

# TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E CITOLÓGICO EM SERVIÇOS DE PATOLOGIA CLÍNICA: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Alexandre Garuffi Torres<sup>1</sup>, Cibele da Glória Heitor Silva<sup>1</sup>, Thamiris Leonel Tavares da Silva<sup>1</sup>, Juliana

Possatto Fernandes Takahashi <sup>2,3</sup>

---

## RESUMO

As técnicas de processamento histológico e citológico são de grande importância na fase pré-analítica de um exame. A coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia e coloração são os procedimentos que preparam amostras de tecido retiradas de um organismo para análise histológica ao microscópio. Portanto, o objetivo deste trabalho é apresentar, uma revisão sobre técnicas relacionadas ao processamento histológico. Para tanto é importante que todo o manuseio das amostras seja feito seguindo as boas práticas laboratoriais para evitar o extravio, contaminação das amostras e os produtos químicos usados em todo o processo, estejam dentro da validade e em boas condições, garantindo assim que o médico patologista possa fornecer um diagnóstico correto e indicar o tratamento adequado à condição do paciente.

**Palavras-chave:** Processamento histológico; descalcificação; fixação; microtomia

---

<sup>1</sup>Graduandos em Biomedicina do Centro Universitário Sumaré

<sup>2</sup>Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Sumaré, <sup>3</sup>pós doutoranda do Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

## **ABSTRACT**

Histological and cytological processing techniques are of great importance in the pre-analytical phase of an examination. Material collection, fixation, cleavage, processing, embedding, microtomy and staining are the procedures that prepare tissue samples taken from an organism for histological analysis under the microscope. Therefore, the objective of this work is to present a review of techniques related to histological processing. Therefore, it is important that all sample handling is done following good laboratory practices to avoid loss, sample contamination and the chemical products used throughout the process, are within the validity period and in good condition, thus ensuring that the pathologist can provide a correct diagnosis and indicate the appropriate treatment for the patient's condition.

**Key words:** Histological processing; descaling; fixation; microtomy

## **1 INTRODUÇÃO**

A histologia estuda diferentes tipos de tecidos usando diversas substâncias químicas, e durante os anos foram feitas inúmeras tentativas para encontrar um agente que preservasse os tecidos de maneira próxima ao seu estado natural (1).

Rudolph Virchow na década de 1820 provou que havia alteração nas estruturas teciduais, que células doentes derivam das células saudáveis, tornando a análise histopatológica essencial para definir as bases da patologia celular. O exame histopatológico é feito a partir da análise de amostras coletadas a partir de biópsia e necropsia, sendo as técnicas de processamento histológico ter como objetivo oferecer formas de conservação de amostra teciduais (1).

Coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia e coloração são os procedimentos histológicos que preparam as amostras de tecidos retirados de um organismo para análise histológica em microscópio, e para tecidos calcificados, o material é descalcificado após a fixação (1).

## **2 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

### **2.1 Coleta**

A coleta da amostra pode ser removida com o paciente ainda vivo durante uma cirurgia, ou durante uma necropsia após o falecimento. Quando feita a coleta para diagnóstico, o material originado de biópsia ou necropsia deve ser previamente analisado por um patologista que fornecerá o laudo macroscópico (2).

O material coletado deve ser registrado em um livro próprio de protocolo, para registre um número que o acompanhará em todo o procedimento histológico, sendo o material submetido em cirurgia deve ser acompanhado por uma ficha com o registro da análise, contendo a identificação do órgão e data da fixação de entrada do material no laboratório, com todas as

informações do paciente. E em caso de paciente hospitalar, deverão ser informados sua

qualificação ex: registro de ambulatorial, identificação do médico responsável, descrição da biopsia, e outros dados médicos importantes (2).

## **2.2 Fixação**

O processo de fixação impede que o tecido passe pelos fenômenos químicos da decomposição após ser retirado do organismo. Quando o tecido é removido do organismo, ou o paciente está morto, ele deixa de ser oxigenado e moléculas de dióxido de carbono começam a se acumular fazendo com que enzimas lisossomais atuem sobre a próprias células, processo chamado de autólise. Sendo assim, a fixação é fundamental para que a estrutura do tecido se mantenha o mais próximo possível do seu estado homeostático (3).

