

## REDUÇÃO DO USO DO XILOL NA TÉCNICA DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

Vânia Rodrigues da Rocha Cazari, Talita Rizo Pereira, Antônio Marcos Romera, Marilda da Costa Brandão, Carlos Zelandi Filho, Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente-SP.

Correspondência para: Ana Paula Alves Favareto – anafavareto@unoeste.br

### RESUMO

O xilol é um solvente amplamente utilizado em laboratórios de anatomia patológica, durante o processamento de lâminas histológicas. No entanto, este solvente apresenta alta toxicidade e sua exposição, especialmente ocupacional, pode acarretar em diversos problemas de saúde. Assim, é extremamente importante o desenvolvimento de protocolos que reduzam o seu uso, ou substituam o xilol por outros agentes que possam ter funções semelhantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade estrutural e de visualização microscópica de diferentes tecidos humanos submetidos a processamento histológico, com redução da utilização do xilol, que foi excluído durante a etapa de diafanização final e montagem das lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. Foram utilizados tecidos de biópsias de pele, fígado, vesícula biliar e útero, encaminhados à avaliação em um laboratório de anatomia patológica. Os tecidos foram submetidos a dois tipos de processamento histológico: controle (C, processamento de rotina) e redução de xilol (RX). Não foi identificada nenhuma alteração qualitativa, que pudesse prejudicar a visualização celular e o diagnóstico, nas lâminas do grupo RX em relação ao grupo C. É importante ressaltar a importância deste resultado para a redução da exposição ocupacional em laboratórios de anatomia patológica, da contaminação ambiental e dos custos, principalmente para o descarte adequado do produto.

**Palavras-chave:** xilenos, histologia, patologia, hematoxilina, eosina.

### REDUCING THE USE OF XYLENE IN HEMATOXYLIN AND EOSIN STAINING

#### ABSTRACT

The xylene is a solvent widely used in pathological anatomy laboratories, during the processing of histological slides. However, this solvent has a high toxicity and its exposure, especially occupational, can lead to many health problems. Thus, it is extremely important to develop protocols to reduce its use or to substitute xylene by other agents that may have similar functions. The aim of this study was to evaluate structural and microscopic visualization of different human tissues subjected to histological processing with reduced use of xylene that was excluded in the clarification and mounting of the histological slides stained with hematoxylin and eosin. Tissues from biopsies of skin, liver, gallbladder and uterus referred for evaluation in a pathological anatomy laboratory were used. The tissues were subjected to two types of histological processing protocol: control (C, routine protocol) and reduced xylene (RX). Did not observe any qualitative change that could impair the visualization cell and diagnosis in the histological slides of the RX group when compared to control group. It is important to emphasize the importance of this result to the reduction of occupational exposure in pathological anatomy laboratories, environmental contamination and costs, especially for proper disposal of the product.

**Key-words:** xylenes, histology, pathology, hematoxylin, eosine.

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O xilol (xileno ou dimetilbenzeno) é um líquido incolor, insolúvel em água, e apresenta aspecto límpido e odor característico<sup>1</sup>. A sua composição comercial resulta de uma mistura isomérica composta dos hidrocarbonetos orto, meta e para-xileno, sendo o segundo, o componente principal em sua composição<sup>2</sup>.

Este composto químico é obtido a partir do petróleo e amplamente usado na indústria, principalmente como solvente de uma série de compostos como tintas, vernizes, borracha, adesivos, tinturas e colas<sup>2</sup>. Além disso, este solvente é amplamente utilizado em laboratórios de anatomia patológica, durante o processamento e confecção de lâminas histológicas<sup>3</sup>. Seu alto fator de solvência permite o máximo de retirada de álcool dos tecidos, tornando-os translúcidos e melhorando a infiltração pela parafina. Suas excelentes capacidades de desparafinação e diafanização (clareamento) também são importantes durante os procedimentos de coloração histológica<sup>1</sup>.

O xilol oferece risco de contaminação durante os processos de produção, embalagem, transporte e utilização. A maioria do xilol que é liberado acidentalmente evapora no ar, o que além da contaminação leva ao risco de explosão, sob ação do calor. Em determinadas

concentrações na atmosfera, sua vida média é de uma a dezoito horas. Em caso de derramamento no solo ou de aterros sanitários, o produto geralmente evapora em grau moderado, podendo, portanto, ocorrer percolação (passagem lenta de um líquido através de um meio filtrante) e contaminação de águas subterrâneas, chegando a poços de água potável<sup>4</sup>.

A exposição ao xileno pode ocorrer por meio de inalação, ingestão e contato com olhos ou com a pele. O tipo e a gravidade dos efeitos na saúde dependem de vários fatores, incluindo a quantidade de composto e a duração do tempo de exposição<sup>2</sup>.

A exposição ocupacional é a maior fonte de contato a altos níveis de xilenos. Além de pintores e trabalhadores da indústria química de tintas, os funcionários de laboratórios biomédicos e de anatomia patológica também estão amplamente expostos aos efeitos tóxicos do xilol, apresentando, em cerca de 75% dos casos, algum problema de saúde relacionado à manipulação do solvente<sup>1</sup>.

