

EQUIPAMENTO PARA COLORAÇÃO DE GRAM

Daniel Aparecido de Souza Dantas
Graduando em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru
daniel.dantas@fatec.sp.gov.br

Orientadora: Rogéria Maria Alves de Almeida
Bióloga Unesp Botucatu
Mestrado e doutorado pela USP São Paulo
Professora nível III Fatec,
Doutora em Microbiologia e Docente na Fatec Bauru
rogeria.almeida@fatec.sp.gov.br

RESUMO

No intuito de uma melhoria para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Bauru, foi construído um equipamento mecanizado para coloração de Gram. O método de coloração de Gram, usualmente é feito de forma manual, na maioria dos laboratórios, tornando um processo demorado e oneroso, e muitas vezes o contato com corantes, ou eventuais contaminações de microrganismos nas lâminas, pode ocasionar riscos ao profissional ou estudantes durante os procedimentos em aulas práticas de microbiologia. Desse modo o objetivo desse projeto, é elaborar um corador de lâminas, mecanizado, de baixo custo, que comporta 5 lâminas de microscopia, com bandejas acopladas para coleta de resíduos de corantes, evitando a contaminação do ambiente. O equipamento, foi montado sobre uma base de cantoneira de alumínio nas medidas de 28 cm de largura x 20cm altura, com partes da estrutura em plástico construídos na impressora 3D em Petg, onde comporta uma base sob medida para 5 lâminas de microscopia, com uma movimentação de 30° para uma secagem em temperatura ambiente, com bandeja acoplada para excesso de corantes, removível em acrílico para auxiliar com o manuseio, no processo de descarte. O corador de lâminas, será acoplado a uma secadora de lâminas, que foi feita recentemente resultado de um projeto do laboratório de microbiologia, desse modo o laboratório de microbiologia da Fatec Bauru, terá um sistema eficiente para a técnica de coloração de Gram, nas aulas práticas, tornado o processo mais rápido, sustentável, com manuseio adequado e organização no processo de coloração de Gram.

Palavras-chave: coloração de Gram; lâminas; equipamento.

1 INTRODUÇÃO

O método de coloração de Gram foi desenvolvido pelo médico Hans Christian Joachim Gram em 1884, buscando melhorias na visualização microscópica de amostras infectadas. Como muitos outros, Gram faleceu sem que recebesse os devidos créditos pelas suas descobertas. Coloração qual permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos, segundo Freitas e Picoli, (2007).

1.1 TÉCNICA COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram, é uma técnica usada no laboratório para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram negativas, onde utilizado coloração primaria com cristal violeta, mordente com iodeto de potássio e descoloração com álcool ou acetona. Bactérias Gram-positivas permanecem azuis e Gram-negativas com coloração rosa ou vermelha. (Tortora *et al.*, 2024)(Figuras 1, 1a e 1b).

Na observação microscópica pós-coloração de Gram, o material a observar deve ser previamente fixado, o que facilita a observação de bactérias, uma vez que têm reduzidas dimensões, fraco contraste e algumas refringência e mobilidade. A fixação é a coagulação do protoplasma bacteriano com o mínimo de deformação e sua colagem à lâmina. Como exemplos de agentes fixadores temos o calor, o formol e o éter .(Freitas e Picoli, 2007).

A coloração recorre do uso de corantes e permite aumentar o contraste e evidenciar a estrutura bacteriana. Estes são compostos orgânicos, com um ou mais anéis benzênicos que se encontram ligados a dois grupos funcionais, o cromóforo que é responsável pela cor do corante e o auxócromo que se dissocia ionicamente em solução dotando o corante de capacidade para reagir com os tecidos, células e estruturas celulares.

