

COLORAÇÃO À BASE DE CORANTES NATURAIS ALTERNATIVOS: A COLORAÇÃO PELOS MÉTODOS DE GRAM E ZIEHL-NEELSEN

Maria Cristina Gomes de Oliveira, Ana Júlia Neftali Ramos, Maria Luiza Dantas da Silva, Daniela Silva Santos, Marco Aurelio Mendonça Novaes.

Colégio Técnico "Antônio Teixeira Fernandes", Rua Paraibuna, 78. Jardim São Dimas- 12245-020 - São José dos Campos-SP, Brasil, ma.crhristina@gmail.com, neftalianajulia@gmail.com, silvamaría3195@gmail.com, danielas@univap.br, marconovaes@univap.br.

Resumo

A coloração de Gram é uma técnica amplamente utilizada na microbiologia para a diferenciação de bactérias, os corantes sintéticos comuns usados nesse método apresentam impactos negativos ao meio ambiente devido à sua toxicidade e dificuldade de degradação. Este estudo propõe uma alternativa sustentável utilizando corantes naturais à base de beterraba e repolho roxo para substituir os corantes tradicionais. Os corantes foram extraídos e aplicados no processo de coloração de Gram. Os resultados mostraram que o corante de repolho roxo foi eficaz na diferenciação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando potencial como substituto aos corantes convencionais. No entanto o corante de beterraba não apresentou eficácia, falhando em proporcionar a distinção necessária entre os diferentes tipos de bactérias. Conclui-se que o corante natural de repolho roxo é uma alternativa viável, enquanto o de beterraba necessita de maior investigação e aprimoramento.

Palavras-chave: Coloração. Ziehl-Neelsen. Gram. Microbiologia. Bactérias.

Curso: Técnico em Análises Clínicas.

Introdução.

A coloração de Gram é um procedimento fundamental nos laboratórios de microbiologia, desempenhando um papel crucial no diagnóstico de doenças bacterianas. Sua simplicidade, rapidez e eficácia proporcionam uma taxa de acerto de aproximadamente 80% em diagnósticos emergenciais em nível local (Martins *et al.*, 2001; Freitas; Picoli, 2007). Destaca-se como o principal e mais prevalente método bacterioscópico na prática atual da bacteriologia, visando categorizar os microrganismos conforme suas propriedades tintoriais, dimensões, configuração e organização celular (Martins *et al.*, 2001; Reis; Santos, 2016). Essa técnica tem como principal função corar bactérias e classificá-las a partir de sua cor, permitindo a análise morfológica das bactérias por meio de agentes químicos, pois a mesma baseia-se na diferença de composição química da parede celular das bactérias e no efeito do álcool sobre essa estrutura (Reis; Santos, 2016; Laborclin, 2018).

Paralelamente, o método de coloração de Ziehl-Neelsen é amplamente utilizado devido à sua eficácia na detecção rápida de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) e outras micobacterioses. Essa técnica envolve a preparação de esfregaços a partir de amostras de fezes, mucosas intestinais ou gânglios linfáticos, que são corados com uma mistura de fucsina e ácido fênico em alta temperatura; A parede celular dos bacilos, que apresenta alta concentração de ácidos micólicos, confere-lhes propriedades hidrofóbicas, tornando-os impermeáveis à coloração convencional, no entanto, durante a coloração de Ziehl-Neelsen, a combinação de fucsina e ácido fênico, associada à alta temperatura, facilita a penetração na parede celular bacteriana (Morales, 2023; Trento, 2018; Coelho *et al.*, 2008). Esse método permite distinguir entre bactérias álcool-ácido-resistentes e não álcool-ácido-resistentes, após a aplicação do corante vermelho (fucsina fenicada), as bactérias álcool-ácido-resistentes retêm a cor vermelha, enquanto as não álcool-ácido-resistentes são coradas posteriormente com o contra corante azul de metileno, adquirindo uma coloração azul, essa diferenciação é essencial para identificar especificamente as micobactérias, facilitando a visualização microscópica e contribuindo para um diagnóstico preciso e rápido de doenças causadas por esses patógenos (Tortora, 2000; Trento, 2018). Durante a realização das tradicionais colorações supracitadas, é sabido que ela tem enorme capacidade de poluição ambiental, uma vez que, na maioria dos locais onde são realizadas, não há logística reversa que visa a neutralização dos corantes pelo fabricante. Sendo os corantes oriundos da realização das colorações despejados

diretamente na pia e tendo como destino a pia do laboratório e como consequência a contaminação do esgoto. (Carl Roth, 2020).

O presente artigo desenvolveu-se a partir de uma vasta pesquisa em artigos científicos a respeito do tema para uma maior compreensão das colorações e suas funções e importância no diagnóstico e, por conseguinte realizou-se testes práticos para comprovar sua eficiência ou não.

