



Volume

1

CONCEITOS E MÉTODOS para formação de profissionais em laboratórios DE SAÚDE

Organização
Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz


ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Paulo Ernani Gadelha Vieira

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretora

Isabel Brasil Pereira

Vice-diretor de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Maurício Monken

Vice-diretora de Ensino e Informação

Márcia Valéria Morosini

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Tecnológico

Sergio Munck

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diretora

Tânia Cremonini Araújo Jorge

Vice-diretora de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

Mariza Gonçalves Morgado

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Helene dos Santos Barbosa

Vice-diretora de Serviços de Referência e Coleções Científicas

Elizabeth Ferreira Rangel

Vice-diretor de Desenvolvimento Institucional e Gestão

Christian Maurice Gabriel Niel

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Volume 1

ORGANIZADORAS

Etelcia Moraes Molinaro

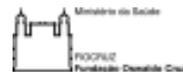
Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Maria Regina Reis Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Dantas Cruz

Copyright © 2009 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Conselho Editorial

Dr.^a. Ana Luzia Lauria Filgueiras
Dr.^a. Fátima Conceição Silva
Dr. Herman Schatzmayr
Dr.^a. Léa Camillo-Coura
Dr.^a. Lúcia de Brito Gitirana
Dra. Marcia Ferrão
Dr. Marco Antonio Ferreira da Costa
Dr.^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Dr.^a. Maria Regina Reis Amendoeira
Dr. Otílio Machado Pereira Bastos

Capa

Zé Luiz Fonseca

Projeto Gráfico e Editoração

Marcelo Paixão

Fotos

Rodrigo Mexas
Maria Eveline Castro Pereira
Moyses Gomes Marcelino

Desenhos

Newton Marinho da Costa Júnior

Revisão

Ana Lucia Proa Melo

Secretária Executiva da Coleção

Josane Ferreira Filho

Catálogo na fonte
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Biblioteca Emília Bustamante

M722c Molinaro, Etelcia Moraes

Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

290 p. : il. , tab.

ISBN: 978-85-98768-41-0

1. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 2. Pessoal de Laboratório. 3. Laboratórios. 4. Formação de Técnicos. 5. Saúde e Educação. I. Título. II. Caputo, Luzia Fátima Gonçalves. III. Amendoeira, Maria Regina Reis.

CDD 542.1

Autores

Cíntia de Moraes Borba

Bióloga, mestre e doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz. Pesquisadora Associada do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Cleide Cristina Apolinário Borges

Bióloga, especialista em Entomologia Médica pelo Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz.

Etelcia Moraes Molinaro

Bióloga, especialista em Criação e Manejo de Animais Silvestres pela Sociedade Nacional de Agricultura e em Zoologia pelo Conselho Regional de Biologia, mestre em Biologia Animal pela UFRRJ. Tecnologista Sênior em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Joel Majerowicz

Médico Veterinário, Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos pelo IOC/Bio-Manguinhos/Fiocruz. Tecnologista Sênior em Saúde Pública, Diretor do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Bióloga, especialista em Microbiologia e Análises clínicas, mestre em Microbiologia Veterinária pela UFRRJ e doutora em Ciências pela Ensp/Fiocruz, Tecnologista Sênior da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fiocruz. Professor colaborador da UFRJ e professor adjunto da Unigranrio.

Marcelo Pelajo Machado

Médico, doutor em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz, pós-doutor pelo Deutsches Krebsforschungszentrum, Alemanha, Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz, Chefe do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Marco Antonio Ferreira da Costa

Engenheiro Químico licenciado em Química, mestre em Educação pela Unesa, mestre em Psicopedagogia, Universidade de La Habana, doutor em Ciências, Instituto Oswaldo Cruz/IOC e professor-pesquisador da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira

Biomédica, especialista em Microbiologia (Sobeu) e Liofilização pela Edwards, Crowley, Inglaterra, mestre em Educação pela Unesa, doutoranda em Ensino em Biociências e Saúde pelo IOC/Fiocruz. Tecnologista Sênior em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Maria Eveline de Castro Pereira

Administradora, mestranda no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ensino de Biociência e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. Analista em Ciência e Tecnologia do IOC/Fiocruz.

Mônica Mendes Caminha Murito

Engenharia Química e mestre em Biociências e Saúde pelo IOC/Fiocruz. Pesquisadora visitante da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Paulo Roberto de Carvalho

Químico Industrial, especialista em Gestão Ambiental pela Unesa, mestre em Sistemas de Gestão em Segurança do Trabalho pela UFF e doutor em Ciências pelo IOC/Fiocruz. Professor-pesquisador da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fiocruz.

Pedro Paulo de Abreu Manso

Técnico em Histologia pela Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, biólogo e mestre em Ciências pelo programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/IOC. Tecnologista em Saúde Pública do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, e Professor de Biologia da Secretaria Estadual de Educação.

Sebastião Enes Reis Couto

Médico Veterinário. Especialista em Planejamento e Produção de Animais de Laboratório, Gnotobióticos e Livre de Germes Patogênicos Específicos/SPF. Tecnologista Sênior em Saúde Pública do Centro de Criação de Animais de Laboratório/Cecal da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Silvio Valle Moreira

Médico Veterinário, Pesquisador Titular da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio e coordenador de cursos de Biossegurança na Fundação Oswaldo Cruz.

Simone Ramos

Bióloga, especialista em Virologia pelo Instituto Paulo de Góes – UFRJ, mestre em Ciências - Instituto Paulo de Góes – UFRJ.

Wildeberg Cal Moreira

Médico Veterinário, mestre em Tecnologia de Imunobiológicos pelo IOC/Bio-Manguinhos/Fiocruz. Tecnologista Pleno em saúde pública do Cecal/Fiocruz

Virgínia de Lourdes Mendes Finete

Química e mestre em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Professora de Química na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Sumário

Prefácio	11
Apresentação da coleção	15
Apresentação pelas organizadoras	17
Capítulo 1. Biossegurança e boas práticas laboratoriais	21
Capítulo 2. Conceitos e técnicas básicas aplicadas em laboratório	67
Capítulo 3. Microscopia da luz	125
Capítulo 4. Animais de laboratório	155
Capítulo 5. Fundamentos em química experimental	223

PREFÁCIO

O Chico Trombone costumava me dizer:

– Isso eu sei fazer, Dr. Luiz Fernando, aprendi com Joaquim Venâncio. E era com orgulho que se referia a seu mestre.

Vimos, portanto, que a formação de técnicos já vem dos tempos de Oswaldo. É claro que não era institucionalizado como hoje. Eram outros tempos.

Joaquim Venâncio nasceu na fazenda Bela Vista, em Minas Gerais. Era a fazenda da mãe de Carlos Chagas, pai. Em 1916, veio trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz. Veio e deu certo. O Dr. Lutz teria dito certa vez:

– Não troco o Venâncio por nenhum doutor de Oxford ou de Cambridge.

Se não disse, pensou.

Eficiência nos processos de seleção de pessoal? Competência do serviço de recursos humanos? Evidentemente que não. Não havia nada disso nessa época. As coisas eram muito mais simples, e davam certo. Veio porque era amigo do velho Carlos Chagas. Amigos de infância. Brincaram juntos na fazenda.

Quando Joaquim Venâncio faleceu, em 27 de agosto de 1955, teve seu necrológio publicado na *Revista Brasileira de Biologia*. Lugar de ne-

crologio de cientista famoso. Cito textual: “Joaquim Venâncio conseguiu, durante cerca de 35 anos que trabalhou ativamente, aprender zoologia que conhecia de modo invejável. Como decorrência das contingências da vida, não teve oportunidade de instruir-se, mas sua mentalidade era de um homem culto. Pela convivência com o Dr. Lutz, pela observação direta do que via nas excursões e no laboratório, adquiriu conhecimento detalhado de vários grupos zoológicos, principalmente anfíbios, moluscos fluviais e trematódeos. Chegou a conhecer muito bem os anfíbios e, com grande facilidade, os classificava nas excursões pela voz. Dadas as indicações feitas pelo Dr. Lutz em seus trabalhos, há casos em que foi citado na literatura como colaborador direto”.

Joaquim Venâncio era, sem dúvida, um naturalista. Era competente, tinha o domínio do ofício, a maestria da arte.

E gostava de ensinar. Ensinou muita gente.

Certa vez, o Venancinho me disse:

– Era a Escola do Venâncio, né? Foi muito boa, né?

* * *

Na presidência de Sergio Arouca, resolvemos atualizar a “Escola de Venâncio”. E foi assim que surgiu a Escola Politécnica, com o nome do seu patrono. Cresceu e abriu várias frentes, desde a vocação científica aos cursos de nível médio complementados pela formação de técnicos. Foi um êxito, como a antiga. Aparece sempre nos primeiros lugares nas avaliações e já se estendeu a outras instituições.

* * *

E agora surgem os livros didáticos. Organizado por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoira, vem à luz a coleção ***Conceitos e Métodos para a Formação de***

Técnicos em Laboratórios de Saúde, reunindo professores de várias unidades da Fiocruz.

Os capítulos oferecem a história da técnica, os seus fundamentos, a maneira moderna de realizá-la, as suas aplicações, a organização do laboratório etc.

É útil para os cursos da Fundação e para outros externos. Mostra, também, o quanto as unidades da Fiocruz estão integradas na realização de suas tarefas.

Ensino é questão primordial. Sem ele, o país não se desenvolve.

Está de parabéns a Fiocruz pela realização de mais uma tarefa de primordial importância.

Oswaldo Cruz está orgulhoso dos seus continuadores.

Luiz Fernando Ferreira

Pesquisador Emérito da Fundação Oswaldo Cruz

Apresentação

A coletânea de livros intitulada **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, organizada por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira é antes de tudo uma obra original, importante e necessária. Original porque não existe na literatura técnica em saúde, na área biomédica brasileira e internacional, pelo menos que eu saiba, algo semelhante em abrangência, profundidade e seleção dos temas abordados; importante pelo público alvo a que se destina, muito além da “Formação de Técnicos de Laboratórios”, abrangendo certamente todos os profissionais de saúde, e é necessária porque servirá como obra de referência para a formação dos mencionados técnicos e de consulta obrigatória para todos os profissionais de saúde que necessitem de esclarecimento dos aspectos técnicos ali abordados.

Versada em cinco volumes e 22 capítulos, organizados em sequência lógica, desde a biossegurança e boas práticas de laboratório, passando por todos os fundamentos das técnicas laboratoriais, bioquímica básica, biologia celular e molecular, histologia e ultraestrutura, até atingir o cerne da prática laboratorial, da imunologia à infectoparasitologia – virologia, bacteriologia, micologia, protozoologia e helmintologia e seus vetores, com a entomologia médica e a malacologia. Os autores que escrevem os respectivos capítulos,

são do melhor nível intelectual e científico, com a titulação de mestres, doutores e especialistas, com grande experiência prática nos assuntos de que tratam.

Parabenizo o Instituto Oswaldo Cruz e a Escola Politécnica Joaquim Venâncio, que patrocinaram esta obra de referência, os quais, desde seus primórdios, valorizaram a qualidade da formação dos seus técnicos e com eles povoaram e estão povoando o Brasil de Norte a Sul e de Leste a Oeste com o que temos de melhor – os fundamentos para uma boa pesquisa. Aproveito esta oportunidade para homenagear a figura de Henry Willcox, que no início da década de 1980, quando o convidei para me ajudar na coordenação dos cursos de pós-graduação em Biologia Parasitária e Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, foi o grande incentivador para criarmos paralelamente o Curso de Técnico em Pesquisa, do qual foi o seu primeiro coordenador.