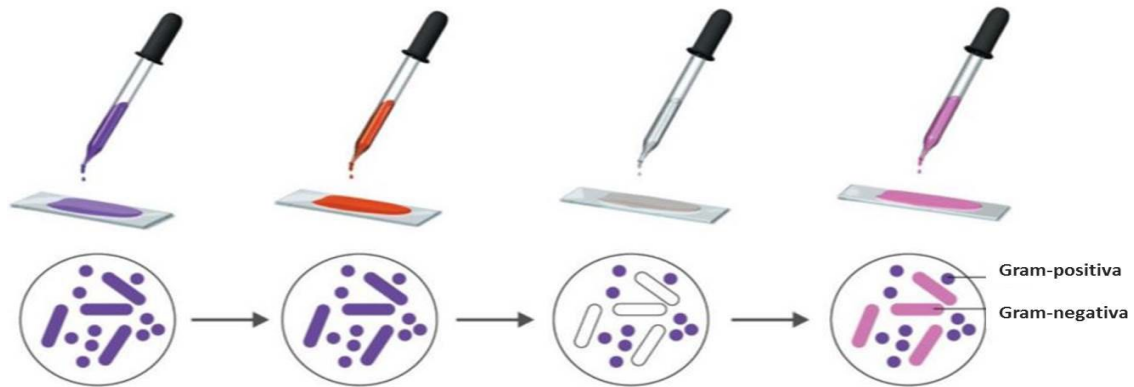
Podemos diferenciar dois tipos de corantes: os corantes ácidos (são negativos, formando sais com cátions) e os corantes básicos (são positivos, formando sais com ânions). Como as bactérias possuem carga eléctrica negativa, existe afinidade entre os corantes básicos e as estruturas celulares da bactéria, permitindo que esta fique corada. Para reforçar a ação do corante, aumentando a força de ligação deste, as estruturas celulares utilizam-se de mordentes como o ácido tânico, o ácido crômico, o ácido fênico, o iodo (Solutio de Lugol), o calor e os álcalis.

Os solutos corantes são compostos de várias substâncias, sendo geralmente hidro alcoólicos fenicados porque, além da substância corante, possuem água para permitir a dissociação iônica do corante; álcool para conservar e ácido fênico, que atua como mordente e como bacteriostático, evitando a contaminação das soluções corantes. Após a aplicação do corante, aplica-se um diferenciador, que serve para retirar o excesso de corante (acetona, ácido sulfúrico, álcool 95°). Os diferenciadores têm a capacidade de descolorar certas bactérias já previamente coradas e são usados em colorações policromáticas. (Freitas e Picoli, 2007).

A preparação de colorações policromáticas segue um protocolo constante, assim, sobre um esfregaço (células fixadas pelo calor), aplica-se:

O primeiro corante: Cristal violeta
 O mordente: Lugol
 O diferenciador : Fucsina
 A água (vai parar a diferenciação)
 O descorante : álcool 95^o -acetona
 Segundo corante (vai ser contrastante) segundo Freitas e Picoli, (2007).

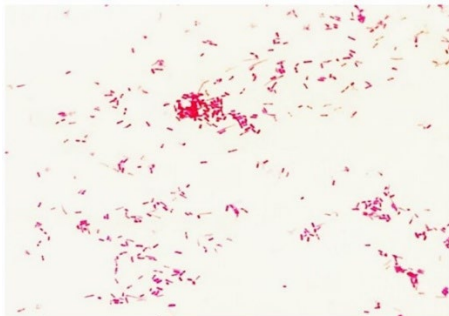
Figura 1: Demonstração de coloração Gram



Fonte: <https://image.slidesharecdn.com/microbiologiareviso-140602075917-phpapp02/95/microbiologia-reviso-20-638.jpg?cb=1401696002>

Figura 1 a – Característica tintorial de Gram Negativos

Figura 1 b- Características tintorial de Gram positivos



Fonte : Costa, Esteves e Nogueira (2024)

1.2 Controle de qualidade do método de coloração de Gram

O controle de qualidade é uma atividade obrigatória da rotina diária. Para realizar o controle de qualidade dos corantes e da coloração de Gram, é recomendado a utilização de duas cepas bacterianas: a Gram-positiva o *Streptococcus pyogenes* ATCC - American Type Culture Collection e a Gram-negativa deverá ser a *Escherichia coli* ATCC, que são cepas padrões catalogadas (Ministério da saúde Brasil, 2001).