O limite de tolerância de exposição aos xilenos é de 78 ppm ou 340 mg/m<sup>3</sup>. Vários efeitos têm sido relatados após a exposição aguda e crônica ao solvente em concentrações de 200 ppm ou mais. O principal efeito da inalação de vapores de xileno é a depressão do sistema nervoso

central, com sintomas como cefaléia, tontura, náuseas, vômitos e perda de apetite<sup>5</sup>. O contato prolongado também pode prejudicar as vias olfatórias, o fígado, os rins, a visão e a audição<sup>2,6-11</sup>. O contato com a pele pode causar dermatites, inflamações, inchaço, ressecamento, descamação e rachaduras. Além disso, estudos demonstram que o xileno pode produzir efeitos fetotóxicos, como atraso na ossificação e alterações comportamentais em animais, mesmo na ausência de toxicidade materna<sup>8</sup>.

Além do comprometimento da saúde, se não descartado corretamente, o xilol pode causar prejuízos por danificar redes de esgoto e derreter materiais de PVC, comprometendo não só a empresa responsável por seu uso, mas as imediações do local<sup>12</sup>. Devido a todos estes riscos, a eliminação de seus resíduos deve ser feita apenas por empresas especializadas.

Todos estes problemas que envolvem a utilização do xilol têm levado a tentativas de redução do seu uso ou até mesmo substituição completa do produto por outros agentes que possam ter funções semelhantes. Alguns substitutos testados em protocolos histológicos automatizados ou manuais, em tecidos humanos e de animais são: o propileno glicol éter metílico, isopropanol (2-propanol), n-heptano e alguns compostos produzidos a partir de óleos vegetais e minerais<sup>13-18</sup>.

Diante desta problemática, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade estrutural e de visualização microscópica de diferentes tecidos humanos submetidos a processamento histológico e coloração por hematoxilina e eosina com redução da utilização do solvente xilol. Além de reduzir o custo da técnica de produção de lâminas histológicas, em cerca de 40%, a diminuição do uso do solvente proposta, também poderá levar a uma menor exposição ocupacional e conseqüentemente à melhoria de qualidade de vida dos funcionários de laboratórios de anatomia patológica e histologia. Pode se destacar também como benefício, a economia de tempo, a menor produção de resíduos químicos e a redução do risco de contaminação ambiental.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade estrutural e de visualização microscópica de diferentes tecidos humanos, submetidos a processamento histológico com redução da utilização do xilol, sendo o solvente excluído da etapa de diafanização final e montagem das lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina.

## MÉTODOS

### Material biológico

Foram utilizadas amostras de 5 pacientes, obtidas a partir de biópsias cutâneas (n=2) e hepática (n=1) e peças cirúrgicas de vesícula biliar (n=1) e de útero (n=1), submetidas à investigação histopatológica diagnóstica em um laboratório de anatomia patológica do interior paulista. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedeceram aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE (Protocolo nº 1200).

### Processamento histológico e forma de análise dos resultados

Ao chegar ao laboratório, os tecidos de biópsia e as peças cirúrgicas, fixados em formol a 10% provenientes de diferentes locais de coleta, foram registrados e encaminhados ao setor de macroscopia, onde foram separados, selecionados e colocados em cápsulas identificadas.

Os diferentes tecidos foram submetidos a dois tipos de processamento histológico (n=5 por grupo experimental): controle (C) e com redução de xilol (RX).

Como processamento controle, foi realizada a metodologia rotineiramente

empregada em laboratórios de anatomia patológica<sup>15</sup>. Para isso, os tecidos fixados foram desidratados em soluções crescentes de álcool e diafanizados em xilol (Lote: T 17101214, código ONU:1307, fracionado por Bicloro distribuído por Alkimia) através de um autotécnico (PT05, Lupe, Brasil). Após este processamento, o material foi submetido à inclusão em parafina e levado a placa refrigerada para confecção dos cortes histológicos de 4µm espessura, que foram obtidos por meio de micrótomo rotativo (MRP03, Lupe, Brasil) e navalha descartável. Os cortes foram distendidos em banho-maria em temperatura variando entre 48 a 52 °C.

Antes de passar pelo processo de coloração, as lâminas histológicas foram desparafinizadas em estufa a 80°C, por 30 minutos e passaram por dois banhos de xilol com duração de 10 e 5 minutos, respectivamente. Após este procedimento, os cortes foram corados pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidos a 5 banhos de álcool para desidratação e a 3 banhos de xilol para diafanização final. Com o material imerso no último banho de xilol, as lâminas foram montadas com verniz e lamínula. No processamento controle o xilol foi utilizado em três etapas: 1) diafanização inicial do órgão; 2) desparafinização das lâminas e 3) diafanização final do material para a montagem das lâminas histológicas.

