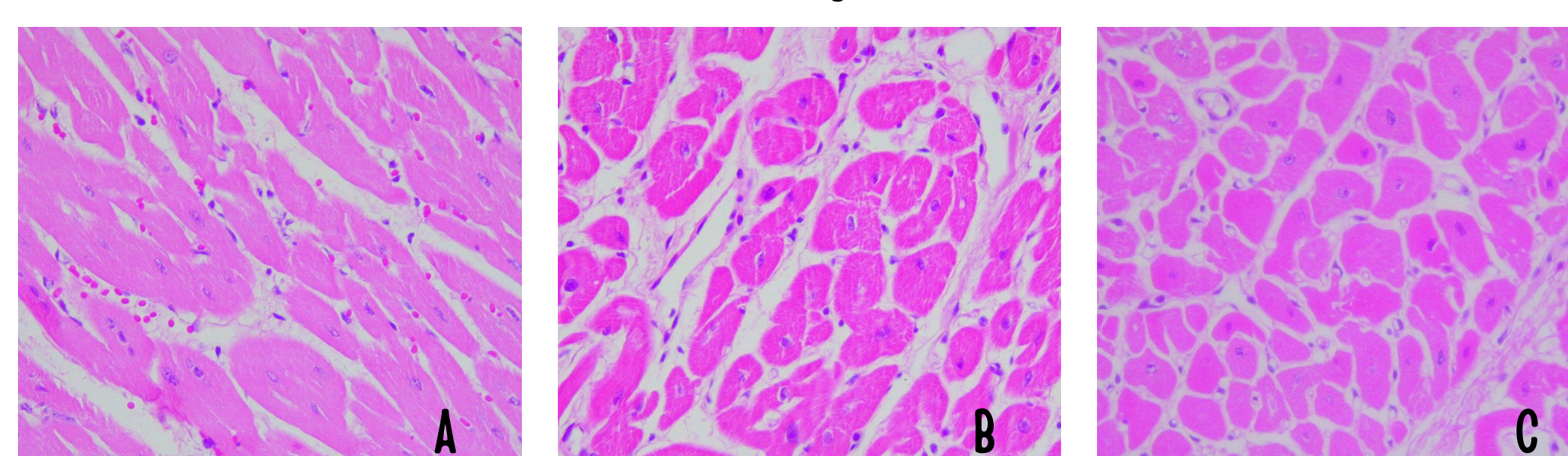


Figura 2- Cortes histológicos sob ampliação 400x. A- FNT a 10%; B- agave a 10%; C- agave a 20%.

#### Fígado

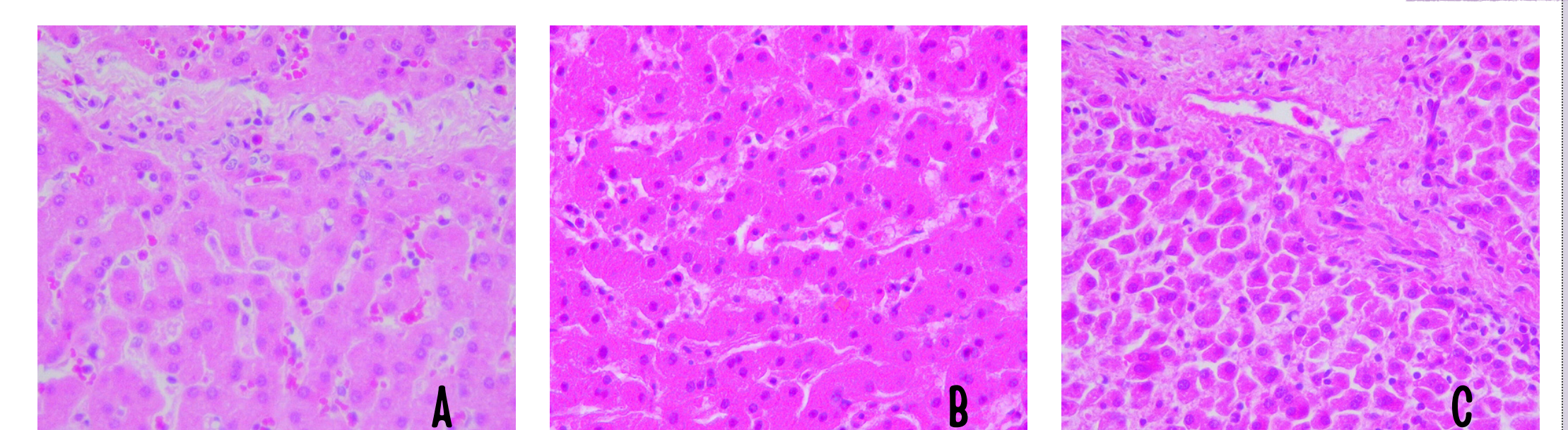


Figura 3- Cortes histológicos sob ampliação 400x. A- FNT a 10%; B- agave a 10%; C- agave a 20%.

## CONCLUSÃO E INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A FNT a 10% foi a solução mais eficaz e consistente, com melhores resultados em CC e DN. Das soluções de agave, a de 20% demonstrou maior eficácia e menor variabilidade em relação à de 10%.

Entre os órgãos analisados, o coração apresentou a melhor preservação histomorfológica, enquanto o fígado teve desempenho superior ao rim. Contudo, o tempo de isquémia a frio não foi controlado, podendo ter impactado os resultados. Os três órgãos usados apresentaram diferentes padrões de resposta aos fixadores, refletindo as características únicas de cada tecido.

Investigações futuras devem incluir maior número e diversidade de amostras, explorar a concentração ideal e avaliar a estabilidade do agave como fixador a longo prazo. Deve-se também avaliar a sua compatibilidade com técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas de forma a garantir que o agave seja uma alternativa viável e confiável à formalina.

Apesar de ambas as soluções de agave terem apresentado resultados inferiores aos da FNT a 10%, o seu desempenho foi notavelmente bom e promissor, sugerindo que as soluções de agave, especialmente a de 20%, podem ser consideradas alternativas viáveis com potencial para melhoria e otimização futura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