A fixação pode ser realizada através de métodos físicos (frio e calor), ou químicos (líquidos fixadores), ou com a combinação dos dois métodos. A combinação química é mais utilizada e é dividida em duas categorias: fixadores coagulantes, ou não aditivos, por não se ligarem às proteínas e a segunda categoria é dos fixadores não coagulantes, ou aditivos, estes se ligam às proteínas (4).

Quando o tecido é mergulhado em uma solução fixadora coagulante, ele apresenta alterações na sua coloração e opacidade. Essas alterações ocorrem devido a coagulação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, entre outras substâncias presentes no tecido (4). Após a coleta através de procedimento cirúrgico, a amostra deve ser imediatamente colocada em uma solução fixadora. A penetração dos fixadores no tecido o torna rígido e a sua decomposição será interrompida. A solução de formol a 10% tamponado é o fixador ideal para imuno-histoquímica e reações de biologia molecular, aplicados em conjunto dos procedimentos de rotina com Hematoxilina e Eosina (HE) e histoquímica (3).

O volume de fixador deve ser 20 vezes o volume do fragmento e o tempo de fixação varia de acordo com a sua espessura, para peças cirúrgicas grandes é recomendado que elas

sejam fatiadas de maneira a se tornarem mais finas para facilitar a penetração do fixador (3).

### **3 DESCALCIFICAÇÃO**

A descalcificação é um processo importante para a remoção dos sais de cálcio com objetivo de amolecer o tecido evitando a formação de artefatos, impedindo que eles danifiquem o fio da navalha, o que prejudica a qualidade do corte e posteriormente a análise histológica. Esse procedimento é realizado após a fixação com métodos físicos ou químicos (2). O método químico pode ser realizado utilizando ácidos ou resinas de troca iônica, também há descalcificação física (2).

Os descalcificadores ácidos são divididos entre Ácidos Fortes e Ácidos Fracos, que agem solubilizando sais minerais, removendo o cálcio dos sais de carbonato ou fosfato presente no osso, entretanto possui como desvantagem a ocorrência da dilatação e hidrólise da matriz óssea e destruição de enzimas, ácidos nucleicos e polissacarídeos (2).

#### **3.1 Métodos histoquímicos**

Mistura de tampões e agentes quelantes são os dois procedimentos histoquímicos de descalcificação, esses métodos são adotados quando há interesse em preservar enzimas (fosfatase alcalina e desidrogenases), ácidos nucleicos e polissacarídeos (glicogênio) presentes no tecido ósseo, o que não é possível utilizando descalcificadores ácidos (2).

A mistura de tampões remove o cálcio dos ossos por imersão em solução de tampão de citrato com pH 4,5. Entretanto, esse método tem a desvantagem de a fosfatase alcalina ser reativada após neutralização com a solução de sódio barbital. O método usando agentes quelantes é lento, mas não causa danos ao tecido, a sua inativação da fosfatase alcalina também pode ser revertida e a descalcificação por este método não produz artefatos (2).

#### **3.2 Descalcificação Física**

### **3.2.1 Descalcificação eletrolítica ou ionização elétrica**

É um método rápido que aproveita o campo elétrico entre dois eletrodos e faz com que os íons de cálcio migrem do osso (anodo) para o eletrodo de carbonato (catodo), a temperatura não pode passar de 45°C. Após a descalcificação as peças devem ser neutralizadas com solução de sulfato de sódio a 5% por 24 horas, isso evita a formação de artefatos durante a coloração. Após a neutralização, as peças devem ser lavadas em vários banhos de água por no máximo 48 horas (2).

### **3.2.2 Descalcificação com auxílio das micro-ondas ou ultrassom**

Este método reduz o tempo de descalcificação de dias, para horas. O calor produzido pelas micro-ondas aumenta a dinâmica molecular acelerando as reações químicas entre a peça e a mistura descalcificadora escolhida para o procedimento. O método com ultrassom também acelera a descalcificação através da agitação molecular, mas sem elevar a temperatura, mantendo as estruturas celulares (2).

## **4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

O processamento histológico pode ser feito manualmente ou usando um processador, é um procedimento realizado após a fixação e é composto por três etapas: desidratação, diafanização e impregnação (3).