O processamento RX foi realizado conforme Nai et al.<sup>19</sup> com adaptações. Para isto, todo o processamento histológico foi realizado conforme descrito para o grupo controle, até a etapa de coloração com hematoxilina e eosina, utilizando-se o xilol em duas etapas (diafanização inicial dos órgãos e desparafinização das lâminas). No entanto, após a coloração, o xilol não foi mais utilizado, sendo excluído da etapa de diafanização final para a montagem das lâminas, conforme descrito a seguir.

Uma vez corado com Hematoxilina e Eosina (HE) o material passou apenas por cinco banhos de álcool para a retirada do excesso da eosina e desidratação e não foi diafanizado em xilol. Os cortes histológicos foram levados à estufa a 80 °C por 5 minutos para secagem e as lâminas foram montadas apenas com verniz e lamínula.

As lâminas submetidas aos dois tipos de processamento foram analisadas em ensaio cego em microscópio óptico (Mod. 200, Nikon, Japão) nos aumentos de 40, 100 e 400X. Estas foram analisadas quanto à sua qualidade e facilidade de identificação dos diferentes tipos celulares e estruturas em cada tecido investigado.

## RESULTADOS

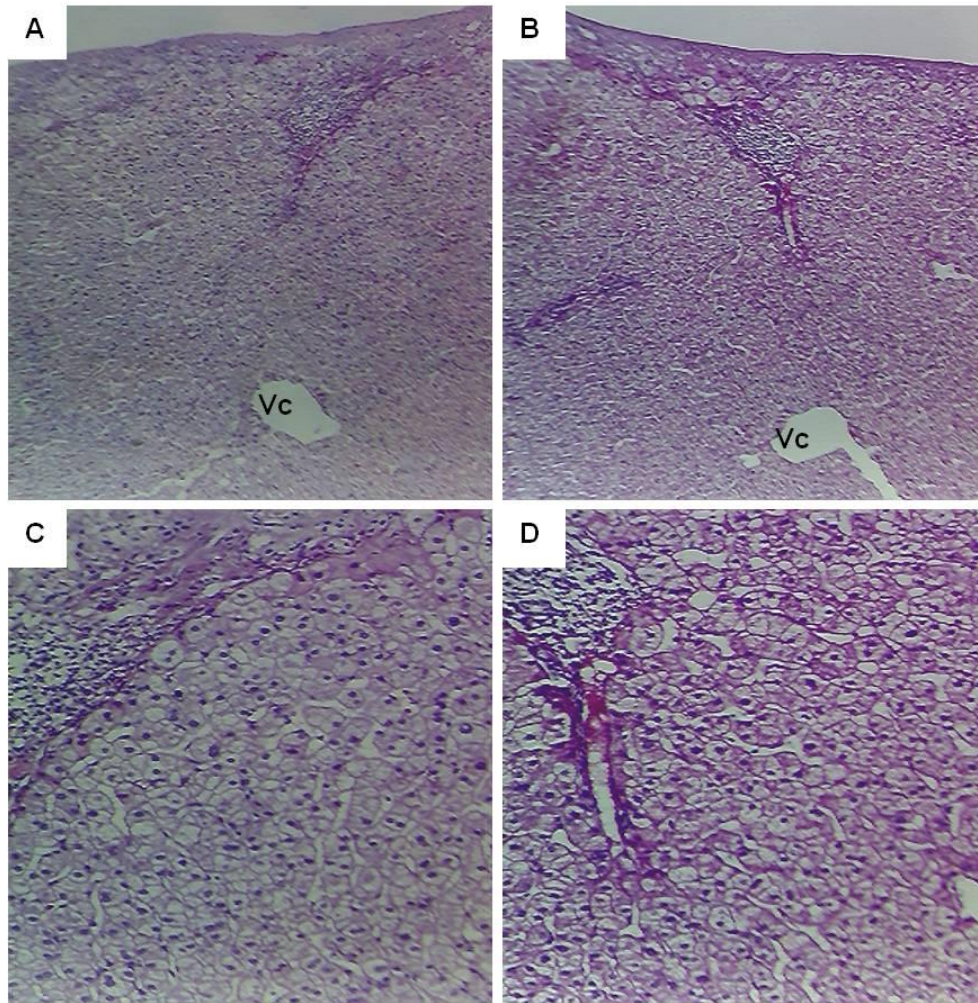
Não foram observadas diferenças na qualidade de visualização microscópica e de diagnóstico entre as lâminas histológicas de

fígado (Figura 1), pele (Figura 2), vesícula biliar (Figura 3) e útero (Figura 4) dos grupos RX e controle.