Frente ao exposto o artigo propõe a substituição de alguns corantes químicos tóxicos ao meio ambiente e ao usuário, uma vez que a fucsina fenicada como exemplo tem potencial cancerígeno. (Merck, 2017).

Metodologia

A metodologia deste estudo foi por meio de pesquisas qualitativas bibliográficas com utilização de artigos científicos, sites médicos e dissertações, com ênfase na coloração de Gram e Ziehl Neelsen.

Para o primeiro teste, escolheu-se adaptar a coloração de Gram. O corante azul de metileno foi substituído por um corante extraído do repolho e a fucsina fenicada foi trocada pelo extrato obtido da beterraba. Vegetais de preços R\$ 7,99 (sete reais e noventa e nove centavos) e R\$3,50 (três reais e cinquenta centavos), respectivamente, ambos comprados no comércio local intitulado “Rei das Frutas”.

A beterraba foi descascada, e o repolho roxo macerado, foram triturados com um almofariz e pistilo. Os extratos resultantes foram acondicionados em frascos âmbar para preservar sua coloração. Após a obtenção dos corantes a serem substituídos, realizou-se a coloração de Gram utilizando o kit da empresa Laborclin – Produtos para Laboratórios Ltda no Laboratório do Colégio Técnico Univap – Curso de Análises Clínicas e Veterinárias. As amostras biológicas utilizadas foram previamente coradas pelo método de Gram e classificadas da seguinte forma: Bactéria 01 – *Staphylococcus epidermis*, Gram positiva, que aparecem em azul devido à resistência ao álcool, à espessura da parede celular e à contração dos poros na presença de lugol. Bactéria 02 – *Serratia marcescens*, Gram negativa, que aparecem em vermelho/rosa à descoloração pelo álcool e coloração pela fucsina.

Realizou-se o procedimento da técnica de Coloração de Gram, primeiramente há a preparação do esfregaço das Bactérias 01 e 02. Secou-se o esfregaço à temperatura ambiente e, passou-se rapidamente os esfregaços por uma chama no bico de Bunsen para garantir a completa fixação do material a ser analisado. Colocou-se as lâminas secas em suporte de coloração, aplicou-se corante cristal violeta em todo o esfregaço e deixou-se agir por 01 minuto. Deve-se enxaguar a lâmina com um fluxo de água corrente e cobrir com Lugol, que tem como finalidade fixar o corante azul, deixando agir por 01 minuto. Logo, realizou-se nova lavagem com água e se descolorou com álcool-acetona deixando agir por 30 segundos. O álcool dissolverá a membrana de lipídeos das bactérias Gram negativas, removendo o complexo formado por Lugol e o 1º corante (Azul de metileno) e descolorindo essas bactérias. Por conseguinte, realizou-se mais uma lavagem com água e aplicou-se o 2º corante - Fucsina, deixando agir por 30 segundos. Por fim, enxaguou-se e deixou secar à temperatura ambiente. Assim, deve-se adicionar uma gota de óleo de imersão na lâmina e levar a objetiva de 100x do microscópio onde realizou-se a observação.

Resultados

A técnica original é baseada na coloração diferenciada entre gram-negativas e gram-positivas, que devem apresentar bactérias coradas de roxo ou rosa, respectivamente. Para isso, utiliza-se cristal violeta, iodo, álcool e fucsina. Já a técnica desenvolvida nessa pesquisa, visa seguir os mesmos passos do original, entretanto, o corante da beterraba, que substituiu a fucsina fenicada, não apresentou eficácia pois não obteve a capacidade de realizar a ligação a camada lipídica das devidas bactérias. O extrato do repolho roxo se mostrou favorável aos resultados, visto que substitui o azul de metileno nas técnicas de Gram, por conseguir corar a estrutura celular de bactérias gram-positivas, comprovando a eficácia desse extrato desenvolvido.

Figura 1- Extrato de beterraba e repolho roxo sendo condicionados no frasco de âmbar.



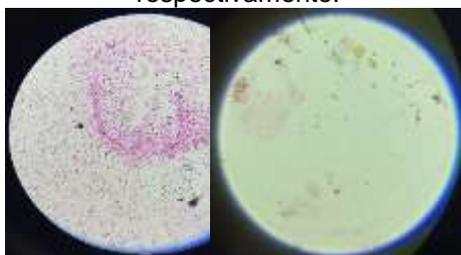
Fonte: As autoras, 2024.

Figura 2- Lâminas sendo coradas com os corantes naturais.



Fonte: As autoras, 2024.

Figura 3- Bactéria corada com a coloração de Gram, bactéria corada com o extrato do repolho, respectivamente.



Fonte: As autoras, 2024.