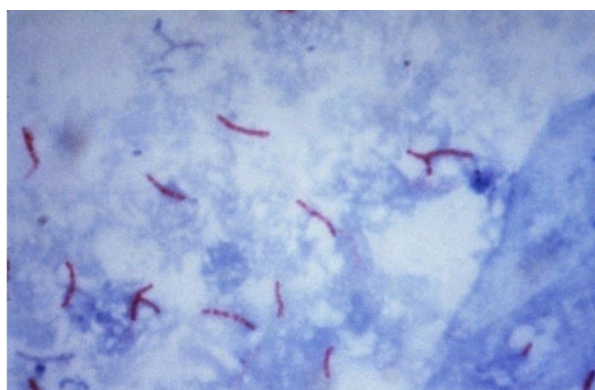
1.3 Técnica de coloração de Ziehl-Neelsen

A técnica de Ziehl-Neelsen é uma metodologia extremamente importante e rotineiramente uma das mais utilizadas na atualidade em bacteriologia clínica, para visualizar o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, que não

podia ser corado de forma eficaz pelos métodos tradicionais devido à sua parede celular única e diferenciada. (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022)

A coloração Ziehl-Neelsen, feita para identificação do gênero *Mycobacterium*, é um método diferencial utilizado na identificação de todos os bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Os principais grupos bacterianos detectados em laboratórios de análises clínicas por essa técnica, destacam-se o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde como agentes de problemas de saúde de grande relevância para a clínica humana. (Secretaria de Vigilância Sanitária, 2019). (Figura 2).

Figura 2- *Mycobacterium tuberculosis* corado por Ziehl- Neelsen



Fonte: Costa, Esteves e Nogueira (2024)

1.4 Limitações e controle de qualidade nas técnicas de coloração, segundo Costa, Esteves e Nogueira (2024):

1. Durante a execução de qualquer técnica de coloração devem ser usadas cepas controle, como por exemplo as ATCC (American Type Culture Collection), tanto para realizar o controle de qualidade dos corantes como para se certificar de que sua metodologia foi bem realizada.
2. Os corantes devem ser preparados seguindo os protocolos recomendados e mantidos em frasco âmbar, para não sofrerem a ação da luz, o que produz alterações variadas. Devem ser bem vedados para evitar a evaporação. É recomendado que sejam sistematicamente filtrados para retirada de cristais que normalmente precipitam no fundo do frasco.
3. As lâminas devem ser novas, previamente lavadas e desengorduradas antes de serem utilizadas.
4. A etapa da descoloração é crítica, pois a exposição prolongada ao solvente pode provocar a remoção total dos corantes utilizados, produzindo resultados questionáveis. A retenção ou não do corante primário depende, portanto, das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas, como espessura, densidade, porosidade e integridade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Construção do Protótipo

A construção do protótipo do equipamento para coloração de Gram foi feito no laboratório de Microbiologia da Fatec de Bauru.

O equipamento para coloração de Gram, foi elaborado para melhor organização e aproveitamento do espaço e organização, para realizar coloração de Gram de uma forma simples e eficaz.

O primeiro protótipo, foi construído com uma base da estrutura, com cantoneiras de alumínio com dimensões de 15 cm de largura x 11cm de altura, fixadas com rebite com base plástica para as lâminas do microscópio e uma bandeja para liquido excedente da coloração de Gram, em alumínio com bordas fixadas por imãs, segue a imagem abaixo (Figura 4).

O laboratório de Microbiologia da Fatec Bauru, atualmente realiza colorações de forma manual de acordo com a Figura 3, e esse equipamento mecanizado, pretende se modernizar, pois as aulas práticas de microbiologia, são importantes para a formação adequada do estudante do curso de Sistemas Biomédicos da Fatec Bauru.

Figura 3- Imagem atual sistema onde é feito coloração de Gram laboratório Fatec Bauru



Estrutura no laboratório Microbiologia Fatec Bauru

Figura 4- Imagem da primeira versão do equipamento para coloração de Gram



Bancada do laboratório de Microbiologia Fatec Bauru

Fonte:

Autor(2025)

Após testes de eficiência como tempo de execução, descarte de corantes, inclinação da base mecanizada, feito no laboratório de Microbiologia da Fatec Bauru, foram realizadas algumas adequações ao protótipo.