A desidratação é um procedimento que remove completamente a água do tecido usando-se geralmente álcool etílico, entretanto este procedimento deforma o tecido devido à contração dos espaços onde a água é retirada. Para manter o tecido próximo à sua forma original estes espaços são preenchidos com misturas de parafinas e polímeros, sendo esse processo chamado de impregnação (3). A diafanização, também conhecida como clarificação, é um procedimento adotado para remover o álcool do interior dos tecidos, a água e o álcool precisam ser removidos pois não se misturam homogeneamente com a parafina. Para a remoção do álcool é utilizado o

xilol, que além de substituir o álcool torna o tecido mais claro, por isso esse procedimento também é conhecido como clarificação (2).

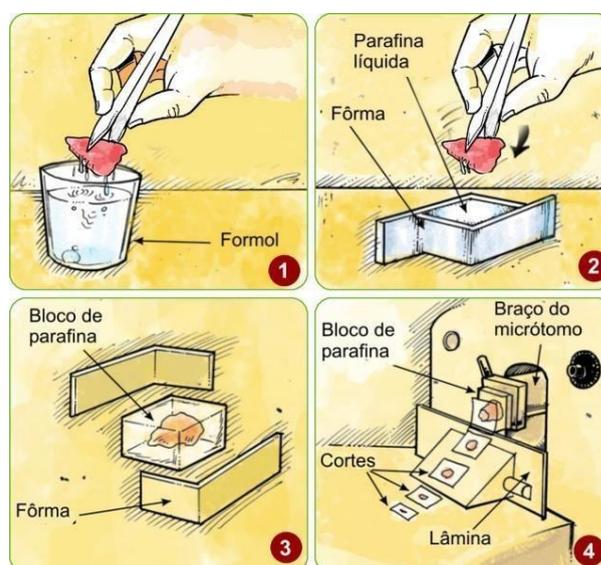
A impregnação é realizada em estufa a 60°C onde o tecido deve ser mergulhado em parafina para que o xilol seja substituído pela parafina (2).

## 5 INCLUSÃO

Nesta parte do procedimento a amostra do tecido será submetida à parte de corte, necessitando de um suporte que permita efetuar o processo. Chama-se inclusão o ato de emblocar esse fragmento em um meio que deve ser obrigatoriamente o mesmo em que foi embebido (3).

Na parte seguinte, de corte, os fragmentos emblocados seguem alguns critérios técnicos de posicionamento e na sua ordenação durante o processo de inclusão para uma melhor qualidade de corte. Após a inclusão os blocos são colocados em forma com gelo e enviados ao congelador para endurecer e permitir o corte com melhor qualidade (3).

**Figura 1:** Fixação ao corte. 1 – Fixação; 2 – Impregnação; 3 – Amostra em bloco de parafina após a impregnação; 4 – Microtomia (corte). (Fonte: <https://biologianota10.com.br/post/6/a-preparacao-de-laminas-para-a-visualizacao-no-microscopio-de-luz>)



## 6 MICROTOMIA

Para que seja possível a análise de tecidos em microscópio são necessárias fatias extremamente finas obtidas por um micrótomo. Para o procedimento de corte: navalha, banho-

maria histológico, pinça, pincel, lápis e lâminas (2). O bloco retirado do congelador é fixado ao micrótomo, aparado até que todo o fragmento seja exposto e submetido ao corte (3).

## **7 TÉCNICAS CITOLÓGICAS**

As técnicas citológicas são fundamentais no diagnóstico de tumores, função hormonal e infecções parasitárias. Em 1942, dr. George N. Papanicolau, estabeleceu os conceitos básicos da interpretação citológica e método de coloração que são utilizados até hoje, o exame Papanicolau é nomeado assim em sua homenagem (2).

Na citopatologia as células são analisadas individualmente e como os materiais biológicos possuem características diferentes por suas diversas formas de organização e composição, a coleta do material também é uma etapa fundamental, existindo métodos específicos de acordo com o material a ser coletado (2).

Os procedimentos para a avaliação citológica são menos invasivos e muitas vezes dispensam o uso de anestesia, possibilitando resultados mais rápidos e de baixo custo. Entretanto, o material citológico deve ser coletado com qualidade e em boa quantidade para a precisão do diagnóstico, uma vez que amostras escassas ou com artefatos podem levar a má interpretação diagnóstica e a resultados inconclusivos (5).