Discussão

Concorda-se com os autores ao destacarem a importância das técnicas de coloração de Gram e Ziehl- Neelsen no diagnóstico microbiológico, destacando a eficácia e relevância nos laboratórios. Contudo, é fundamental reforçar a grave preocupação ambiental associada há não logística de neutralização dos corantes pelos fabricantes. O despejo direto desses produtos no sistema de esgoto, sem um tratamento apropriado, representa um sério risco de poluição ambiental.

Além disso, os corantes os quais são utilizados, tem grande potencial de contaminar os recursos hídricos impactando diretamente de maneira negativa a biodiversidade e colocando em risco a saúde humana. Ainda que alguns dos corantes, como a fucsina fenicada, possuem riscos cancerígenos, agravando mais os perigos associados a manipulação e descarte inadequado. Portanto, é crucial que medidas sejam adotadas, a fim de minimizar os riscos tanto para o ecossistema quanto para a saúde humana de maneira responsável e sustentável.

Conclusão

Embora o corante azul do repolho roxo apresentar resolutividade frente ao objetivo, o corante da beterraba, se comportou de maneira ineficaz, concluído que o estudo oferece eficácia em parte e mais estudos devem ser realizados posteriormente para a inclusão de novos corantes naturais, a fim de se diminuir o impacto ambiental que a utilização dos corantes químicos tradicionais causa.

Referências

COELHO, A.C. et al. **Coloração de Ziehl-Neelsen como método rápido de diagnóstico de paratuberculose ovina**. SCIELO, Medicina Veterinária. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60 (5) • Out 2008 • <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000500009>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/JrBjsPM3Tc5G8QgV4H98q7D/#>>. Acesso em: 03 maio 2024.

MERCK. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos**. 2017. Disponível em: <https://www.icb.ufmg.br/institucional/administracao-central/gerencias/residuos/fispq-fichas-de-informacoes-de-seguranca-de-produtos-quimicos/407-fucsina/file>. Acesso em: 22 ago. 2024.

FREITAS, V. da R; PICOLI, S. U. **A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução**. Centro Universitário Feevale – Laboratório de Biomedicina. NewsLab - edição 82 - 2007 Disponível em: < <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Gram.pdf> >. Acesso em: 14 maio 2024.

CARL ROTH. **Informações de segurança voluntárias em conformidade com o formato da ficha de dados de segurança segundo o regulamento (CE) n.º 1907/2006 (REACH)**. 2022. Disponível em: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-CN01-PT-PT.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oY2UvaDk4LzkwNzEzNDA0ODY2ODYucGRmfDMwZTBIOTA1MDE4NjViMzkwYjNiNDZIYTE0OTVjN2IxMWZmZmlwZGI1MTg0NWVkdDY4NDA2ZmU2ZjcyZDQz> MGE. Acesso em: 27 ago. 2024.

LABORCLIN - Produtos para laboratórios Ltda. Conjunto para Coloração de Gram. LB 170722 - **Rev. 07** - 06/04. Disponível em: <<https://www.prolab.com.br/wp-content/uploads/2018/05/conjunto-para-coloracao-de-gram.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2024

MARTINS, C.R.F et al. Técnica de Coloração de Gram. Biblioteca Virtual em Saúde, **Ministério da Saúde**, 2001. Disponível em:<https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf>. Acesso em: 02 maio 2024.

MORALES, P. S. O M. tuberculosis, a coloração de Ziehl-Neelsen e a interpretação do BAAR. **Sociedade Brasileira de Patologia Clínica**, 2023. Disponível em:<<https://www.sbpc.org.br/pt/noticias-e-eventos/noticias/960-o-m-tuberculosis-a-coloracao-de-ziehl-neelsen-e-a-interpretacao-do-baar>>. Acesso em: 01 maio 2024.

REIS, Ângela Adamski da Silva; SANTOS, Rodrigo da Silva. Microbiologia básica. **Faculdade Alfredo Nasser**, 2016. Disponível em: <http://www.faculdadealfredonasser.edu.br/files/docBiblioteca/ebooks/°°702064074.pdf>. Acesso em: 5 maio 2024

RENYLAB- RENYLAB QUIM. FARM. LTDA. **Coloração de Gram**. 2017. M.S: 80002670066 Disponível em:<<https://www.renylab.ind.br/wp-content/uploads/2018/05/Coloração-de-Gram.pdf>>. Acesso em: 4 maio 2024.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017, 68 p.

TRENTO, Â. Colorações Usadas em Microbiologia. **Artigo Científico apresentado a ACT – Academia de Ciência e Tecnologia para a obtenção do grau de Especialista em Microbiologia Clínica**. Academia de Ciência e Tecnologia, 208. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos_cientificos/3-Coloracao_microbiologia.pdf>. Acesso em: 03 maio 2024