Igualmente parabenizo as organizadoras desta coletânea e a Fiocruz como um todo, pelo lançamento desta obra pioneira.

José Rodrigues Coura

Pesquisador Titular Emérito
Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC/Fiocruz

“Um sonho quase realizado”

(Oswaldo Cruz 1872-1917)

As alterações pelas quais passa o mundo com a globalização trazem como consequência o surgimento de novos paradigmas tecnológicos, fazendo-se necessário que o ensino da área da saúde atenda às exigências do mundo moderno, do trabalho e do atual perfil do técnico da área.

Os cursos para a formação de técnicos da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz buscam demonstrar os princípios científicos envolvidos com as técnicas laboratoriais, preparando os alunos para as transformações no mundo do trabalho em saúde, decorrentes do desenvolvimento tecnológico e científico. Neste contexto, duas Unidades Técnicas Científicas desta instituição, o Instituto Oswaldo Cruz – IOC e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – EPSJV, historicamente são as responsáveis por coordenarem cursos e especializações técnicas que se firmaram como modelos desses princípios. Essas Unidades, na área de ensino técnico, sempre estiveram intrinsecamente ligadas, e os professores realizam permanente parecerias entre si. Muitos de nós, egressos desses cursos, são hoje docentes e autores desta coleção.

Além da formação técnica de profissionais em nível regional e nacional, intensificou-se, na Fiocruz, a demanda para o estabelecimento de cooperações técnicas internacionais, que por sua expertise e capacidade de produzir, pas-

sou a divulgar conhecimentos, elaborando cursos, metodologias e tecnologias educacionais. A Escola Politécnica é Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a educação de técnicos em saúde, desde 2004.

A ideia da publicação dessa coleção surgiu da necessidade conjunta das duas Unidades da Fiocruz de produzir material didático, que atendesse aos alunos dos cursos de Nível Técnico em Saúde da Fiocruz e de outros locais. Desse modo, o nosso principal desafio é oferecer conteúdo que abarque toda a área técnica de saúde utilizada nos principais cursos de nível médio, e, que ao mesmo tempo, possa manter-se suficientemente atualizado.

Dada a complexidade da estrutura instrumental e pedagógica dos Cursos Técnicos, se fez necessária a publicação de uma coleção, escolhendo-se tópicos de importância básica. Para tanto, foram convidados pesquisadores/professores com experiência em ensino de Cursos de Nível Técnico e de destacado conhecimento nos temas abordados nos 22 capítulos, que constituem os cinco volumes da coleção.

A coleção **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** tem como objetivo integrar conhecimentos teóricos e práticos, proporcionando ao aluno informações que possibilitem uma permanente reflexão de seu papel como agente transformador dos processos e atividades de ensino, pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Outro objetivo inconteste destes livros é servir para professores, como norteadores da definição curricular de seus cursos.

Visando garantir a autonomia dos autores, e respectivas responsabilidades, foi mantida a formatação original dos textos, inclusive as fotos, figuras, diagramas. Podem ocorrer também, algumas repetições de conteúdo em alguns capítulos, mas, a nosso ver, a retirada de partes de capítulos já abordadas poderia descontextualizar o texto.

O pontapé inicial deste sonho só foi possível pelo incondicional apoio dado pelo professor André Paulo da Silva Malhão, pela Dra. Isabel Brasil Pereira, pessoa-chave desencadeadora do processo, e pela Dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge, que apoiaram e incentivaram institucionalmente este projeto. Agradecemos especialmente aos autores que abraçaram este trabalho com muito entusiasmo e que possibilitaram a sua concretização. É um carinho especial para Josane Ferreira Filho pela organização paciente de nossas reuniões e textos, com a gratidão das organizadoras e autores.

Agradecemos em especial aos renomados cientistas eméritos da Fundação Oswaldo Cruz, doutores Luiz Fernando Ferreira – patrono da EPSJV – , José Rodrigues Coura, que nos deram a honra de apresentar esta coleção.

Esperamos assim, estar contribuindo para a sistematização do conhecimento dos leitores sobre os diversos tópicos abordados em cada capítulo, apresentando cada assunto de forma didática e sintética, recomendando a consulta à literatura especializada sempre que houver necessidade de aprofundamento do conhecimento em determinados temas.

Etelcia Moraes Molinaro
Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Maria Regina Reis Amendoeira
Organizadoras

Capítulo 1

Biossegurança e boas práticas laboratoriais

Cíntia de Moraes Borba
Marco Antonio F. da Costa
Maria Eveline de Castro Pereira
Paulo Roberto de Carvalho
Silvio Valle

Introdução

O laboratório é um ambiente extremamente hostil. Convivem no mesmo espaço equipamentos, reagentes, soluções, microrganismos, pessoas, papéis, livros, amostras, entre outros elementos. Para que esse sistema funcione de forma adequada e segura, torna-se necessário:

- Disciplina;
- Respeito às normas e legislações pertinentes;
- Trabalhar no contexto da qualidade e da Biossegurança;
- Consciência ética.

O ambiente laboratorial deve ser entendido como um sistema complexo, onde existem interações constantes entre os fatores humanos, ambientais,

tecnológicos, educacionais e normativos. Essas interações, muitas vezes, favorecem a ocorrência de acidentes.

Um instrumento que pode contribuir para a minimização dessas ocorrências desagradáveis é a Biossegurança, definida como:

Conjunto de estudos e ações destinados a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o meio ambiente.

Nessa linha, devemos entender os conceitos de perigo, risco e acidente.

PERIGO, RISCO,
ACIDENTE ⇒

O perigo é uma possibilidade de causar danos, o risco é a probabilidade de concretização desse perigo e acidente é a concretização desse risco.

BIOLÓGICO ⇒

Relativo a, ou próprio dos seres vivos (*Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa*).

No Brasil, a Biossegurança possui duas vertentes:

- A 'legal', que trata das questões envolvendo a manipulação de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e pesquisas com células-tronco embrionárias, e que tem uma lei, a de nº 11.105, chamada Lei de Biossegurança, sancionada pelo governo brasileiro em 24 de março de 2005 (SILVA, PELAEZ e VALLE, 2009; VALLE, 2009; VALLE e BARREIRA, 2007).
- A 'praticada', aquela desenvolvida, principalmente, nas instituições de saúde e laboratórios em geral, que envolve os riscos por agentes químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e psicossociais,

presentes nesses ambientes, que se encontra no contexto da segurança ocupacional (COSTA e COSTA, 2009; COSTA e COSTA, 2005, 2006; VALLE e TELLES, 2003; CARVALHO, 1999).

Este capítulo, portanto, tem como objetivo apresentar, de forma didática, algumas características da Biossegurança e da qualidade praticadas em espaços laboratoriais. Estando a Biossegurança e a qualidade alicerçadas, principalmente, na postura profissional, consideramos importante discutir, também, alguns conceitos relacionados à ética.

1. Facilitando a práxis da Biossegurança

O homem é um ser biológico, logo, um produto da natureza. Mas também é um ser social, isto é, um produto da cultura, do saber, das suas interrelações. De acordo com Schramm (2006),

o humano enfrenta seu estado de necessidade e precariedade de várias maneiras, inclusive com o saber-fazer racional e operacional da tecnociência. Ademais, neste século adquiriu a competência biotecnocientífica, que visa transformar e reprogramar o ambiente natural, os outros seres vivos e a si mesmo em função de seus projetos e desejos, fato que se torna, cada vez mais, motivo de grandes esperanças e angústias, consensos e conflitos, em particular do tipo moral.

As preocupações da citação anterior, oriundas do desenvolvimento técnico-científico do nosso tempo, vêm impactando de forma acentuada as relações humanas e, nesse sentido, torna-se importante compreender alguns conceitos como os de moral, ética, bioética, deontologia, diceologia, Comitês de Ética em Pesquisa, Comitês de Ética no Uso de Animais e as relações desses conceitos com o direito. A devida compreensão desses conceitos facilitará, sobremaneira, o entendimento das relações que envolvem a Biossegurança (GOLDIM, 2009).

O funcionário não tem moral. Ele agiu sem ética. Afinal de contas, o que é MORAL e o que é ÉTICA?

Normalmente, as palavras ‘moral’ e ‘ética’ são utilizadas como sinônimos, vinculadas a um conjunto de regras obrigatórias. Esta confusão ocorre há muitos séculos. A própria etimologia destes termos gera confusão, já que ética vem do grego ‘*ethos*’, que significa ‘modo de ser’, e ‘moral’ tem sua origem do latim, que vem de ‘*mores*’, significando ‘costumes’. Podemos definir esses termos da seguinte forma:

MORAL ⇒

É um conjunto de normas que regulam o comportamento humano. Estas normas são adquiridas pela educação, pela tradição e pelo cotidiano, ou seja, pelo processo de culturalização. A moral é algo pessoal e íntimo. Por exemplo: andar com os seios à mostra na praia não é moralmente aceito no Brasil, porém, em outros países isso é normal.

ÉTICA ⇒

É o conjunto de ‘valores’ que orientam o comportamento humano em sociedade. O que a caracteriza é a reflexão sobre a ação humana. Por exemplo: é ético jogar resíduo químico na pia?

‘Valores’ são normas, princípios ou padrões sociais aceitos ou mantidos por indivíduo, classe, sociedade, etc. Vásquez (1998) aponta que a ética é teórica e reflexiva, enquanto a moral é eminentemente prática. Uma completa a outra, havendo um interrelacionamento entre ambas, pois, na ação humana, o conhecer e o agir são indissociáveis.

Normas éticas, segundo Christofari (1998: 57),

dizem respeito ao “agir” humano. São aquelas que disciplinam o comportamento do homem, tanto o de foro íntimo e

subjetivo, quanto o de natureza exterior e social. Prescrevem deveres para a consecução de valores. Entretanto, não apenas implicam em juízos de valor, mas impõem a escolha de uma diretriz, de caráter obrigatório num determinado grupo social. Sua principal característica é a possibilidade de serem violadas.

E Bioética, o que é?

Existem várias definições para o termo Bioética, do grego 'bios' (vida) e ética. Podemos defini-la da seguinte forma:

BIOÉTICA ⇒

É uma área do conhecimento interdisciplinar (integração entre as disciplinas), cuja finalidade é compreender e resolver questões éticas relacionadas aos avanços tecnológicos da Biologia e da Medicina e questões que de alguma forma influenciam as nossas vidas.

A Bioética está apoiada em quatro princípios:

- Autonomia;
- Não-maleficência;
- Beneficência;
- Justiça.

Princípio da autonomia – É o respeito à vontade, à crença, aos valores morais do indivíduo e à sua intimidade. Discussões sobre os limites morais da eutanásia, do aborto, entre outros, estão no contexto deste princípio. As pessoas têm o direito de decidir sobre as questões relacionadas ao seu corpo e à sua vida. Em indivíduos intelectualmente deficientes, e no caso de menores de 18 anos, este princípio deve ser exercido pela família ou pelo responsável legal.