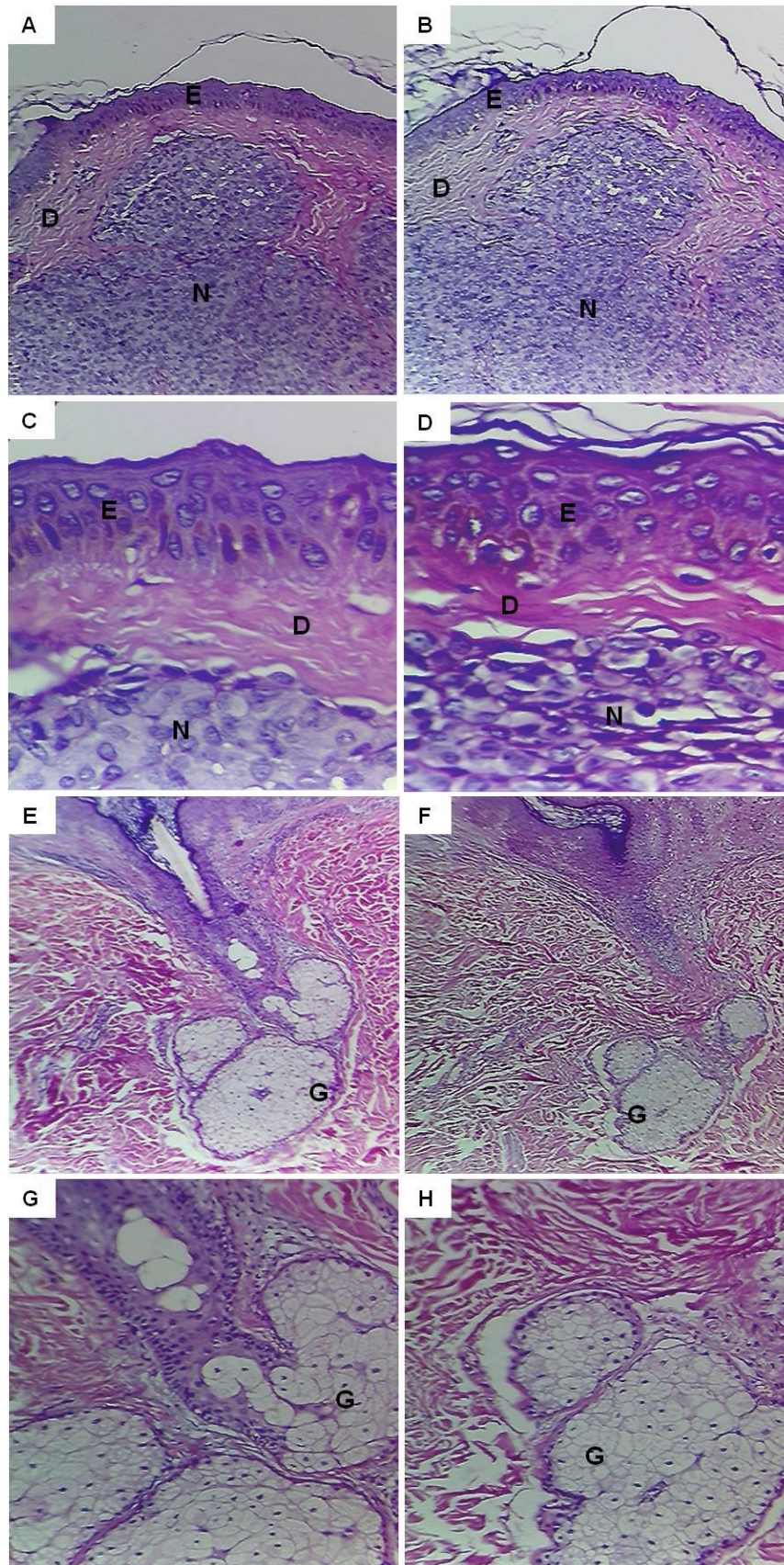
A qualidade das secções dos diferentes tecidos avaliados e a preservação da nitidez e clareza necessárias para a avaliação diagnóstica permaneceu inalterada em 100% das lâminas do grupo RX.