2.2. Materiais como alumínio, plástico e acrílico

Para a construção do equipamento foram escolhidos materiais resistentes leves e que podem ser reciclados facilmente. O alumínio pode ser derretido e refundido infinitas vezes sem perder suas qualidades, A reciclagem do alumínio economiza até 95% da energia necessária para produzir alumínio novo a partir da bauxita (minério). O plástico não é um material único, mas uma família de diversos polímeros. Cada tipo tem uma composição diferente e, por isso, devem ser separados para serem reciclados corretamente. O acrílico pode ser reciclado mecanicamente (triturado, derretido e remodelado) ou quimicamente (quebrado em seus monômeros para produzir novo acrílico de alta qualidade). A construção do equipamento foi feita basicamente com alumínio e plástico e as bandejas em acrílico ou Pteg, que o tornam leve, resistente, e dão proteção contra ação corrosiva dos

corantes, aliado ao fato de ser sustentável , pois as bandejas que foram acopladas para coletar os corantes, evitando a contaminação do ambiente.

3 MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa para localizar suportes para coloração de lâminas, e foram encontrados os seguintes suportes na imagem abaixo.(Figuras 5 e 6)

Figura 5: Suporte para coloração de Gram

:



Fonte :https://http2.mlstatic.com/D_NQ_NP_893995-MLB72293021688_102023-O.webp

Figura 6: Suporte para coloração de Gram sendo utilizado



Fonte :<https://i.ytimg.com/vi/QDh-xJC2cng/maxresdefault.jpg>

Com base nas pesquisas realizadas, elaborou-se um equipamento leve , prático de fácil manuseio

3.1 Desenvolvimento e fabricação do equipamento para coloração de Gram

O equipamento foi construído com esquadrias de alumínio com dimensões de 28 cm x 20 cm (Figuras 7 a 10)

Figura 7. Esquadrias de alumínio - vista lateral



Figura 8. Esquadrias de alumínio – vista inferior

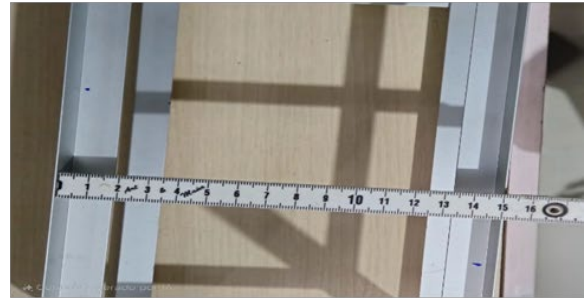


Figura 9. Esquadrias de alumínio -parte superior

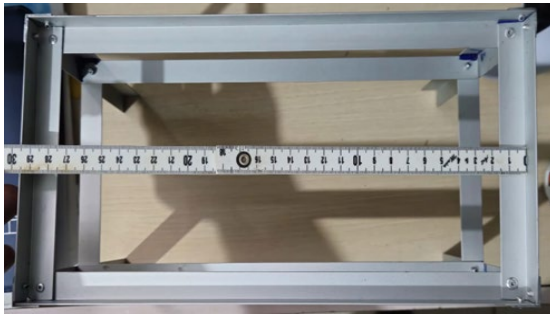


Figura 10. Esquadrias de alumínio completa



Fonte : Autor (2025)

4 RESULTADOS

Após testes em laboratório de Microbiologia, foram feitos ajustes no projeto para um melhor aproveitamento de material e fixação do coletor de corantes, que foi substituído por uma gaveta acrílica, no projeto foi reformulado para evitar respingo de material fora do coletor de excedentes de corantes.

O equipamento final foi montado com as esquadrias de alumínio (28cm x 20cm) , e na parte superior foi colocado uma plataforma mecanizada, feita em impressora 3 D com encaixe para 5 lâminas de Microscopia , e na parte inferior uma bandeja com dimensões de 25cm x 5cm, para coleta de resíduos de corantes (Figura 11).