Princípio da beneficência – Assegura o bem-estar das pessoas, evitando danos, e garante que sejam atendidos seus interesses. Busca-se a maximização do benefício e a minimização dos agravos.

Princípio da não-maleficência – Assegura que sejam minorados ou evitados danos físicos aos sujeitos da pesquisa ou pacientes. É universalmente consagrado através do aforismo hipocrático *primum non nocere* (primeiro não prejudicar).

Princípio da justiça – Exige equidade, ou seja, a obrigação ética de tratar cada indivíduo de acordo com o que é moralmente correto e adequado e de dar a cada um o que lhe é devido.

Em junho de 2005, em reunião na sede da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Unesco), para ser discutida a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, o Brasil teve um importante papel ao propor e conseguir a aprovação da inclusão neste documento dos campos ‘sanitário’, ‘social’ e ‘ambiental’. Esta declaração foi aprovada por aclamação em outubro de 2005, na 33ª sessão da Conferência Geral da Unesco.

O importante dessa declaração é que a Bioética não fica restrita às ciências da saúde, mas a tudo aquilo que de alguma forma tenha implicação sobre as nossas vidas. Portanto, entre as questões discutidas na Bioética, temos:

Aborto • Eutanásia • Clonagem • Pesquisas com/em humanos • Alimentos transgênicos • Fertilização *in vitro* • Uso de células-tronco embrionárias • Testes com novos medicamentos • Aquecimento global • Tratamento e disposição de resíduos, entre outros.

E o que é Deontologia?

A palavra ‘deontologia’ é originária do grego ‘*deontos*’ (o que é obrigatório) e ‘*logos*’ (estudo). Com isso, podemos defini-la da seguinte forma:

DEONTOLOGIA ⇒

É um tratado de deveres e/ou condutas que regem um profissional. O profissional está sujeito a uma deontologia específica para o exercício da sua profissão conforme o código de ética da sua classe.

Existem inúmeros códigos de Deontologia, sendo esta codificação da responsabilidade de associações ou conselhos profissionais. Normalmente, os códigos deontológicos têm por base as grandes declarações universais e esforçam-se por traduzir o sentimento ético expresso nestas, adaptando-o, no entanto, às particularidades de cada país e de cada grupo profissional. Estes códigos propõem sanções, segundo princípios e procedimentos explícitos, para os infratores do mesmo. Alguns códigos não apresentam funções normativas, tendo apenas uma função reguladora.

CÓDIGO DE ÉTICA – Visa à formação da consciência profissional sobre padrões de conduta de uma determinada classe.

E Diceologia?

Diceologia deriva do grego 'diceo' (direitos) e 'logos' (estudo). Portanto, podemos defini-la como:

DICEOLOGIA ⇒

É um tratado sobre os direitos profissionais de uma determinada classe, à luz do seu código de ética.

O que são os Comitês de Ética em Pesquisa?

Os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos são espaços acadêmicos que avaliam a adequação ética dos projetos de pesquisas que envolvam seres humanos. Quando a pesquisa envolve animais, esses comitês são chamados de Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUA).

No caso dos CEPs, esta avaliação é realizada à luz da resolução n. 196 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), de 10 de outubro de 1996, e no caso dos animais, à luz da Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, n. 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Todos os CEPs devem ser credenciados junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep). É uma comissão do CNS, criada através da resolução n. 196/96 e com constituição designada pela resolução n. 246/97, com a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pelo conselho. Tem função consultiva, deliberativa, normativa e educativa, atuando conjuntamente com uma rede de CEPs, organizados nas instituições onde as pesquisas se realizam. A Conep e os CEPs têm composição multidisciplinar com participação de pesquisadores, estudiosos de Bioética, juristas, profissionais da saúde, das ciências sociais, humanas e exatas e representantes de usuários.

Um instrumento obrigatório nos projetos de pesquisa que envolvem seres humanos é o 'Termo de Consentimento Livre e Esclarecido' (TCLE). A pesquisa só pode ser iniciada se todos os indivíduos participantes tiverem acesso aos objetivos da pesquisa, seus benefícios e possíveis riscos, mecanismos de proteção, endereço dos pesquisadores, e declararem (ou seus representantes legais) formalmente o aceite para a participação no estudo ou em terapias específicas. É uma decisão voluntária.

2. Legislação Brasileira de Biossegurança

A aprovação da Lei de Biossegurança (lei n. 11.105, de 24 de março de 2005) teve como motivação principal pôr fim aos impasses jurídicos sobre a liberação comercial dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), também conhecidos por transgênicos.

Apesar do amplo entendimento existente atualmente com a palavra biossegurança, como podemos constatar nos diversos artigos publicados, no contexto da Lei de Biossegurança vigente no Brasil ela só se aplica aos OGMs como previsto no:

Art. 1º – Esta lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados – OGMs e seus derivados, tendo como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.

O legislador, com o objetivo de esclarecer os limites da lei e enfatizar que ela se limita a uma determinada e específica biotecnologia, previu as seguintes definições:

Art. 3º – Para os efeitos desta Lei se considera:

I – organismo: toda entidade biológica capaz de reproduzir ou transferir material genético, inclusive vírus e outras classes que venham a ser conhecidas;

II – ácido desoxirribonucleico – ADN, ácido ribonucleico – ARN: material genético que contém informações determinantes dos caracteres hereditários transmissíveis à descendência;

III – moléculas de ADN/ARN recombinante: as moléculas manipuladas fora das células vivas mediante a modificação de segmentos de ADN/ARN natural ou sintético e que possam multiplicar-se em uma célula viva, ou ainda as moléculas de ADN/ARN resultantes dessa multiplicação; consideram-se também os segmentos de ADN/ARN sintéticos equivalentes aos de ADN/ARN natural;

IV – engenharia genética: atividade de produção e manipulação de moléculas de ADN/ARN recombinante;

V – organismo geneticamente modificado – OGM: organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética;

VI – derivado de OGM: produto obtido de OGM e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM.

A Lei de Biossegurança prevê que as demais biotecnologias que não envolvam a produção de OGMs e seus derivados, apesar de apresentarem trocas de genes e até a possibilidade de um certo grau de risco biológico, não são regulados por esse marco legal.

Existem alguns procedimentos básicos e necessários para a liberação comercial de um OGM: as condições básicas necessárias para que a instituição requerente solicite a autorização de uso comercial, a tramitação das solicitações na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), os critérios básicos para viabilizar a análise das solicitações, a tramitação de processos envolvendo a necessidade de estudos e de relatório de impacto ambiental, as condições para a existência de audiências públicas e a possibilidade de recursos administrativos por parte dos agentes interessados nas revisões das decisões tomadas pela CTNBio.

Toda instituição que utilizar técnicas e métodos de engenharia genética ou realizar pesquisas com OGM e seus derivados deverá criar uma Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), além de indicar um técnico principal res-

ponsável para cada projeto específico. Os critérios a serem observados na constituição da CIBio e os mecanismos de funcionamento foram estabelecidos através da resolução normativa n. 1, de 20 de junho de 2006.

A CTNBio é constituída por 27 membros titulares e respectivos suplentes, assim distribuídos: 12 especialistas de notório saber científico e técnico, em efetivo exercício profissional (três de cada uma das áreas de saúde humana, animal, vegetal e ambiental), nove representantes de órgãos, sendo um de cada respectivo ministério (ministérios da Ciência e Tecnologia, da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, do Meio Ambiente, do Desenvolvimento Agrário, do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, da Defesa, da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca e das Relações Exteriores) e seis especialistas representantes de organizações da sociedade civil (nas áreas de Defesa do Consumidor, Saúde, Meio Ambiente, Biotecnologia, Agricultura Familiar e Saúde do Trabalhador).

Dentre as competências da CTNBio, encontra-se a de emitir resoluções, de natureza normativa, sobre as matérias de sua competência. Para pedidos de liberação comercial, a decisão favorável deverá ter o voto de no mínimo 14 dos membros da CTNBio. O Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS) é um órgão de assessoramento superior do presidente da República, ao qual compete a formulação e a implementação da Política Nacional de Biossegurança, o estabelecimento de princípios e diretrizes para a ação administrativa dos órgãos e entidades federais relacionados à biossegurança, a análise de recursos interpostos pelos órgãos de registro e fiscalização a decisões de liberação comercial dos transgênicos e seus derivados efetuadas pela CTNBio, a análise dos aspectos de conveniência e oportunidade socioeconômicas e do interesse nacional nos processos de liberação comercial, quando submetidos ao conselho pela CTNBio, e sempre que entender necessário poderá avocar e decidir sobre qualquer processo de liberação comercial de OGM e derivado.

O CNBS decidirá sobre os recursos dos órgãos de registro e fiscalização relacionados à liberação comercial e encaminhados no prazo de trinta dias a partir da data de publicação da decisão da CTNBio. Depois de analisados os aspectos de biossegurança pela CTNBio, vencidos possíveis recursos e não havendo mais estudos adicionais que os órgãos de registro e fiscalização entendam necessários para atender às suas áreas de competência, ocorrerá o registro no órgão competente, podendo então ser utilizado comercialmente.

Quando a CTNBio entender que o transgênico é potencialmente ou efetivamente causador de degradação ambiental, bem como determinar a necessidade de licenciamento ambiental, o processo será encaminhado ao órgão competente do Ministério do Meio Ambiente.

Ao se apresentar o processo para liberação comercial, de acordo com a lei brasileira, pode-se perceber o grau de complexidade. O objetivo de criar uma lei capaz de agilizar a aprovação de OGM no país baseou-se fundamentalmente no fortalecimento dos poderes da CTNBio, em detrimento das competências dos órgãos de fiscalização e controle dos ministérios afins.

A inclusão de uma série de dispositivos burocráticos que garantem a possibilidade de recursos às decisões técnicas tomadas pela CTNBio pode fazer com que a lei de biossegurança, diferentemente das expectativas iniciais de simplificação e de agilização do processo de avaliação comercial, continue sendo a principal fonte de riscos e incertezas à comercialização dos transgênicos.

3. Contenção e infraestrutura laboratorial

A contenção laboratorial tem como objetivo reduzir a exposição da equipe de profissionais que trabalha num laboratório, seja na bancada ou mesmo na limpeza, a riscos biológicos, químicos e físicos, como a radiação ionizante.

Para se definir a contenção necessária, é importante uma análise de risco da atividade a ser desenvolvida nesse local, ou seja, quais os agentes químicos,

biológicos e físicos que serão manipulados. É importante que o profissional conheça a composição e os riscos associados a cada material com o qual vai trabalhar, podendo, para tanto, consultar o protocolo do experimento a ser realizado, a Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico (ABNT/NBR 14725) e/ou o Manual de Biossegurança.

Segundo o Ministério da Saúde, a contenção pode ser classificada como primária – que visa a garantir a proteção do ambiente interno do laboratório – e secundária, que está relacionada à proteção do ambiente externo e é proporcionada pela combinação de infraestrutura laboratorial e práticas operacionais (SKARABA, et al., 2004; PESSOA e LAPA, 2003).

3.1. Barreiras primárias

Os equipamentos de proteção são barreiras primárias que visam a proteger o profissional (individual) e o ambiente (coletivo). A Norma Regulamentadora n. 6, do Ministério do Trabalho e Emprego, estabelece que o empregador deve adquirir e fornecer ao trabalhador equipamentos de proteção individual (EPI), orientando e treinando sobre o uso adequado, guarda e conservação, realizando periodicamente a higienização e a manutenção, substituindo imediatamente sempre que danificado e extraviado.