### **7.1 Coleta**

O material de origem para análise citológica pode ser obtido de diversos locais: íquidos orgânicos (urina, líquido, líquido ascítico, pericárdico, sinovial), punções aspirativas por agulha fina (pulmão, mama, tireoide, linfonodos, dentre outros), secreções (escarro, abscesso e fístula), lavados cavitários (brônquicos e broncoalveolares, vesiculares) e raspados (cervicovaginal, ocular). As amostras são classificadas em três grupos conforme a tabela 1 (2).

**Tabela 1:** Tipos de amostras, sua origem e forma de coleta (Fonte: MORRETI & KLEEB)

<b>Classificação da amostra</b>	<b>Método de coleta</b>	<b>Origem da amostra</b>
Distensão celular (esfregaço)	Raspagem <i>swab</i>	Colpocitologia
		Olhos
		Lavado brônquico
	<i>Imprint</i> ou decalque	Lesões cutâneas
		Biópsias
		Peças cirúrgicas
	Punção aspirativa	Sangue
		Lavado brônquico
		Líquor espinhal
Amostras Pastosas	Expectoração	Escarro
	Punção ou drenagem	Abscessos
		Massas necróticas
Amostras Líquidas	Espontânea ou por catéter	Urina
	Escovação	Líquido sinovial
	Escovação ou lavado	Líquido peritoneal ou ascítico
Amostras Líquidas	Punção	Líquido pleural
		Líquido peritoneal ou ascítico
		Líquido pericárdico
		Lavado brônquico alveolar
		Lavado vesical
		Líquido estomacal
		Líquido sinovial

### 7.1.1 Esfregaço

O esfregaço, ou distensão celular, é feito ao se esfregar uma leve camada de fluídos sobre uma lâmina de vidro para visualização no microscópio (2). Existem vários métodos que

podem ser aplicados de acordo com o material que será analisado, mas o cuidado com a amostra sempre deve ser tomado para se evitar a distorção celular, que pode ser causando usando força

excessiva ou esfregando a mostra em mais de uma direção, o que torna a amostra insatisfatória para análise (5).

### **7.1.2 Materiais biológicos utilizados**

Para líquidos em geral (lavado broncoalveolar, brônquico, líquido peritoneal, entre outros) é introduzido líquido de solução salina tamponada na cavidade a ser analisada e em seguida todo o material é aspirado. (5). Os raspados são coletados de superfícies cutâneas ou mucosas usando lâminas de bisturi, *swabs*, espátulas ou escovas apropriadas. São feitas de duas a três raspagens da área a ser analisada sendo recomendável não lavar a área ou usar medicações para não prejudicar a amostra. O material coletado deve passar por esfregação em lâmina de vidro e imediatamente fixado em álcool a 95% (5).

## **8 FIXAÇÃO (CITOLÓGICA)**

O principal objetivo da fixação é preservar a morfologia celular e a composição química das células após a sua retirada do organismo, porém amostras mucoides ou líquidas, normalmente a fresco, necessitam de etapas complementares antes da coloração (que é feita após a fixação), se forem líquidos, estes devem ser centrifugados, preparar os esfregaços a partir do sedimento e fixar em seguida; se mucoides, precisam ser pré-tratados ou homogeneizados antes da centrifugação, fixando-os após secar ao ar (5).

### **8.1 Pré-fixação**

Técnica utilizada para manter a preservação de espécimes líquidos (trato respiratório, trato urinário ou gastrointestinal), mantendo a morfologia celular até realização do esfregaço.

### **8.3 Citoinclusão - *Cell blocks***

É uma técnica complementar na análise de fluidos que também pode ser aplicada a

materiais pastosos para visualização da arquitetura tecidual em microscópio. Após a

centrifugação do material, seu sedimento deve ser inserido em líquido fixador, variando de acordo com o fixador utilizado. O material deve ser centrifugado novamente por dois minutos e envolvido em papel de filtro, seguindo as mesmas etapas das biópsias convencionais (5).

#### **8.4 Fixação**

Existem mais de uma de uma técnica para se realizar a fixação, de acordo como material a ser fixado. A fixação pode ser: úmida, de cobertura, mista ou a seco (5).

