

SOLUÇÃO ESTÁVEL DE FUCSINA — NOVO MÉTODO DE PREPARAÇÃO PARA COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELEN

Luiz Fernando de Góes SIQUEIRA¹
 Regina Gomes de ALMEIDA²
 Walter FRANCISCO³
 Manuel Fernando Queiroz dos SANTOS JR⁴
 Walter BELDA⁵

RESUMO — Os sais de fucsina atualmente encontrados no mercado Latino-americano, têm demonstrado uma certa instabilidade, quando em solução, segundo indicações clássicas do método de Ziehl-Neelsen, resultando em precipitação total do sal. Os autores indicam nova técnica de preparação desta solução, de forma a minimizar a ação dos fatores interferenciais responsáveis pela precipitação, obtendo maior solubilidade do sal e estabilidade da solução. A eficiência do método é ainda reforçada pela utilização de menor quantidade do sal e possibilidade de maior tempo de estocagem da solução.

Palavras chave: *Mycobacterium leprae*. Coloração.

1 INTRODUÇÃO

A fucsina foi inicialmente usada por Erlich em 1882, dissolvida em óleo de anilina. Esta solução apresentava o inconveniente de ser altamente instável. Muitas pesquisas no intuito de obter uma sistematização que permitisse uma maior segurança na prática diagnóstica, culminaram na utilização de fenol em uma solução hidroalcoólica de fucsina, tomando-a consideravelmente estável frente às soluções iniciais⁹.

No início a fucsina não era bem caracterizada. Conhecem-se hoje três tipos de fucsina: a pararosanilina, a rosanilina e a fucsina nova, todas pertencentes à classe química Triarilmeteno, e diferenciadas entre si apenas pelo número e posição de radicais media, ligados à estrutura principal⁹. Harada³ comprova, através da espectrofotometria e da cromatografia em camada delgada, que a "fucsina básica", assim encontrada no mercado, não tem uma estrutura ou composição constante, sendo

- (1) Professor Auxiliar de ensino da Área de Dermatologia Sanitária do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP).
- (2) Pesquisador Científico H da Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- (3) Professor Assistente do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- (4) Professor Assistente da Área de Dermatologia Sanitária do Departamento de Epidemiologia da FSP-USP.
- (5) Professor Livre-Docente da Área de Dermatologia Sanitária do Departamento de Epidemiologia da FSP-USP.

esta, uma mistura variada dos tipos de fucsina. A apresentação mais comum das fucsinas é sob a forma de cloreto, ou mais raramente de acetato, e segundo o "Colour Index" a solubilidade das fucsinas é muito variada em função da sua apresentação e do solvente utilizado.

Lillie⁶ descreve que as soluções de carbolfucsina formam gradualmente um precipitado vermelho escuro, que se deposita e não é redissolvido com aquecimento ou agitação, e afirma que esta deposição leva a um enfraquecimento progressivo da solução, sendo, conseqüentemente, necessários controles periódicos para prevenir a ocorrência de exames falso-negativos. Relata ainda ser imprevisível tal comportamento, existindo soluções que atravessam vários anos sem perder sua validade, entretanto, outras perdem na em menos de um ano.

Na rotina da baciloscopia, observou-se que fucsina de Ziehl, segundo indicações clássicas, começaram a apresentar uma certa instabilidade resultando em precipitação total do corante. Verificou-se que tal comportamento ocorria em conseqüência do baixo grau de solubilidade destes produtos.

O objetivo do nosso trabalho é apresentar uma técnica de preparação da solução de fucsina de Ziehl, de forma a eliminar tais fatores interferenciais, resultantes principalmente das impurezas dos sais comercialmente vendidos.

2 METODOLOGIA

Foram utilizadas várias fucsinas pulverizadas de diferentes produtores, atualmente encontradas no mercado Latino-americano. Experimentou-se inicialmente a utilização de diferentes qualidades de água (destilada, bidestilada e deionizada) para cada um dos produtos. Foram utilizadas diversas fórmulas com diferentes concentrações de fucsina, citadas por Lillie⁶, Poiré & Carranzas e Siqueira et al.¹⁰, em exaustivas revisões bibliográficas. Foi utilizada ainda uma nova fórmula que se idealizou, preparada segundo uma adaptação que foi feita da técnica de Kinyon, citada por Lillie⁶.

Novo método da preparação de carbol-fucsina idealizado pelos autores: em uma primeira solução dissolvem-se 9g de fucsina básica em 90ml de álcool etílico (95%); em uma segunda solução são dissolvidos 45ml de fenol fundido, em 100ml de álcool etílico (95%); juntar a primeira e a segunda soluções em um balão de 2.000ml de capacidade; adicionar 450ml de água destilada; levar ao banho-maria (em ebulição) por um período de uma hora, agitando-o periodicamente, ou até que, após agitação a solução escorra rapidamente pela parede do balão, sem formar bolhas de aspecto gorduroso; completar a solução com 450ml de água destilada e transferir para um frasco, onde deverá permanecer 48 horas em repouso, sendo então filtrada e estocada para uso.