Toda vez que as medidas de proteção coletiva forem tecnicamente inviáveis e não oferecerem completa proteção contra os riscos de acidentes no trabalho e/ou doenças profissionais, o equipamento de proteção individual deve ser utilizado pelo profissional como um método de contenção dos riscos. Historicamente, os trabalhadores da área da saúde – que atuam em hospitais, clínicas odontológicas, veterinárias e laboratórios – são considerados como categoria profissional de alto risco, pois estão frequentemente expostos aos riscos biológicos, principalmente quando manuseiam fluidos corpóreos e sangue (NISHIDE e BENATTI, 2004).

Os equipamentos de proteção individual são todos os dispositivos de uso individual destinados a proteger a saúde e a integridade física do trabalhador. A seguir, são enumerados os EPIs disponíveis na maioria dos laboratórios de pesquisa, clínico e ensino.



Protetores faciais – Oferecem uma proteção à face do trabalhador contra risco de impactos (partículas sólidas, quentes ou frias), de substâncias nocivas (poeiras, líquidos e vapores), como também das radiações (raios infravermelho e ultravioleta, etc.).

Protetores oculares – Servem para proteger os olhos contra impactos, respingos e aerossóis. É importante que sejam de qualidade comprovada, a fim de proporcionar ao usuário visão transparente, sem distorções e opacidade.



Protetores respiratórios – São utilizados para proteger o aparelho respiratório. Existem vários tipos de respiradores, que devem ser selecionados conforme o risco inerente à atividade a ser desenvolvida. Os respiradores com filtros mecânicos, por exemplo, destinam-se à proteção contra partículas suspensas no ar, os com filtros químicos protegem contra gases e vapores orgânicos. As máscaras, que podem ser semifaciais e de proteção total, são necessárias no caso de uso de gases irritantes como o cloreto de hidrogênio.

Protetores auditivos – Usados para prevenir a perda auditiva provocada por ruídos. Devem ser utilizados em situações em que os níveis de ruído sejam considerados prejudiciais ou nocivos em longa exposição.





Luvas – Previnem a contaminação das mãos do trabalhador ao manipular, por exemplo, material biológico potencialmente patogênico e produtos químicos. Além de reduzir a probabilidade de que os microrganismos presentes nas mãos dos trabalhadores possam ser transmitidos aos pacientes durante um atendimento médico-hospitalar.

Jalecos – São de uso obrigatório para todos que trabalham nos ambientes laboratoriais onde ocorra a manipulação de microrganismos patogênicos, manejo de animais, lavagem de material, esterilização, manipulação de produtos químicos. Devem ser de mangas compridas, cobrindo os braços, o dorso, as costas e a parte superior das pernas.



Calçados de segurança – São destinados à proteção dos pés contra umidade, respingos, derramamentos e impactos de objetos diversos, não sendo permitido o uso de tamancos, sandálias e chinelos em laboratórios.

Equipamentos de proteção coletiva (EPC) – Têm como função a proteção do ambiente e a manutenção da saúde, além da integridade dos ocupantes de uma determinada área. Podem ser de uso rotineiro, como as cabines de segurança biológica e capelas de exaustão química, ou para situações emergenciais, como os extintores de incêndio, chuveiro e lava-olhos, que devem estar instalados em locais de fácil acesso e bem sinalizados.



Cabines de Segurança Biológica (CSB)

Em 1909 a W. K. Mulford Pharmaceutical CO, uma indústria farmacêutica americana, concebeu o primeiro modelo de cabine para proteger a saúde dos profissionais durante a preparação de tuberculina.

São equipamentos concebidos para manter uma área, denominada zona de trabalho, livre de partículas ou de prováveis contaminantes, tais como bactérias, que possam alterar o produto com o qual se trabalha, afetar a saúde do trabalhador e o ambiente. A proteção se efetiva mediante a combinação de elementos eletromecânicos/eletrônicos (motor, ventilador, filtro, dutos e iluminação) e processos físicos (fluxo laminar, diferença de pressão) que impulsionam o ar através de filtros especiais (Hepa) de grande superfície, que têm uma eficiência mínima de retenção de partícula de 99,99%, quando o tamanho das mesmas é de 0,3 μm (micrômetros).

As cabines devem ser submetidas periodicamente à manutenção e a trocas dos filtros e o laboratório deve possuir relatório da manutenção mantido à disposição da fiscalização do trabalho.

3.2. Barreiras secundárias (infraestrutura laboratorial)

Uma instalação adequada é aquela que está de acordo com o funcionamento do laboratório e com o nível de biossegurança recomendado para os agentes manipulados no local, atuando também como uma barreira de contenção secundária. Para os laboratórios de Nível de Biossegurança 1 (NB-1) – onde são manipulados agentes biológicos da classe de risco 1 –, são recomendados os seguintes critérios para área física:

- Identificação do nível de Biossegurança e dos microrganismos (Figura 1).
- Separação do laboratório do acesso público.
- Laboratório com acesso controlado.
- Local para armazenar EPIs de uso exclusivo no laboratório.
- Paredes, tetos e pisos, impermeáveis e resistentes à desinfecção.
- Autoclave próxima ao laboratório, para maiores informações veja capítulo 2, página 87.

Figura 1- Sinalização

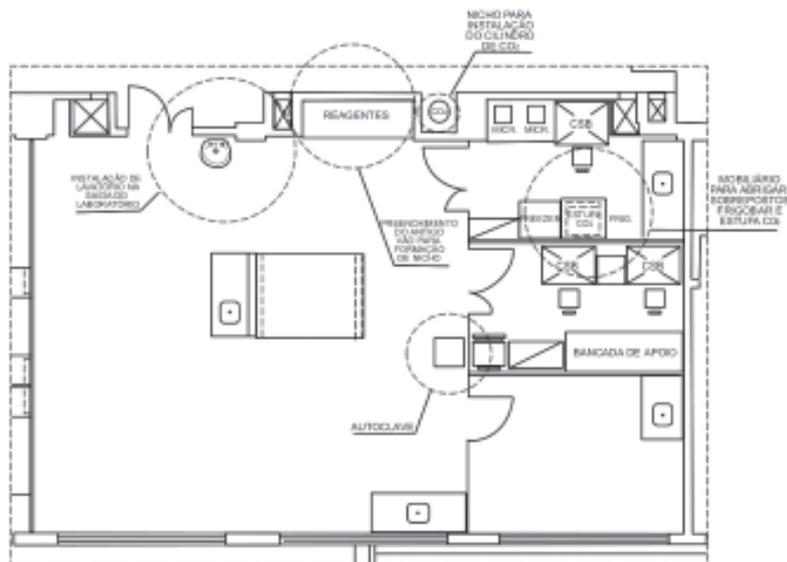


Nos laboratórios de Nível de Biossegurança 2 (NB-2), são manipulados microrganismos da classe de risco 2. Além dos critérios relacionados no risco 1, são recomendados também:

- Lavatório para as mãos próximo à entrada do laboratório.
- Torneira com acionamento sem uso das mãos.
- Sistema central de ventilação.
- Janelas vedadas.
- Antecâmara.
- Sistema de geração de emergência elétrica.
- Cabine de segurança biológica (OPS, 2009; CAMPOS, 2003).

Na figura 2, apresentamos um *layout* de um laboratório NB-2, onde consta no seu interior uma autoclave que será utilizada para inativar os resíduos gerados durante o experimento para posterior descarte. Constam também o lavatório para lavagem de mãos próximo à entrada e o cilindro de gás instalado na parte externa, abastecendo através de tubulação a estufa de CO₂ que fica dentro do laboratório.

Figura 2 – *Layout* de um laboratório NB-2



Os laboratórios de Nível de Biossegurança 3 (NB-3) são aqueles onde são manipulados microrganismos de alto risco individual e moderado risco para a comunidade. Já nos de Nível de Biossegurança 4 (NB-4) são manipulados agentes biológicos com alto risco individual e para a comunidade. Os critérios recomendados para o funcionamento desses laboratórios são bastante complexos e de elevado custo. Para mais esclarecimentos dos laboratórios citados, consulte a documentação do Ministério da Saúde (2006) sobre as diretrizes para o trabalho em contenção com agentes biológicos.

4. Princípios gerais da qualidade em laboratórios

O mundo vive em permanente desenvolvimento e muitas são as atividades científicas que se apresentam repletas de incertezas. Nesse sentido, coerência e responsabilidade se fazem necessárias para se reconhecer e tratar com afinco essas questões (CARVALHO, 2008). A busca permanente da qua-

lidade total nas atividades científicas remete à necessidade de treinamento, aquisição e domínio de conhecimentos para a execução das atividades com vistas a assegurar a precisão, a validade, a qualidade dos resultados e a manutenção da integridade das pessoas, das instalações, das máquinas, dos instrumentos e dos equipamentos.

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são definidas pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) como um sistema da qualidade relativo ao processo organizacional e às condições sob as quais estudos não-clínicos, ou seja, estudos biomédicos não realizados em humanos, referentes à saúde e meio ambiente, são planejados, realizados, monitorados, registrados, arquivados e relatados (BRASIL, 2009; BRASIL, 2005; BRASIL, 2001).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), os princípios das Boas Práticas de Laboratório são aplicáveis em estudos que dizem respeito ao uso seguro de produtos relacionados à saúde humana, vegetal e animal e ao meio ambiente.

Com o intuito de se garantir a aplicação dos princípios das BPL, um dos instrumentos utilizados nos laboratórios são os Procedimentos Operacionais Padrão (POP).

POP ⇒

É um documento que expressa o planejamento do trabalho com vistas a padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução das atividades e assim garantir aos usuários serviços ou produtos livres de variações indesejáveis, independentemente de quem as realize.
Um procedimento operacional padrão tem como meta garantir que a qualidade dos exames seja a mesma em todas as etapas do processo em qualquer momento.

Cabe aqui uma referência a um tema que já há algum tempo vem sendo discutido e aplicado em alguns cursos de especialização e atualização na área da saúde, notadamente na Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Trata-se da aplicação das boas práticas nas atividades laboratoriais com foco diferenciado das BPL, ou seja, capacitar e ampliar conceitos de profissionais que atuam em laboratórios, no que tange às práticas laboratoriais, com vistas a assegurar: o entendimento dos procedimentos, a busca da precisão, da validade e da qualidade dos resultados e a manutenção da integridade das pessoas, das instalações, dos equipamentos e dos materiais.

Equipamentos, materiais e reagentes

Equipamentos de laboratório requerem condições ambientais apropriadas para o devido funcionamento, além de locais para instalação livres de interferências (vibrações, correntes de ar, incidência de luz solar, umidade e calor) e, no tocante à instalação na rede elétrica, devem ser conectados a tomadas adequadamente aterradas (CARVALHO, 1999). No que concerne ao funcionamento, os equipamentos deverão ser operados por pessoal capacitado, além de serem atendidos todos os requisitos que preconizam o manual de operação original ou nos manuais traduzidos para a língua portuguesa, preferencialmente no POP destinado ao mesmo.

Os equipamentos que são responsáveis pelo controle das condições ambientais indispensáveis para o estudo e a geração de dados deverão ter configuração, capacidade e localização adequadas.