**Fixação úmida:** O esfregaço deve ser imerso na solução fixadora enquanto ainda estiver úmido, assim, as células não ressecam evitando artefatos celulares. O fixador mais utilizado é o etanol a 95% (5).

**Fixação de cobertura:** Deve ser aplicado com o esfregaço ainda úmido, deixando a lâmina secar por 10 a 15 minutos, entretanto não é recomendado para esfregaços de materiais líquidos ou materiais hemorrágicos. São utilizados agentes que fixam as células e formam uma espécie de filme protetor sobre o esfregaço. Esse filme permite que o transporte seja realizado com caixas de madeira ou papelão de maneira mais segura. O fixador mais utilizado é o *Carbowax 4000*, concedendo até uma semana sem distorções celulares(5).

**Fixação mista:** É feita a fixação úmida seguida de exposição ao ar, mais utilizado para envio de esfregaços a laboratórios distantes. Após preparo do esfregaço, deve-se aplicar fixador líquido à lâmina, de preferência o etanol a 95%, retirando-as depois de 15 minutos para secar no ar. Após chegar ao laboratório de destino a lâmina deve ser colocada em etanol 95% novamente antes da coloração (5).

**Fixação a seco:** Utilizado para colorações hematológicas, os esfregaços devem ser secos em temperatura ambiente ou com movimentos ao ar para acelerar a secagem(5).

## **9 COLORAÇÕES PARA CITOLOGIA E HISTOLOGIA**

Constantemente em uma rotina histopatológica, é necessário realizar colorações

especiais, seja para visualizar componentes teciduais, evidenciar agentes etiológicos ou descartar diagnósticos diferentes. Isso porque após o processo de microtomia, as células e o material extracelular tornam-se habitualmente transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas (6).

Corantes são compostos orgânicos ionizáveis, entretanto incolores, necessitando da adição de cromóforos para haver coloração. A associação desses compostos resulta em cromógenos, que para se ligarem aos tecidos devem estar correlacionados com auxocromo (2). Corantes também podem ser naturais: hematoxilina, índigo, orceína, brasilina ou sintéticos (artificiais): derivados do benzeno, chamados corantes biológicos (6).

### 9.1 Procedimentos gerais para colorações

Para iniciar uma coloração, devemos retirar a parafina que fica impregnada nos tecidos e assim não impedir que os corantes penetrem nos elementos teciduais. O procedimento geral para qualquer coloração é o seguinte (3):

**Desparafinização:** é o processo de retirada da parafina após a microtomia, sendo realizado com xilol (3). Xilol I (10 min) → Xilol II (10 min)

**Hidratação:** A maioria dos corantes é diluído em água, e para fazer a hidratação deve-se usar soluções concentradas de álcool em quantidades decrescentes: 100%, 95%, 80%, 70% devendo o último banho ser com água, todos por 1 minuto. Porém, quando se utiliza um corante alcoólico, deve-se interromper a hidratação em álcool 70% (3)

**Coloração:** é a imersão propriamente dita dos cortes no corante (3).

**Desidratação:** Sendo os meios de selagem não miscíveis em água, é necessário fazer a retirada de água dos tecidos, para a confecção dos preparados histológicos permanentes (3).

Álcool 70% (1 min) → Álcool 80% (1 min) → Álcool 95% (1 min) Álcool absoluto I (3 min)

→ Álcool absoluto II (3 min).

**Clarificação:** utiliza-se o xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meiode selagem (3).

Xilol I (10 min) → Xilol II (10 min).

**Selagem ou montagem:** A etapa de montagem é a última no processo de preparação da lâmina para análise. O tecido já corado deve ser recoberto e preservado para melhor refração na microscopia, a fixação da lamínula de vidro sobre o corte histológico chama-se selagem (3).

Quando as lâminas estiverem prontas para a leitura, o conjunto de blocos dos quais foram confeccionados os cortes, são armazenados em gavetas de arquivos (madeira) e posteriormente colocados em caixas (papelão) até serem enviadas ao arquivo definitivo (3).