3 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados pelo novo método de preparação de fucsina, demonstram um nítido aumento da solubilidade. Julgou-se em primeira análise, que o aquecimento tenha produzido um fenômeno de hidrólise, dissociando os sais contidos na "fucsina básica". Mostrou, ainda, estabilidade da solução que perdurou por 10 meses sem perder suas características individuais.

A menor quantidade de sal utilizada na preparação da solução corante constitui interesse sanitário, pela diminuição do custo no diagnóstico rotineiro de bacilos álcool-ácido resistentes. Alguns autores recomendam o uso de menores quantidades de corantes^{>2}. Ao serem reproduzidas suas técnicas, observou-se que a insolubilidade e a instabilidade se mantinham, apresentando diminuição do seu poder tintorial. Quando foram reproduzidas outras técnicas, recomendando utilização de maiores quantidades de corantes^{4,11,7,1}, constatou-se a ocorrência dos mesmos problemas. Concluiu-se que a concentração do corante não representa o fator interferencial na estabilidade da solução, no caso da fucsina, um corante parcialmente solúvel. Uma solução saturada pode garantir a manutenção da estabilidade, bem como de suas características tintoriais, quando preparada segundo a técnica descrita.

4 CONCLUSÃO

O novo método de preparação de fucsina atende com eficiência às expectativas de uma substância corante, minimizando a ação dos fatores interferenciais responsáveis pela precipitação, obtendo maior solubilidade do sal e estabilidade da solução. Sua eficiência é ainda reforçada, ao demonstrar a integridade de suas características tintoriais utilizando uma menor quantidade do sal, e possibilitando maior

tempo de estocagem da solução. Tais características assumem relevante importância para a Saúde Pública, por ser esta solução corante a mais utilizada para a evidênciação de bacilos álcool-ácido resistentes, estando alguns destes, como representantes etiológicos de dois grandes problemas sanitários, a tuberculose e a hanseníase, sendo para esta última a única prática bacteriológica para diagnóstico e controle de tratamento.

ABSTRACT — The fuchsin salts currently available in Latin American market have shown some instability when in solution, according to the classic Ziehl-Neelsen method, resulting in a total precipitation of the salt. The authors indicate a new technique for the preparation of this solution, in order to minimize the action of interfering factors responsible for the precipitation, obtaining thus a greater solubility of the salt, as well as the solution stability. The method effectiveness is reinforced by the utilization of a smaller amount of the salt and the attainment of a larger storage period for the solution.

Key words: *Mycobacterium leprae* Staining.

REFERENCIAS

- 1 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. *Gua para controle da hanseníase*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1983. 83p.
- 2 FINEGOLD, S.M.; MARTIN, W.J.; SCOTT, E.G. Staining formulas and procedures. In: —. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 5.ed. Saint Louis, C.V. Mosby, 1978. p.472.
- 3 HARADA, K.; GIDOH, S.; TSTSUMI, S. Staining mycobacteria with carbolfuchsin: properties of solutions prepared with different samples of basic fuchsin. *Microscop. Acta*, 78:21-27, 1976.
- 4 KONEMAN, E.W.; ALLEN, SD.; DOWELL JR., V.R.; SOMMERS, H.M. *Micobacteria*. In: —. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia, J.B. Lippincott. 1979. Cap. 12, p.353.
- 5 LENNETTE, EH.; BALOWS, A.; HANSLER JR.; W.; TRUANT, J.P., ed. Reagents, stains and miscellaneous test procedures. In: *Manual of clinical microbiology*. 3ed. Washington, D.C., American Society for microbiology, 1980. cap. 98, p.1023.
- 6 LILLIE, R.D. Acid fast stains. In: —. *Histopathological technic and practical histochemistry*. 3.ed. London. McGraw Hill 1965. p.575-581.
- 7 ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAO- DE. *Manual para o controle da hanseníase*. Washington, D.C. 1983. 96p. (OPS. Publicação científica, n.436).

- 8 POIRE, A.F. & ARZENO CARRANZA, M. Métodos de coloración del bacilo de Koch. Comparación de los métodos de Ziehl-Neelsen, Schulte Tigges, Konrich, Lesieur, Khune y uno propuesto por nosotros. Diferenciación del bacilo de Koch de los demás ácidosresistentes. *Sem. Med.*, 22(41): 877-944, 1925.
- 9 SIQUEIRA, L.F.G.; ALMEIDA, R.G.; BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*. Revisão histórica. *Rev. Saude Publ.*, 17(4): 297-315, 1983.
- 10 SIQUEIRA, L.F.G.; ALMEIDA, R.G.; BELDA, W. Métodos tintoriais utilizados na identificação do *Mycobacterium leprae*. Revisão histórica. *Rev. Saúde Publ.*, 18(3): 246-58, 1984.
- 11 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy: examination for the bacillus in nodules and skin lesions. In: —. *Manual of basic techniques for a health laboratory*. part II, cap. 33, p. 259.