Determinados procedimentos são necessários para que os equipamentos funcionem a contento e os dados por eles fornecidos sejam capazes de expressar a realidade das amostras analisadas. Os equipamentos devem estar em condições de utilização e devem seguir um plano rigoroso de validação, quali-

ificação, calibração e manutenção. Assim sendo, um sistema que contemple limpeza, inspeção periódica, manutenção preventiva e calibração será relevante e necessário, o que implica, para tal, a utilização de um POP para cada tarefa. Cabe ainda manter no laboratório os registros escritos de operação, calibração, manutenção e demais dados considerados relevantes.

CALIBRAÇÃO ⇒

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro, 2000), é o conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões (INMETRO, 2000).

Ainda no que tange aos equipamentos científicos, há de se priorizar os processos de manutenção preventiva (tarefas de manutenção previamente planejadas e desempenhadas, objetivando manter as condições satisfatórias de operação) em detrimento da manutenção corretiva (tarefas de manutenção não-planejadas para restaurar as capacidades funcionais de equipamentos ou sistemas falhados). Os equipamentos, devidamente incluídos em sistemas preventivos de manutenção, certamente terão assegurado uma vida útil prolongada e redução nos custos de manutenção, tendo em vista que determinadas causas são de fácil detecção e podem ser tratadas por meio de manutenções preventivas (COUTO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

Quanto aos materiais, esses devem ser de origem conhecida e ter assegurado a sua qualidade. Para tanto, é necessário que se estabeleçam procedimentos de controle de fornecedores, ou seja, que seja exigido dos mesmos a

apresentação de certificados de controle de qualidade. Quanto à exigência aos fornecedores, esses deverão apresentar materiais devidamente rotulados com as seguintes informações: origem, identidade, composição, data de produção, validade, condições de estocagem e informações de periculosidade (simbologias de risco e de prevenção).

Exemplos de simbologias de riscos

Os símbolos de segurança são, no Brasil, normatizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Servem para lembrar o risco do manuseio do produto, representando nos pictogramas os primeiros sintomas com o contato com a substância.

		
TÓXICO	CORROSIVO	OXIDANTE
		
EXPLOSIVO	INFLAMÁVEL	NOCIVO

Exemplos de simbologias de prevenção

		
SUJEITO A QUEDAS	CHOQUE ELÉTRICO	USO DE ÓCULOS
		
NÃO FUMAR	EXTINTOR	MANGUEIRAS

Quando se trata de armazenamento de materiais, algumas regras devem ser estabelecidas e seguidas a risco, de modo a manter a integridade dos mesmos. Para cada material, deverá ser reservado um local definido e identificado, bem como se estabelecer um sistema de identificação e codificação de cada produto. Há de se estabelecer também um fluxo de movimentação para os materiais de grande porte, pesados e que necessitam de cuidados especiais.

Produtos biológicos e os considerados perecíveis deverão ser organizados e armazenados em locais apropriados (limpo, sem umidade, protegido de insetos e animais) de modo a não ficar por muito tempo estocado, facilitando assim o seu envelhecimento e a sua deterioração.

Os demais produtos, considerados perigosos (gases explosivos e inflamáveis, substâncias explosivas, comburentes e radioativas), os produtos químicos e os solventes inflamáveis serão armazenados em local apropriado, devidamente demarcado, livre de interferência (ambiental e pessoal) e sinalizado.

A Norma Regulamentadora 26 do Ministério do Trabalho e Emprego tem como objetivo fixar as cores que devem ser usadas nos locais de trabalho para a prevenção de acidentes, identificando os equipamentos de segurança, delimitando áreas, identificando as canalizações empregadas nas indústrias para condução de líquidos e gases e advertindo contra riscos.

Todo laboratório deve ser sinalizado de forma a facilitar a orientação dos usuários e advertir quanto aos potenciais riscos presentes no local. A utilização correta e o respeito à sinalização de segurança são entendidos como barreiras primárias das medidas de contenção. As cores não dispensam o emprego de outras formas de prevenção de acidentes e deverão ser acompanhadas dos sinais convencionais ou da identificação por palavras.

VERMELHA	Usada para distinguir e indicar equipamentos e aparelhos de proteção e combate a incêndio. Pode ser usada excepcionalmente também com sentido de advertência de perigo, como em botões interruptores de circuitos elétricos para paradas de emergência, etc.
AMARELA	Em canalizações, deve ser empregada para identificar gases não liquefeitos. Também pode ser empregada para indicar cuidado, assinalando, por exemplo, meios-fios, corrimãos, cavaletes, etc.
BRANCA	Empregada em passarelas e corredores de circulação, localização de bebedouros, coletores de resíduos, áreas destinadas à armazenagem, zonas de segurança, etc.
PRETA	Será empregada para indicar as canalizações de inflamáveis e combustíveis de alta viscosidade, como óleo lubrificante, asfalto, óleo combustível, alcatrão, piche, etc. Poderá ser usada também em substituição ao branco ou combinado a este, quando condições especiais o exigirem.
AZUL	Utilizada para indicar "Cuidado!", ficando o seu emprego limitado a avisos contra uso e movimentação de equipamentos, que deverão permanecer fora de serviços. Será usada também em canalizações de ar comprimido, colocado em ponto de arranque ou fontes de potência.

VERDE	Caracteriza “segurança”. Deverá ser empregada para indicar canalizações de água, localização de EPI, fontes lavadoras de olhos, dispositivos de segurança, mangueiras de oxigênio (soldas oxiacetilênica), etc.
LARANJA	Deverá ser empregada para identificar canalizações contendo ácidos, faces internas de caixas protetoras de dispositivos elétricos, face externa de polias e engrenagens, etc.
PÚRPURA	Deverá ser usada para indicar os perigos provenientes das radiações eletromagnéticas penetrantes de partículas nucleares, como, por exemplo, em porta e aberturas que dão acesso a locais onde se manipulam ou armazenam matérias radioativas ou materiais contaminados por radioatividade.
LILÁS	Empregada para indicar canalizações que contenham álcalis. As refinarias de petróleo podem utilizar esta cor para a identificação de lubrificantes.
CINZA	O cinza-claro indica canalizações em vácuo e o cinza-escuro é usado para identificar eletrodutos.
ALUMÍNIO	Utilizada em canalizações contendo gases liquefeitos, inflamáveis e combustíveis de baixa viscosidade (exemplo: óleo diesel, gasolina, querosene, óleo lubrificante, etc.).
MARROM	Pode ser adotada, a critério da empresa, para identificar qualquer fluido não identificável pelas demais cores.

A utilização de cores não dispensa o emprego de outras formas de prevenção de acidentes. O uso das cores deve ser feito de modo criterioso, a fim de não ocasionar distração, confusão e fadiga ao trabalhador.

O Ministério da Saúde recomenda que o símbolo de 'risco biológico' (Figura 3) seja colocado na entrada do laboratório, informando também o microrganismo manipulado, a classe de risco, o nome do pesquisador responsável, o endereço e o telefone de contato. Além disso, deve conter a frase: "Proibida a entrada de pessoas não autorizadas." Figura 3 – Risco Biológico

Figura 3
Risco Biológico



Há de se considerar a possibilidade de incompatibilidades nos locais de armazenagem dos materiais. Nesse sentido, medidas de controle relativo às condições ambientais deverão ser estabelecidas. Materiais que sejam considerados relevantes nas atividades em geral serão analisados periodicamente para garantir a inexistência de contaminantes que possam comprometer a qualidade dos trabalhos.

5. Agentes de risco em laboratórios

O ambiente laboratorial tem sido considerado insalubre por agrupar atividades que requerem o uso de equipamentos, máquinas, reagentes e materiais diversos, além de viabilizar muitos procedimentos que oferecem riscos de acidentes e doenças para os usuários em geral. Desse modo, cabe a responsabilidade de se informar, treinar e até mesmo capacitar os sujeitos potencialmente expostos aos riscos, de modo a evitar problemas de saúde e prevenir acidentes.

Consideram-se riscos ambientais os agentes físicos, químicos e biológicos existentes no ambiente de trabalho, que, dependendo da sua natureza, concentração ou intensidade e tempo de exposição, são capazes de causar

danos à saúde dos trabalhadores (CARVALHO, 1999). No que concerne aos riscos ocupacionais, esses estão diretamente ligados às situações de trabalho que podem romper o equilíbrio físico, mental e social das pessoas, e não somente as situações que originem acidentes e enfermidades (NISHIDE e BENATTI, 2004).

Quando as medidas de proteção coletiva não são tecnicamente viáveis e não permitem a completa proteção ao usuário dos laboratórios contra os riscos de acidentes provenientes do trabalho e/ou de doenças profissionais e do trabalho, o EPI será utilizado pelo usuário como forma de prevenção aos riscos inerentes ao ambiente (CARVALHO, 1999).

São considerados riscos ambientais aqueles causados por agentes físicos, químicos, biológicos, ergonômicos e de acidentes que, presentes nos ambientes de trabalho, são capazes de causar danos à saúde do trabalhador em função de sua natureza, concentração, intensidade ou tempo de exposição.

A NR-5 classifica os riscos ambientais em cinco grupos:

FÍSICOS	Ruído, vibrações, pressões anormais, temperaturas extremas, radiações, etc.
QUÍMICOS	Poeiras, fumos, névoas, neblinas, gases, vapores que podem ser absorvidos por via respiratória ou através da pele, etc.
BIOLÓGICOS	Bactérias, fungos, bacilos, parasitas, protozoários, vírus, entre outros.
ERGONÔMICOS	Trabalho físico pesado, movimentos repetitivos, jornada prolongada, postura incorreta, tensões emocionais, monotonia, exigência de uma maior atenção, responsabilidade e concentração, jornadas longas de trabalho, treinamento inadequado ou inexistente, conflitos, etc.

ACIDENTES	Arranjo físico inadequado, máquinas e equipamentos sem proteção, iluminação inadequada, eletricidade, animais peçonhentos, probabilidade de incêndio ou explosão, etc.
-----------	--

5.1. Agentes biológicos de risco

O risco por agente biológico é a 'probabilidade de um indivíduo se contaminar com um agente patogênico, como, por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas'.

Todos os profissionais que trabalham em laboratório com agentes ou materiais biológicos devem estar conscientes dos riscos inerentes a essa atividade e conhecer profundamente o agente e os procedimentos para minimizar o risco de contaminação. Além disso, as boas condutas de laboratório devem ser estritamente seguidas de modo a evitar que um procedimento realizado de maneira incorreta ou mesmo displicentemente coloque em risco a segurança do(s) profissional(is) e do ambiente (BRASIL, 2006; TEIXEIRA, 2000).

O manual de Biossegurança da Fiocruz (2005) descreve como regra básica para o trabalho em laboratório:

- Considerar todo material biológico como infeccioso;
- Trabalhar com atenção e sem tensão;
- Sinalizar o risco do agente na entrada do laboratório;
- Notificar os acidentes e imediato cuidado médico.

Além disso, todo pessoal de laboratório deve evitar trabalhar sozinho com material infeccioso; ser protegido por imunização quando disponível; manter o laboratório limpo e arrumado; usar roupas protetoras, tais como uniformes, aventais, jalecos e máscaras; usar luvas; não aplicar cosméticos; evitar uso de lentes de contato; lavar as mãos após a manipulação de materiais

contaminados; nunca pipetar com a boca; não fumar, não comer e não beber no laboratório; descontaminar a superfície de trabalho, etc.