Figura 11- Equipamento para coloração de Gram com suporte para 5 lâminas de microscopia



Fonte : Autor (2025)

A Figura 11 mostra que o corador de lâminas com capacidade para 5 lâminas , que facilita o processo de coloração, com uma bandeja acoplada, para descarte dos corantes, é sustentável.

Figura 12 – Bandeja coletora de corantes



Fonte: Autor (2025)

Na Figura 12, pode-se observar o descarte dos corantes, que serão armazenados em frasco de âmbar, para posterior degradação por ozônio, evitando a contaminação de esgotos e ambiente.

Figura 13- Lâminas coradas no secador de lâminas



Fonte : Autor (2025)

O laboratório de Microbiologia da Fatec Bauru, possui uma secadora de lâminas automatizadas, para secar 5 lâminas ao mesmo tempo, e vai ser acoplada ao corador de lâminas, que facilitará o processo de coloração de lâminas durante as aulas práticas

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes finais feitos durante as aulas práticas de microbiologia, evidenciaram que a inclinação da plataforma mecanizada com encaixe para 5 lâminas, permite a coloração simultânea de 5 lâminas, reduzindo o tempo de execução da coloração em 2 a 3 minutos, e o descarte dos corantes foi feito de forma adequada (cristal violeta, lugol e fucsina), facilitando o armazenamento de cada corante, em vidros de âmbar, para posterior degradação por ozônio ou outro método eficaz.

O equipamento corador de lâminas será acoplado a uma secadora de lâminas, elaborado por Silva *et al.*, (2025), que facilitará o processo de secagem das lâminas após coloração, tornando-o rápido e eficiente.

Existem no mercado corador de lâminas automatizado (Labtron, 2025), entretanto com custo elevado, que dificulta a aquisição para Instituições públicas, portanto o corador de lâminas mecanizado, de baixo custo, sustentável, é uma solução, mais viável prática para o laboratório de Microbiologia da Fatec Bauru.

O projeto foi executado com fins para melhoria e adequação de laboratório, visando em melhor aproveitamento de espaço com organização utilizando matéria prima de fácil acesso que por sua vez ao longo do tempo pode ser reciclado, material leve fácil transporte melhor aproveitamento de material para coloração de Gram, excesso de corantes, podendo ser descartado de uma forma correta com fácil manuseio.

6 REFERÊNCIAS

ANÁLISE DOS INFOGRÁFICOS SOBRE COLORAÇÃO DE GRAM. Disponível em: <https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/9382>
Acesso em: 11 set.2025.

FREITAS, V.R; PICOLI, S.V.A coloração de Gram e as variações na sua execução. Newslab, SC, p124 -128.2207. Disponível em: <https://docs.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Gram.pdf>.
Acesso em: 11 set. 2025.

LABTRON. Corador de lâminas LAGS – B10. Disponível em : <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/labtron-equipment/product-119240-1180201.html>.
Acesso em: 20 out. 25.

COLORAÇÃO DE GRAM. 2006. Disponível em: <https://www.infoescola.com/bioquimica/coloracao-de-gram/> de Gram
Acesso em: 14 set.2025.

COSTA, R.G; ESTEVES, W.T.C; NOGUEIRA, J.M.R. **Principais métodos clássicos de coloração em bacteriologia: aplicações, técnicas, fundamentos e limitações**. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde Programa Nacional de DST e AIDS. **Técnica de coloração de Gram**. Brasília, DF, 2001. Disponível em : https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em 12 out.2025.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis Ministério da Saúde; 2022. 492 p.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Secretaria da Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Ministério da Saúde; 2019. 364p.

SILVA, A.J et al. Desenvolvimento e caracterização de uma secadora de lâminas de baixo custo para laboratórios didáticos de microbiologia .In: BARRETO, N.S **Estudos multidisciplinares em Microbiologia :Teoria e Prática**. Ed .Cientifica Digital; Guarujá,SP .V.2 , 2025.

TORTORA,J.G et al. **Microbiologia** .E-book. 14 ed.Artmed:São Paulo,SP.2024.