## DISCUSSÃO

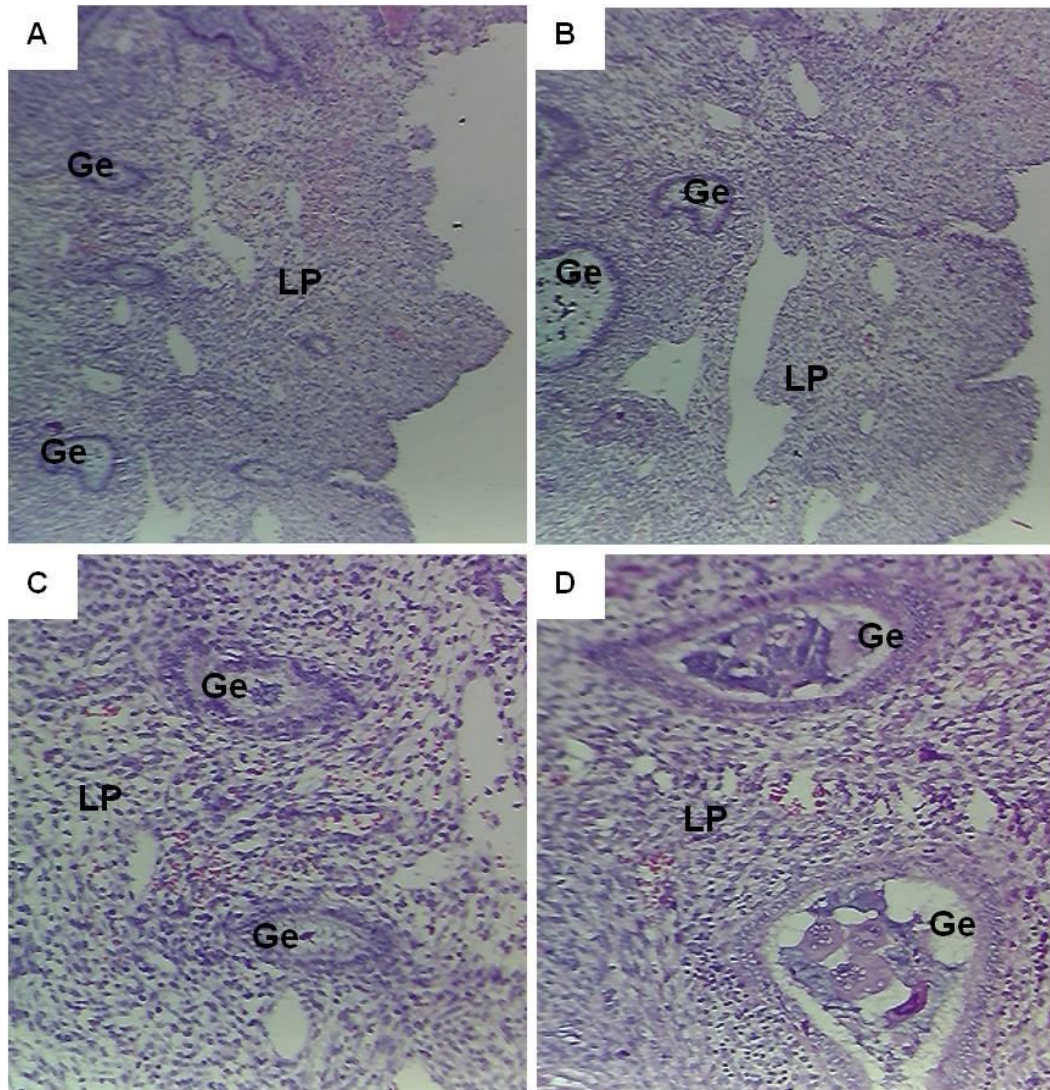
O xilol oferece risco à saúde humana e ambiental, desde a sua produção até seu descarte. De acordo com o grau de exposição, ele pode levar a sérios danos à saúde, especialmente ocupacional, como depressão do sistema nervoso central, dermatites, infecções e inchaços<sup>5,8</sup>. Assim, alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir o uso constante deste produto ou substituí-lo, principalmente em laboratórios de anatomia patológica e citopatologia, assegurando melhor qualidade de vida ao trabalhador exposto<sup>1-4,6-8,20</sup>.



**Figura 1.** Fotomicrografias de corte histológico de fígado. A e C - Grupo controle, B e D - Grupo RX (redução de xilol). A e B - 40X, C e D - 100X. HE: Hematoxilina e eosina. Vc: veia centrolobular.