Outra atividade que requer cuidados especiais é o cultivo de microrganismos. Lembre-se de que quando se cultiva um microrganismo visa-se a obter uma quantidade grande de células e, por isso, o trabalhador deve estar atento as suas condutas para evitar acidentes. O trabalhador deve abrir cuidadosamente os tubos e frascos, identificados claramente, que contêm o agente evitando agitá-los. Sempre se deve manipular os tubos, as pipetas e as seringas com as extremidades em direção oposta a si. Os sobrenadantes ou o conteúdo de pipetas devem ser desprezados sobre material absorvente embebido em desinfetante contido em um frasco de boca larga para evitar a produção de aerossóis.

Se a atividade laboratorial envolver a infecção de animais de laboratório, o trabalhador deve tomar os seguintes cuidados: inicialmente, considerar como potencialmente infectado todo animal, seja ele vertebrado ou invertebrado; equipamentos de proteção devem ser utilizados durante o procedimento de inoculação; seringas e agulhas utilizadas durante a inoculação devem ser descartadas em caixas coletoras apropriadas e autoclavadas ao final do procedimento; identificar as gaiolas dos animais com todas as informações relevantes (número de animais, linhagem, sexo, idade, peso, data da infecção, microrganismo inoculado, via e dose de inoculação e nome e telefone do pesquisador responsável); durante a limpeza da cama e das gaiolas dos animais, equipamentos de proteção individual devem ser utilizados para minimizar o risco de contaminação; autoclavar todos os materiais que tiveram contato com os animais infectados; notificar todo e qualquer acidente/incidente proveniente do manuseio dos animais ou das gaiolas.

5.1.1. Classificação de risco dos microrganismos

Os agentes biológicos são classificados de acordo com o risco que oferecem ao trabalhador e à coletividade. Assim, segundo o Ministério da Saúde (2006), os microrganismos são classificados quanto ao risco como:

- **Classe de risco 1**

Microrganismo que representa 'baixo risco individual e para a coletividade'. Inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças em pessoas ou animais adultos saudáveis. Exemplo: *Bacillus subtilis*, e os agentes não incluídos nas classes de risco 2, 3 e 4 e que não demonstraram capacidade comprovada de causar doença no homem ou em animais saudáveis. Vale lembrar que a não classificação de agentes biológicos nas classes de risco 2, 3 e 4 não implica na sua inclusão automática na classe de risco 1. Para isso deverá ser conduzida uma avaliação de risco, baseada nas propriedades conhecidas e/ou potenciais desses agentes e de outros representantes do mesmo gênero ou família.

- **Classe de risco 2**

Microrganismo que representa 'moderado risco individual e limitado risco para a comunidade'. Inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplo: *Schistosoma mansoni*.

- **Classe de risco 3**

Microrganismo que representa 'alto risco individual e moderado risco para a comunidade'. Inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam patologias humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente

medidas de tratamento e/ou prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplo: *Bacillus anthracis*.

- **Classe de risco 4**

Microrganismo que representa 'alto risco individual e para a comunidade'. Inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento não há qualquer medida profilática ou terapêutica eficaz contra infecções ocasionadas por estes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com grande capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplo: vírus ebola.

O Ministério da Saúde descreve ainda uma classe de risco adicional chamada de 'Classe de Risco Especial'. Ela reúne os microrganismos que representam 'alto risco de causar doença animal grave e de disseminação no meio ambiente'. Inclui agentes biológicos de doença animal não existentes no país e que, embora não sejam obrigatoriamente patógenos de importância para o homem, podem gerar graves perdas econômicas e/ou na produção de alimentos.

Como os microrganismos podem acidentalmente penetrar no hospedeiro?

Segundo Sewell (1995), os profissionais de laboratório microbiológico estão submetidos a um grande risco de se contaminar durante as suas atividades. Isso se deve a fatores que incluem o modo de transmissão do agente, o desenvolvimento da infecção no hospedeiro, a via e a fonte de infecção e o ambiente laboratorial (ventilação, equipamentos e procedimentos).

As vias de penetração dos agentes biológicos podem ser:

- **Aérea** – Em geral, essa via está relacionada com a produção de aerossóis. Os aerossóis se formam dependendo da atividade realizada, como maceração de tecidos, centrifugação, pipetagem, sonicação, agitação de suspensões celulares, abertura de ampolas liofilizadas, flambagem de alça de platina etc. Uma vez formados, os aerossóis podem ficar em suspensão e propagar-se à distância contaminando vários profissionais pela inalação dos mesmos.
- **Oral** – A ingestão de microrganismos com maior frequência ocorre através de pipetagem com a boca, porém, outras formas de contaminação também são descritas, como levar à boca itens do laboratório (por exemplo, canetas e lápis) e consumir alimentos e bebidas no local de trabalho, fumar e falta de procedimentos higiênicos (lavagem de mãos). Outra forma de infecção refere-se às projeções de gotículas na boca.
- **Cutânea** – Acidentes com inoculação parenteral de material infeccioso correspondem a uma das principais causas de contaminação do profissional de laboratório. O microrganismo pode penetrar através da pele após ferimento com agulhas, lâminas de bisturi ou vidraria quebrada contaminadas. Outra forma de contaminação por essa via é a mordida ou o arranhão de animais e ainda picada de insetos.
- **Ocular** – A contaminação da conjuntiva pode ocorrer por deposição de gotículas de suspensões celulares ou mesmo por aerossóis de material infectante nos olhos.

5.1.2. Biossegurança no trabalho com os agentes biológicos

• Vírus

Os vírus são transmitidos de um hospedeiro a outro de várias maneiras. Podemos destacar o contato direto através das vias respiratórias, pelo

contato sexual, por alimentos e água, pelo contato com sangue e seus derivados. O profissional de laboratório ou aquele que lida com pacientes está submetido a um significativo risco de contaminação por via respiratória. Assim sendo, esses profissionais devem ter pleno conhecimento dos riscos durante a manipulação dos espécimes clínicos e dos pacientes, levando em consideração as boas práticas de laboratório e as operações que envolvem a produção de aerossóis para prevenção das infecções por esses agentes.

- **Bactérias**

As bactérias podem ser transmitidas ao profissional de laboratório por diferentes processos. A produção de aerossóis e consequente inalação dessas pequenas partículas é, sem dúvida, a principal via de contaminação. No entanto, existem outras atividades que mal realizadas podem levar o profissional a adquirir uma infecção associada ao laboratório, como pipetagem, flambagem de alça bacteriológica, descarte de resíduos ou amostras clínicas etc. O uso de equipamentos de proteção e boas práticas de laboratório minimizam os riscos de infecção.

- **Fungos**

Os fungos produzem estruturas denominadas esporos que facilmente ficam em suspensão no ar. Dessa forma, aquele que trabalha em um laboratório manipulando fungos está submetido a um grande risco de se expor a uma infecção micótica. As principais vias de contaminação no laboratório, comprovadas por levantamentos realizados sobre infecções associadas ao laboratório, estão relacionadas à inalação de partículas fúngicas, carreadas por aerossóis formados durante procedimentos laboratoriais e por injúrias causadas por agulhas ou instrumentos perfurocortantes.

- **Parasitas**

Infecções adquiridas em laboratório por parasitas como *Ascaris* spp., *Strongyloides* spp., *Enterobius* spp., *Fasciola* spp., *Shistosoma* spp., *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* não têm sido relatadas com frequência em laboratórios clínicos (SEWELL, 1995). Casos de giardíase e criptosporidíase são mais comuns em profissionais que manuseiam animais infectados. Não há registro de infecções associadas ao laboratório com cestódeos. Os parasitas mais comumente relacionados à contaminação durante atividade laboratorial são *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. De um modo geral, o risco de se infectar com esses agentes é a autoinoculação com seringas e agulhas contaminadas, contato de formas infectantes com lesões de pele ou mucosa ou, ainda, por mordedura de animais infectados. Não podemos descartar a contaminação por via oral de algumas formas infectantes presentes em material fecal.

Como inativar os agentes biológicos?

Em se tratando de risco biológico, o procedimento adequado para inativar os resíduos e as ações a serem tomadas em caso de acidentes são extremamente relevantes. Durante o descarte e a retirada do material biológico da área laboratorial, o microorganismo deve ser inativado por agentes químicos ou físicos antes de expô-lo ao contato externo ao laboratório e desinfetar as superfícies de trabalho antes e após qualquer procedimento.

Agentes químicos para inativar os agentes biológicos (Fiocruz, 2005)

Álcool a 70% ⇒ Parasitas, bactérias e retrovírus.

Formol a 4% ⇒ Parasitas, bactérias, fungos e vírus.

Cloro ativo a 1% ⇒ Parasitas, bactérias, fungos e vírus.

Agentes físicos para inativar os agentes biológicos (Fiocruz, 2005)

Calor úmido
Autoclavação por
30min. a 120°C ⇒ Parasitas, bactérias, fungos, vírus, inclusive as formas vegetativas e esporuladas de bactérias e fungos.

Incineração ⇒ Destruição de carcaças de animais e resíduos previamente autoclavados.

5.2. Agentes químicos de risco

No que concerne aos reagentes químicos, há de se estabelecer critérios rigorosos para a armazenagem, movimentação, uso nas atividades e resíduos gerados oriundos dos trabalhos. Também será relevante que os fornecedores disponibilizem todas as informações sobre a segurança para o produto químico adquirido. Normalmente, os produtores/fornecedores disponibilizam as Fichas de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) e essas deverão, obrigatoriamente, estar em local acessível a todos os trabalhadores nos seus locais de trabalho. Além disso, é de extrema importância que seja incentivada a leitura dessas fichas por todos os que transportam, armazenam, manuseiam os produtos e recolhem os resíduos químicos.

As FISPQ contêm informações diversas sobre um determinado produto químico (substâncias ou misturas) quanto à proteção, à segurança, à saúde e ao meio ambiente e ações em situação de emergência. Em alguns países, essa ficha é chamada de *Material Safety Data Sheet (MSDS)*.

Ainda com relação aos produtos químicos, estes podem exercer impacto negativo sobre a saúde dos homens e dos animais e afetar sobremaneira o meio ambiente quando as medidas preventivas não são adotadas. Os produtos químicos, devido às suas características, podem afetar os trabalhadores de formas variadas, desde leves processos alérgicos até o câncer (COSTA e FELLI, 2005).

A diversidade de atividades no ambiente de trabalho promove diversos efeitos sobre a saúde do trabalhador, que, na maioria das vezes, não conhece as características dos produtos químicos no que tange ao grau de toxicidade, inflamabilidade, corrosividade, explosividade e demais riscos de periculosidade (CARVALHO, 2006).

Quanto às características dos produtos, esses podem ser: carcinogênicos (causam câncer); corrosivos (desgastam ou modificam); irritantes (produzem irritações); tóxicos (causam envenenamento e/ou morte); teratogênicos (causam deformações); mutagênicos (causam mutações); alergênicos (causam reações alérgicas); ionizantes (causam câncer e outras doenças); explosivos (causam explosões); e espontaneamente combustíveis (causam incêndios e explosões).