## 10 COLORAÇÃO DE ROTINA

A hematoxilina é um corante de fonte vegetal de cor roxo-azulado, porém não tem a capacidade de corar os tecidos, tendo que ser oxidada pela hemateínae associada a um mordente de alumínio ou ferro, devido a afinidade com o núcleo do tecido (4). A eosina, cora o citoplasma das células e é atraída pelos elementos básicos das proteínas, variando nas cores: rosa, laranja e vermelho, sendo um corante acidófilo. (7). A coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) é a principal coloração utilizada em histologia, devido à sua simplicidade e à sua capacidade de permitir uma grande visualização na quantidade de estruturas tecidulares (8).

## 11 COLORAÇÕES ESPECIAIS

Procedimentos realizados com coloração especial, ou específica são feitos pelo pesquisador ou patologista sempre que a lâmina corada por Hematoxilina & Eosina (HE) não for suficiente para diagnóstico; são utilizadas para: corar pigmentos, bactérias, fungos, substâncias amorfas, estruturas teciduais e para classificar as fibras que compõem o tecido examinado (3).

## 12 CONCLUSÃO

A histologia estuda diferentes tipos de tecido com o auxílio diferentes produtos químicos, alguns possibilitando a preservação da amostra, outros facilitando a visualização de determinadas estruturas na análise microscópica. As técnicas de processamento histológico visam fornecer formas de preservação dessas amostras de tecido para auxílio, ou confirmação, do diagnóstico de diversos exames laboratoriais voltados à patologia clínica.

## REFERÊNCIAS

1. MORETTI, J. T.; KLEEB, S. R. **Comparação entre os protocolos de processamento histológico rápido e tradicional em órgãos de murino em diferentes formas de conservação**, 2018. Disponível em: <<http://www.metodista.br/congressos-cientificos/index.php/CM2018/ECMS2018/paper/view/9731>>. Acesso em: 12 set. 2021.
2. CAPUTO et al., **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde**, Vol 2, Capítulo 3, pg 90, 2010. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Luzia-Caputo/publication/330740969\\_Conceitos\\_e\\_Metodos\\_para\\_a\\_Formacao\\_de\\_Tecnicos\\_em\\_Laboratorios\\_de\\_Saude/links/5c51ec8992851c22a39bd9bb/Conceitos-e-Metodos-para-a-Formacao-de-Tecnicos-em-Laboratorios-de-Saude.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luzia-Caputo/publication/330740969_Conceitos_e_Metodos_para_a_Formacao_de_Tecnicos_em_Laboratorios_de_Saude/links/5c51ec8992851c22a39bd9bb/Conceitos-e-Metodos-para-a-Formacao-de-Tecnicos-em-Laboratorios-de-Saude.pdf)>. Acesso em: 20 abril 2021.
3. NETO et al., **Técnico em Citopatologia - Caderno de referência 3: Técnicas de Histopatologia** – Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico\\_citopatologia\\_caderno\\_referencia\\_3.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_3.pdf)>. Acesso em 04 set. 2021.
4. NUNES, C. DE S.; CINSA, L. A. **PRINCÍPIOS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE ROTINA. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais - Animais e Humanos**

**Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 8, n. 1, 11 nov. 2016. Acesso em: 05 out. 2021.

5. NETO et al., **Técnico em Citopatologia - Caderno de referência 2: Citopatologia não Ginecológica** – Ministério da Saúde, 2012. Disponível em:

<[https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico\\_citopatologia\\_caderno\\_referencia\\_3.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_3.pdf)>

. Acesso em 23 out. 2021;

6. SANTOS et al., **Manual de técnica histológica de rotina e de coloração**, Universidade Federal de Pernambuco, 2021. [Internet]. Disponível em:

<<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40530/1/Manual%20de%20T%C3%A9cnica%20Histol%C3%B3gica%20de%20Rotina%20e%20de%20Colora%C3%A7%C3%B5es.%20SANTOS%20et%20al.%2C%202021.pdf>>. Acesso em 04 out. 2021;

7. ABRAHAMSOHN, P. & FREITAS, V., **Histologia interativa online**, versão 3.0, 2017.

[Internet]. Disponível em: <<https://mol.icb.usp.br/index.php/1-23-conceitos-basicos/>>. Acesso em 04 out. 2021;

8. RODRIGUES et al., **Técnicas de Coloração** – Laboratório Online, 2014. [Internet].

Disponível em: <<https://www.fcencias.com/2014/06/26/tecnicas-de-coloracao/>>. Acesso em 04 out. 2021.