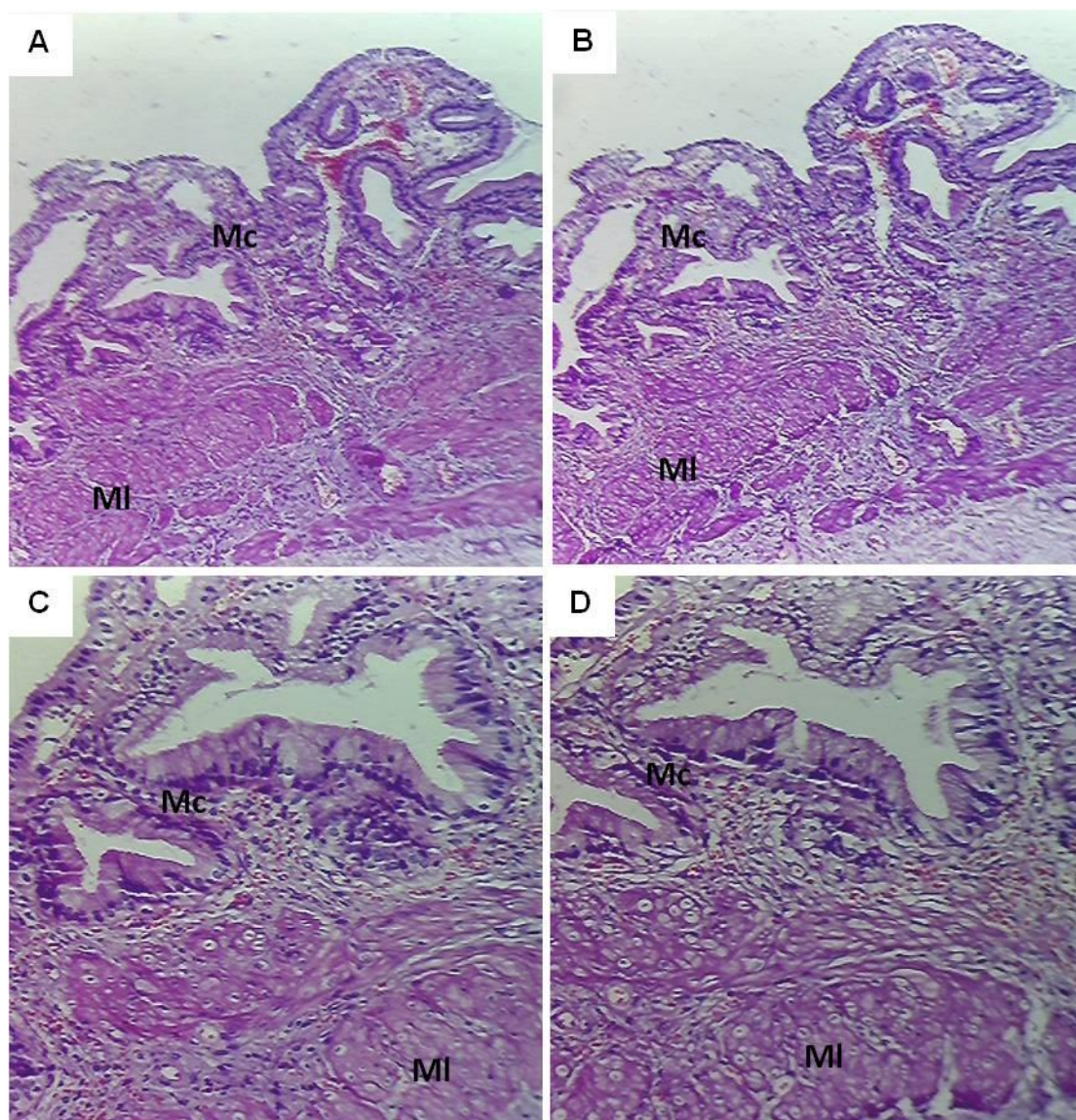


**Figura 2.** Fotomicrografias de corte histológico de pele, exibindo nevo melanocítico intradérmico. A, C, E e G - Grupo controle; B, D, F e H - Grupo RX (redução de xilol). A e B - 100X; C, D, E e F - 400X; G e H - 1000X. HE: Hematoxilina e eosina. E: epiderme, D: derme, G: glândula sebácea.



**Figura 3.** Fotomicrografias de corte histológico de útero. A e C - Grupo controle, B e D - Grupo RX (redução de xilol). A e B - 40X, C e D - 100X. HE: Hematoxilina e eosina. Ge: glândula endometrial. Lp: lâmina própria.





**Figura 4.** Fotomicrografias de corte histológico de vesícula biliar. A e C - Grupo controle, B e D - Grupo RX (redução de xilol). A e B - 40X, C e D - 100X. HE: Hematoxilina e eosina. M: camada mucosa, MI: camada muscular.

No presente estudo, foi avaliada a qualidade estrutural e de visualização microscópica de diferentes tecidos humanos submetidos a processamento histológico e coloração por hematoxilina e eosina com redução da utilização do solvente xilol. Foi observado que as lâminas histológicas de pele, fígado, vesícula biliar e útero

preparadas sem a utilização de xilol na etapa de diafanização final e montagem não diferiu das lâminas dos mesmos tecidos, processadas de maneira rotineira.

O presente estudo corrobora com resultados Falkeholm et al.<sup>13</sup>, que excluíram também das etapas de desparafinização e coloração das lâminas de tecido mamário,

pele e intestino. Entretanto, como no estudo de Falkeholm et al.<sup>13</sup>, o xilol foi retirado de outras etapas do processamento histológico, a qualidade das lâminas coradas em HE e PAS foi menor (74%). Neste mesmo estudo, também foi testado o método de van Gieson, mas as lâminas confeccionadas sem xilol não apresentaram boa qualidade de visualização microscópica.

É importante ressaltar que a exclusão do xilol no momento da diafanização final e montagem das lâminas histológicas realizada no presente estudo, diminui significativamente a exposição direta dos técnicos de laboratório de patologia, visto que nesta etapa é necessário o contato mais direto com o solvente, do que durante o processamento do material em autotécnico.

Estudo de Dergovics et al.<sup>21</sup> avaliou a eficiência da utilização da mistura de verniz e xilol para imersão das lâminas citológicas prontas de raspado bucal e cervico-vaginais, para montagem após coloração em Papanicolaou. Todo material foi submetido à coloração Papanicolaou comumente realizada, com alterações apenas na etapa de montagem das lâminas, onde foram divididos grupos para os diferentes tipos de concentrações da mistura verniz/xilol, sendo eles: 75/25%, 70/30%, 60/40%, 50/50% e 40/60%. O grupo que manteve a qualidade do material biológico e mostrou bons resultados foi o de concentração 75/25%<sup>21</sup>.

Além das tentativas de exclusão, alguns substitutos para o xilol têm sido testados em protocolos histológicos automatizados. No entanto, apesar de alguns produtos utilizados serem eficientes, outros podem apresentar-se como alternativas de maior custo, ou até mesmo, com alta toxicidade.