Outros fatores poderão contribuir para afetar a qualidade dos resultados dos trabalhos, além de atuarem como prováveis geradores de acidentes, quando estão presentes envolvendo produtos químicos: As condições elétricas, eletrônicas e mecânicas dos equipamentos (ausência de manutenção preventiva e manutenção corretiva deficiente); os hábitos do operador no que concerne à desatenção e à negligência frente às atividades potencialmente de risco; a não observância de normas; o excesso de material sobre a bancada de trabalho; a ausência de cabines de segurança química; a desordem nos laboratórios (ausência de organização); e a ausência de políticas de administração de resíduos.

Com o intuito de minimizar ao máximo e até mesmo eliminar a possibilidade de acidentes graves nos laboratórios que trabalham com produtos químicos e demais materiais combustíveis, comburentes, inflamáveis e explosivos, cabem algumas recomendações quanto às ações preventivas para controle de incêndios em áreas críticas de trabalho.

A ausência de cuidados no que concerne à prevenção de incêndios poderá gerar situações extremamente graves. Pequenos focos de fogo requerem a ação imediata de pessoal capacitado, de modo a intervir adotando todas as medidas apropriadas e para controlar a situação. Assim sendo, todos os equipamentos de combate a incêndios deverão estar disponíveis para o combate ao fogo nos seus primeiros momentos.

O fogo já acompanha o homem desde os tempos remotos e proporciona inúmeros benefícios. Acontece que o fogo, quando foge do controle do homem, se transforma em um incêndio e provoca estragos não só para as pessoas, mas também para os animais, as instalações prediais e o meio ambiente.

O fogo também é entendido como o produto de uma reação química denominada combustão, que produz luz e calor ou somente calor e, para que ocorra, necessita de quatro elementos básicos: calor, combustível, oxigênio e reação em cadeia. Esses quatro elementos reunidos formarão uma figura geométrica conhecida por tetraedro. Assim, para o entendimento do que é um incêndio, é preciso conhecer o tetraedro do fogo (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Representação do tetraedro do fogo

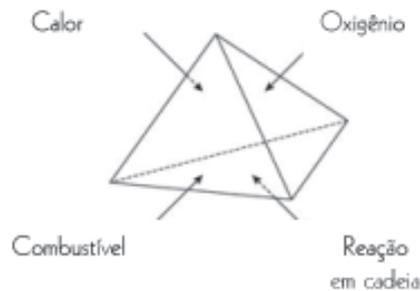


Figura 5 – Representação do tetraedro do fogo expandido

Combustível: é o elemento que serve de propagação do fogo. Tem a propriedade de queimar e pode ser sólido, líquido ou gasoso.

Reação em cadeia: torna a queima autossustentável. O calor irradiado das chamas atinge o combustível e este é decomposto em partículas menores, que se combinam com o oxigênio e queimam, irradiando outra vez calor para o combustível, formando um ciclo constante.



Oxigênio: também é chamado de comburente. Em proporções adequadas (+ de 15%), combina com o material combustível, dando início ao fogo. O oxigênio está presente no ar que nos envolve.

Calor: elemento que serve para dar início a um incêndio. O calor pode ser obtido pela transformação das energias mecânica, química e elétrica. O calor mantém e aumenta a propagação.

Classe de incêndio

Os materiais combustíveis têm características diferentes e, portanto, queimam de modos diferentes. Conforme o tipo de material, existem quatro classes de incêndios, a saber:

CLASSES DE INCÊNDIO				
Classe A	Classe B	Classe C	Classe D	Classe K
				
Assim é identificado o fogo em materiais sólidos que deixam resíduos, como madeira, papel, tecido e borracha.	Quando a queima acontece em líquidos inflamáveis, graxas e gases combustíveis.	Classe de incêndio em equipamentos elétricos energizados. A extinção deve ser feita por agente extintor que não conduza eletricidade.	Classe de incêndio, que tem como combustível os metais pirofóricos, como magnésio, selênio, antimônio, lítio, potássio, alumínio fragmentado, zinco, titânio, sódio, urânio e zircônio.	Classificação do fogo em óleo vegetal e gorduras de origem animal, em cozinhas.

Fonte: < www.casaolivetti.com.br/classes.html > .

Características de agentes extintores de incêndios

AGENTE	CLASSE DE INCÊNDIO	VANTAGENS
Água (em jato ou pulverizada)	A	Deve ser usada sempre que não haja contraindicações (de preferência, deve ser pulverizada). Tem bom poder de penetração.
Neve carbônica (extintor com dióxido de carbono sob pressão que solidifica quando se expande bruscamente)	BC	Não deixa resíduo, o que a torna mais adequada para equipamento sensível. A mais indicada para líquidos extremamente inflamáveis
Espuma física (produzida a partir de uma mistura de água e substâncias tensoativas por injeção mecânica de ar)	AB	Muito boa para líquidos extremamente inflamáveis. Pode ser utilizada em situações de incêndio iminente com ação preventiva. A cobertura de espuma evita reignições.
Espuma química (extintor em que ocorre uma reação que liberta o gás dióxido de carbono que fica disperso em um líquido formando espuma)	AB	Muito boa para líquidos extremamente inflamáveis. A cobertura de espuma evita reignições.
Pó normal (extintor em que o pó é bicarbonato de sódio ou de potássio)	BC	Forma uma nuvem de poeira que protege o operador.

Pó polivalente (extintor em que o pó é dihidrogenofosfato de amônio)	A B C	Forma uma nuvem de poeira que protege o operador. Atende a três classes de fogos.
Pó especial (extintor em que o pó é grafite ou cloreto de sódio ou pó de talco etc.)	D	Único extintor adequado para incêndios da classe D. Qualquer outro tipo de extintor provoca reações violentas.
Areia	AD	Por vezes, é o único meio de extinção disponível para incêndios da classe D.
Solução especial (extintor em que o acetato de potássio se encontra diluído em água)	K	Ao se considerar a segurança do pessoal que trabalha em cozinhas e restaurantes, o extintor classe K é o mais fácil de ser utilizado. Atua por formação de neblina e o fogo é extinto por resfriamento e pelo efeito asfíxiante da espuma.

Procedimentos quanto às medidas preventivas serão de responsabilidade de todos os funcionários, de frequentadores dos laboratórios (pessoal de manutenção, estudantes e estagiários) e daqueles que são usuários das instalações prediais. No que tange às medidas preventivas, algumas são descritas a seguir:

- Não jogue resíduos de produtos químicos no cesto de lixo comum do laboratório. A possível incompatibilidade dos resíduos com outros materiais existentes no cesto (papel, pano, barbante, plástico, etc.) será uma condição favorável para o início do fogo.

- Não jogue palitos de fósforos, utilizados para o acendimento de bicos de gás (Bunsen), diretamente no lixo. Antes de lançar no cesto, molhe o mesmo para se certificar de que não oferece perigo.
- Não acenda chamas (fósforos, isqueiros, velas, etc.), a não ser que seja necessário e com o conhecimento e consentimento do professor ou do monitor da aula.
- No caso de falta de energia elétrica no laboratório, jamais utilize velas, fósforos e isqueiros para iluminar o ambiente. Dê preferência às lâmpadas de emergência ou lanternas de pilhas.
- Evite ao máximo o acúmulo de lixo em locais não apropriados.
- Os materiais de limpeza deverão ser acondicionados em recipientes próprios, devidamente identificados e em locais apropriados.
- Mantenha desobstruídas as áreas de escape e não deixe, mesmo que provisoriamente, materiais nas escadas e nos corredores.
- Mantenha todos os equipamentos elétricos desligados após a utilização, desconectando-os das tomadas.
- Não conecte ou desconecte equipamentos com as mãos molhadas.
- Não cubra fios elétricos com livros, cadernos, jalecos e outros materiais que possam servir de combustível em caso de superaquecimento. No caso da corrente elétrica estar acima da capacidade da fiação, ocorrerá o superaquecimento dos fios.
- Ao utilizar materiais inflamáveis, dê preferência às quantidades mínimas, armazenando os frascos na posição vertical, em local apropriado (longe de fontes de calor) e na embalagem original.
- Observe sempre as normas de segurança ao manipular gases, inflamáveis e explosivos. Não utilize chamas ou aparelhos superaquecidos próximos a esses tipos de materiais.

- Não improvise instalações elétricas, nem efetue consertos em tomadas, interruptores e equipamentos sem que esteja familiarizado com isso.
- Não sobrecarregue as instalações elétricas com a utilização do plugue tipo T (benjamins). Tomada quente é sinônimo de desperdício e indicação de perigo (possibilidade de fogo).
- Não permita o uso de extensões, principalmente se essas forem empregadas para ligar diversos equipamentos. Os equipamentos deverão ter a sua tomada (macho) conectada à tomada (fêmea) adequada e devidamente aterrada.
- Não permita que os fios e cabos sejam emendados. Elimine a possibilidade de utilizar fios e cabos descascados e estragados.

Todas as atividades em que o uso da eletricidade é necessário requerem cuidados extremos, principalmente daqueles que estão se iniciando na vida científica. A observância das normas de segurança é fundamental, de modo a não se permitir que uma pessoa receba uma descarga elétrica, a qual muitas das vezes poderá ser fatal. De tempos em tempos, faça uma revisão nos fios dos aparelhos elétricos e na instalação elétrica do seu ambiente de trabalho, devidamente assessorado por um profissional capacitado. No caso de um equipamento do laboratório apresentar qualquer defeito, não pense duas vezes para providenciar o conserto.

Referências bibliográficas

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios para a habilitação de laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório (BPL). Brasília, 2001.

BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Identificação para o transporte terrestre, manuseio, movimentação e armazenamento de produtos – NBR 7500. Disponível em <<http://www.abnt.org.br>>. Acesso em: abr. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia*. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciências e Tecnologia. *Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos*. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2006.
- CAMPOS, A. *Cabines de segurança biológica*. In: VALLE, S.; TELLES, J. L. *Bioética e Biorrisco*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- CARVALHO, P. R. *O Olhar Docente sobre a Biossegurança no Ensino de Ciências: um estudo em escolas da rede pública do Rio de Janeiro*, 2008. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- CARVALHO, P. R. Segurança química em laboratórios e unidades de saúde. In: MARTINS, E. V. et al. (Orgs). *Biossegurança: informação e conceitos*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006.
- CARVALHO, P. R. *Boas Práticas Químicas em Biossegurança*. Rio de Janeiro: Interciência, 1999.
- CHRISTOFARI, V. E.. *Introdução ao Estudo do Direito*. 4. ed. Canoas: Ulbra, 1998.
- COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. *Biossegurança de A a Z*. 2. Edição. Rio de Janeiro: Publit, 2009.
- COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. *Entendendo a Biossegurança: epistemologia e competências para área de saúde*. Rio de Janeiro: Publit, 2006.
- COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. *Segurança e Saúde no Trabalho: cidadania, competitividade e produtividade*. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2005.
- COSTA, T. F.; FELLI, V. E. A. Exposição dos trabalhadores de enfermagem às cargas químicas em um hospital público universitário da cidade de São Paulo. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 13, n. 4, jul.-ago. 2005.
- FIOCRUZ. *Procedimentos para manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.
- GOLDIM, J. R. *Conceitos Fundamentais: da moral à bioética*. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/concei.ppt>>. Acesso em: jan. 2009.
- INMETRO. *Vocabulário Internacional de Metrologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: CNI/Senai, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Classificação de risco dos agentes biológicos*. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- NISHIDE, V. M.; BENATTI, M. C. C. Riscos ocupacionais entre trabalhadores de enfermagem de uma unidade de terapia de terapia intensiva. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 38, n. 4, p. 406-414, 2004.