Estudo de Chen et al.<sup>14</sup> demonstrou que a substituição do xilol por propileno glicol éter metílico, nos processo de coloração por hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson e pelo método de coloração pela prata Gordon/Sweet, mantém a qualidade das lâminas histológicas. O substituto também se mostrou eficiente também em processamentos imunohistoquímicos para actina, CD3 CD4 e Ki-67. Além da eficiência mostrada, o reagente apresenta baixa toxicidade, quando comparado ao xilol<sup>22</sup>.

Segundo Buesa e Peshkov<sup>16</sup>, o isopropanol (2-propanol) misturado ou não à parafina e óleo mineral, também pode ser uma boa alternativa ao xilol, já que apresenta menor toxicidade e menor custo. O mesmo é observado com a substituição do xilol por n-heptano durante o processamento de lâminas coradas com hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson<sup>17</sup>.

Alguns compostos provenientes de óleos vegetais, como o D-limoneno, um terpeno cíclico encontrado em frutas cítricas,

também foram testados. No entanto, não mantiveram a qualidade dos tecidos, além de também serem capazes de induzir problemas de saúde e apresentarem custo mais alto que o xilol<sup>23</sup>. Já a substituição do xilol por óleo mineral refinado, na etapa de desparafinização, mostrou-se eficiente, com boa relação custo benefício<sup>18</sup>.

Falkeholm et al.<sup>13</sup> desenvolveram um método livre de xileno, no qual o solvente foi excluído da etapas de desparafinação, coloração e montagem de lâminas histológicas de tecido mamário, de pele e intestino. Neste estudo, 74% das lâminas confeccionadas sem xileno apresentaram-se de boa qualidade, quando comparadas ao método histológico convencional. Estes resultados positivos foram obtidos quando os cortes histológicos foram submetidos às colorações de hematoxilina e eosina e PAS, no entanto, quando realizado o método de van Gieson a qualidade não foi mantida.

Outro método livre de xilol foi investigado por Ankle e Joshi<sup>15</sup>, que substituíram o xilol por um detergente durante o processo de desparafinização. Segundo os autores, este processamento alternativo tem como benefícios, além da manutenção da qualidade de visualização da coloração nuclear e citoplasmática, o fato de não ser tóxico e inflamável e de ter menor custo.

Um método denominado SOB (substituto não tóxico), no qual foi utilizado um produto formado por uma mistura de 86% de óleo branco e 14% de N-heptano foi testado por Kunhua et al.<sup>24</sup>. Neste método, o xilol foi substituído pelo composto SOB na etapa da desparafinização. Para este estudo, foram utilizados tecidos de omento, baço e rim de 10 ratos (estudo piloto) e 8 tipos de tecidos humanos, sendo eles, fígado, baço, pulmão, rim e pele em testes de larga escala. Os resultados obtidos por Kunhua et al.<sup>24</sup> mostraram que a técnica SOB pode ser um importante substituto ao xilol não só para HE, mas também para Giemsa e PAS, não interferindo no diagnóstico ou prejudicando a qualidade dos tecidos.

Estudo de Aydin et al.<sup>25</sup> investigou a eficiência de soluções alternativas ao formaldeído no processo de fixação de tecidos e ao xilol na etapa de diafanização. Foram analisados para substituição do formaldeído os agentes Glyo-Fix<sup>®</sup>, Fine Fix<sup>®</sup>, Cell-block<sup>®</sup>, Green-Fix<sup>®</sup> e como substitutos do xilol, os produtos Sub-X<sup>®</sup>, Bio-clear<sup>®</sup> e Shandon<sup>®</sup>. Todos os agentes usados mostram-se eficientes para a preservação da qualidade do material corado com hematoxilina e eosina e usado para a realização de análise histoquímica e imunohistoquímica.

## CONCLUSÃO

A partir destes resultados, conclui-se que a exclusão do xilol da etapa de diafanização final e montagem de lâminas histológicas não prejudica a sua qualidade e o diagnóstico. Sendo assim, a proposta do presente estudo constitui uma importante alternativa para os laboratórios de anatomia patológica e citologia, podendo melhorar a qualidade de vida dos técnicos de laboratório, bem como, reduzir os riscos à saúde. Além disso, também pode-se destacar a importância desta técnica alternativa a diminuição dos riscos de contaminação ambiental e dos recursos financeiros.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

## REFERÊNCIAS

1. Costa KNS, Pinheiro IO, Calazans GT, Nascimento MS. Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. *Rev Bras Saúde Ocupac.* 2007;32(116):50-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0303-76572007000200007>
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Xylenes (Update). Atlanta, GA: Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services; 2007.

3. Metgud R, Astekasr MS, Soni A, Naik S, Vanishree. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue section. *Biotechnic Histochem.* 2013;88(5):235-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10520295.2013.764015>
4. Juras IAG. Impacto a saúde e ao meio ambiente do aumento irregular de solventes na gasolina. Brasília: Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados; 2005. Acesso em 12 nov 2011. Disponível em: [http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1027/impacto\\_saude\\_juras.pdf?sequence=4](http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1027/impacto_saude_juras.pdf?sequence=4)
5. Mandiracioglu A, Akgur S, Kocabiyik N, Sener U. Evaluation of neuropsychological symptoms and exposure to benzene, toluene and xylene among two different furniture worker groups in Izmir. *Toxicol Indust Health.* 2011;27(9):802-809.
6. Savolainen K, Riihimaki V, Linnoila M. Effects of short-term xylene exposure on psychophysiological functions in man. *Int Arch Occup Environm Health.* 1979;44:201-211. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00381655>
7. Bertoncello L. Efeitos da exposição ocupacional a solventes orgânicos, no sistema auditivo. Monografia. Especialização em Audiologia Clínica. Porto Alegre: Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica, CEFAC; 1999.
8. Kandyala R, Raghavendra SPC, Rajasekharan ST. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofacial Pathol.* 2010;14(1):1-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.64299>
9. Fuente A, McPherson B, Cardemil F. Xylene-induced auditory dysfunction in humans. *Ear Hear.* 2013;34(5):651-660. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/AUD.0b013e31828d27d7>

10. Lee EH, Paek D, Kho YL, Choi K, Chae HJ. Color vision impairments among shipyard workers exposed to mixed organic solvents, specially xylene. *Neurotoxicol Teratol*. 2013;37:39-43. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2013.02.005>
11. Vaghasia KK, Bhavyata K, Hyacinth HN. Renal and hepatotoxic alterations in adult mice on inhalation of specific mixture of organic solvents. *Toxicol Indust Health*. 2013;29(11):1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0748233713485892>
12. Irwin RJ, VanMouwerik M, Stevens L, Seese MD, Basham W. Environmental contaminants encyclopedia entry on xylenes (in general). National Park Service. Colorado: Fort Collins, 1997. Acesso em: 25 fev 2014. Disponível em: [www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/xylenes.pdf](http://www.nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/xylenes.pdf)
13. Falkeholm I, Grant CA, Magnusson A, Möller E. Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. *Labor Invest*. 2001;81(9):1213-1221. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.3780335>
14. Chen C, He T, Mao XL, Friis TE, Qin RH, Jian YT. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. *Biotech Histochem*. 2010;85(4):231-240. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10520290903235445>
15. Ankle MR, Joshi PS. A 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. *J Oral Maxillofacial Patol*. 2011;15(2):161-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029X.84482>
16. Buesa RJ, Peshkov MV. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory. *Arkhiv Patologii*. 2011;1:54-60.
17. Stockert JC, López-Arias B, Del Castillo P, Romero A, Blásquez-Castro A. Replacing xylene with n-heptane for paraffin embedding. *Biotechnic Histochem*. 2012;87(7):464-467. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10520295.2012.701764>
18. Premalatha BR, Patil S, Rao RS, Indu M. Mineral oil - a biofriendly substitute for xylene in deparaffinization: a novel method. *J Contemp Dental Pract*. 2013;14(2):281-286.
19. Nai GA, Ferro L, Galle LC, Quatrochi PJ, Giroto L A. Procedimentos de coloração dos preparados cito e histológicos: uma nova proposta. *Laes Haes*. 2004;147:123-132.
20. Brasil. Consolidação das Leis do Trabalho. Decreto Lei n.15, de 14 de dezembro de 1995. NR 15 - Atividades e operações insalubres. Acesso em: 22 out 2011. Disponível em: [http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DDC2FF4012DE2B688206D4D/NR-15%20\(Anexo%20n%20C2%BA%2013-A\)%20Benzeno%202011.pdf](http://portal.mte.gov.br/data/files/FF8080812DDC2FF4012DE2B688206D4D/NR-15%20(Anexo%20n%20C2%BA%2013-A)%20Benzeno%202011.pdf)
21. Dergovics FL, Moura TPS, Shirata NK, Pereira SMM. Avaliação do desempenho da mistura verniz/xilol na diafanização de lâminas de citopatologia coradas com a técnica de Papanicolaou. *Rev Bras Análises Clín*. 2012; 44(1):35-38.
22. USEPA. United States Environmental Protection Agency. Reregistration eligibility decision for propylene glycol and dipropylene glycol. 2006. Acesso em: 26 fev 2014. Disponível em: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/propylene\\_glycol\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/propylene_glycol_red.pdf)
23. Buesa RJ, Peshkov MV. Histology without xylene. *Ann Diagnostic Pathol*. 2009; 13(4): 246-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005>

24. Kunhua W, Chuming F, Tao L, Yanmei Y, Xin Y, Xiaoming Z, Xuezhong G, Xun L. A novel non-toxic xylene substitute (SBO) for Histology. *African J Tradit, Complem Altern Med.* 2012;9(1):43-49.

25. Aydin I, Yörükoglu K, Cingöz S, Agilkaya. The effect of the alternative solutions to formaldehyde and xylene on tissue processing. *Indian J Pathol Microbiol.* 2013;53(3):221-230.

Recebido para publicação em 25/07/2013

Revisado em 07/03/2014

Aceito em 24/03/2014