- OPS/PMS. *Cabinas de Seguridad Biológica: uso, desinfección y mantenimiento*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/cabinas_seguridad.pdf>. Acesso em: jan. 2009.
- PESSOA, C.; LAPA, R. Bioinstalações. In: VALLE, S.; TELLES, J. L. *Bioética e Biorrisco*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- SCHRAMM, F. R. *Bioética e Biossegurança*. Mimeo, 2006. Disponível em: <www.antigona.org.br>. Acesso em: fev. 2009.
- SEWELL, D. L. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 3, p. 389-405, 1995.
- SILVA, L. R.; PELAEZ, V.; VALLE, S. Implementação da Lei de Biossegurança no Brasil. In: COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. (Orgs.). *Biossegurança de OGMs: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publit, 2009.
- SKARABA, I.; NICKEL, R.; WOTKOSKI, S. R. Barreiras de contenção: EPIs e EPCs. In: MASTROENI, M. F. *Biossegurança: aplicada a laboratórios e serviços de saúde*. São Paulo: Atheneu, 2004.
- TEIXEIRA, P. *Riscos biológicos em laboratórios biomédicos*. Curso de Biossegurança online, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2000.
- VALLE, S. A Lei de Biossegurança no Brasil. In: COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. (Orgs.). *Biossegurança Geral*. Rio de Janeiro: Publit, 2009.
- VALLE, S.; BARREIRA, Y. (Orgs.). *Biossegurança-Engenharia Genética: legislação brasileira*. Rio de Janeiro: Publit, 2007.
- VALLE, S.; TELLES, J. L. *Bioética Biorrisco: abordagem transdisciplinar*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- VÁSQUEZ, A. S. *Ética*. 18. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1998.

Questões para reflexão

1. O ato de jogar na pia de um laboratório resíduos de substâncias químicas ou materiais biológicos pode ser considerado uma ação antiética? Por quê?

2. Em um laboratório micológico de análises clínicas, trabalhavam um farmacêutico-bioquímico com grau de doutor (responsável pelo laboratório) e dois técnicos de nível médio e um auxiliar de serviços técnicos. O laboratório realizava diagnóstico clínico micológico de material (sangue, escarro, unha, raspado de pele, cabelo, etc.) suspeito de conter fungos patogênicos para o homem. O espaço físico era pequeno, com muitos equipamentos antigos sem manutenção preventiva. O responsável pelo laboratório solicitou ao técnico que providenciasse o exame ao microscópio e a semeadura do escarro, que havia chegado de um paciente com suspeita de paracoccidiodomicose, na tentativa de visualização e isolamento do fungo *Paracoccidoides brasiliensis*. O trabalho de rotina no laboratório era realizado em uma cabine de fluxo laminar horizontal, que havia sido herdada do setor de preparo de meios de cultura e testes de esterilidade. Porém, quando a cabine estava ocupada, o trabalho era feito em bancada na frente de um bico de Bunsen. O técnico então preparou lâminas e meio de cultura para a semeadura. Durante o trabalho, o técnico, utilizando a cabine como um equipamento de proteção, usava luvas, máscaras cirúrgicas e jalecos de mangas curtas.

Durante o manuseio do material, o técnico acidentalmente se feriu com a alça de platina contendo material clínico suspeito (fungo). Imediatamente comunicou o fato ao responsável do laboratório, que o orientou a buscar atendimento médico.

Fazendo uma análise crítica da situação exposta acima:

2.1 – Descreva as principais causas relacionadas ao acidente descrito no laboratório.

2.2 – Cite os erros cometidos por cada profissional do laboratório que poderiam estar relacionados direta ou indiretamente ao acidente.

2.3 – Faça uma análise crítica do ocorrido levando em consideração a estrutura do laboratório, a classe de risco do microrganismo envolvido e os equipamentos de proteção utilizados.

3 – Quais são as exigências para que um laboratório esteja em conformidade com as normas, regras e princípios preconizados pelas boas práticas de laboratório, no que tange à instalação de balanças analíticas e demais equipamentos de precisão, com vistas à obtenção de resultados confiáveis?

Capítulo 2

Conceitos e técnicas básicas aplicadas em laboratório

Maria Beatriz Siqueira Campos de Oliveira
Joseli Maria da Rocha Nogueira

A preocupação com a organização do laboratório e a disposição, o funcionamento e a manutenção dos equipamentos é um tópico que deve constar na lista de prioridades do técnico de laboratório da área da saúde. O entendimento de alguns conceitos básicos próprios da área é importante, bem como o conhecimento dos tipos de vidrarias, dos equipamentos e das metodologias aplicadas nos laboratórios. Dessa forma, a interdisciplinaridade é uma tônica na área laboratorial que deve ser enfatizada pelos profissionais no intuito de atender a legislação vigente, as boas práticas de laboratório e as normas de biossegurança. Nessa perspectiva, as instalações, a infraestrutura e o *layout* do laboratório devem ser cuidadosamente planejados para aumentar a segurança dos profissionais, a vida útil e o bom funcionamento dos equipamentos e a qualidade dos ensaios.

O primeiro cuidado é atender as normas de Biossegurança (ver capítulo 1): verificar que as portas abram para fora, para facilitar a saída em casos de

emergência, instalar chuveiros e lava-olhos em pontos estratégicos, observar os espaços entre os equipamentos que trabalham com compressor para evitar aquecimento dos mesmos e instalar deionizador ou desmineralizador em salas separadas, uma vez que a regeneração das resinas poderá oxidar superfícies metálicas.

O projeto de infraestrutura e de iluminação dos laboratórios deve ser elaborado de acordo com as boas práticas de laboratório ou de produção, dependendo da utilização dos mesmos. Sendo assim, laboratórios de produção têm um maior rigor de exigência apresentando os cantos das paredes arredondados, superfícies feitas com material limpável (tinta epóxi, por exemplo), luminárias lacradas com troca de lâmpadas pela parte superior do teto. Os aparelhos de ar condicionado e seus filtros também requerem atenção especial.

Como já mencionado cada tipo de laboratório de saúde vai demandar diferentes necessidades de acordo com as atividades desenvolvidas. O laboratório de análises clínicas ou biodiagnóstico, por exemplo, exige uma sala separada para coleta e recepção de material biológico. Além disso, um cuidado especial deve ser dado aos prontuários, as fichas que acompanham os referidos materiais e a rotulagem das amostras, visto que qualquer erro nessa etapa pode acarretar prejuízos graves.

Além desses itens, outras padronizações devem ser consideradas para qualquer laboratório, como tubulações pintadas com as cores indicadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT/NBR-6493/out. 1994):

ALARANJADO – produtos químicos não gasosos (ex.: soda cáustica)

AMARELO – gases não liquefeitos (ex.: amônia, ozônio)

AZUL – ar comprimido

BRANCO – vapor

CINZA-CLARO – vácuo

CINZA-ESCURO – eletroduto, painéis elétricos

COR DE ALUMÍNIO– gases liquefeitos inflamáveis, combustíveis de baixa viscosidade (ex.: *diesel*, gasolina, querosene, lubrificantes, solventes)

MARROM– canalização – materiais fragmentados (minério bruto), petróleo bruto

PRETO– combustíveis de alta viscosidade (ex.: óleo combustível/BPF, asfalto, piche)

VERDE EMBLEMA– água, exceto a de combate a incêndios

VERMELHO– água e outras substâncias destinadas a combater incêndio

Observações:

- Embora não conste na NBR, é de uso comum distinguir a água potável com a cor verde-claro (verde-claro/verde Nilo) da água de uso industrial com a cor verde emblema.
- A cor marrom, como no caso citado, é utilizada para pintura de tubulação de águas servidas, isto é, não de esgoto sanitário (ex.: água de descarte em máquinas lavadoras, de ralos e de pias).
- Importante: a tubulação de inox deverá ser pintada com anéis no meio de cada seção reta e nas extremidades (iniciais e finais) das linhas.

Outros pontos que merecem atenção ao se elaborar as instalações do laboratório são a localização e os procedimentos relacionados aos gases comprimidos, principalmente os gases acondicionados em cilindros. Dessa forma, devem ser observados os seguintes cuidados:

- Em cilindros contendo gases fortemente oxidantes, as vedações jamais deverão ser lubrificadas com graxa, óleo ou glicerina.
- Somente use cilindros quando estiverem equipados com válvulas de redução.

- Ao transportar cilindros deve-se, sempre, ter o cuidado de fechar a válvula de saída e nunca esquecer de usar a capa de proteção da válvula e um carrinho apropriado para transporte.
- Nunca esqueça os cilindros soltos no laboratório.
- Nunca coloque cilindros próximos a fontes de calor ou chama direta. A temperatura da área de estocagem não pode ultrapassar 40°C.
- Antes de iniciar o trabalho, deve-se verificar a existência de vazamento, por meio de solução de água com sabão.
- Cilindros vazios devem ser etiquetados e estocados em áreas separadas.

Gás	Risco
Hidrogênio	Fogo, explosão
Sulfeto de hidrogênio	Fogo, irritante, tóxico
Nitrogênio	Asfixia
Oxigênio	Fortemente reativo
Dióxido de carbono	Asfixia e queimadura
Propano	Fogo, asfixia, explosão
Butano	Fogo, explosão
Acetileno	Fogo, explosão

Em relação às instalações do laboratório, devemos considerar um local dedicado ao processo de lavagem e esterilização, que poderão estar contíguos ou separados. Neste local ficarão os destiladores ou outro tipo de água purificada por ultrafiltração, autoclaves, fornos e geradores de vapor limpo. Devem ser projetados, também, uma bancada de aço inox com tanques para lavagem, além de bancadas onde os materiais serão embalados para esterilização. Devem estar previstas no projeto tomadas de 110 e 220 volts. Em

alguns casos, a instalação elétrica deve possuir um disjuntor para cada equipamento, como, por exemplo, a autoclave.

1. Conceitos básicos

1.1. Desinfecção por agentes químicos:

- **Limpeza**

É a remoção da sujidade de qualquer superfície, reduzindo o número de microrganismos. Esse procedimento deve ser obrigatoriamente realizado antes da esterilização ou desinfecção. Para cada laboratório deve existir uma padronização do processo de limpeza, incluindo tipo de água utilizada (ver item 2 – tratamento de água), sabão e detergente neutro. Deve-se evitar produtos à base de ácidos forte e oxidante (por exemplo, solução sulfocrômica) com o objetivo de não causar danos ao solo e ao lençol freático. Outro cuidado importante é a preocupação com o que está sendo jogado nas pias e nos ralos dos laboratórios, pois os restos de meio de cultura, reagentes e corantes que são descartados sem tratamento vão causar danos, às vezes irreversíveis ao meio ambiente.

- **Assepsia**

Conceito desenvolvido pelo médico húngaro Ignaz Semmelweis, em 1851. É o conjunto de medidas preventivas que permitem manter um ser vivo ou um meio inerte, isento de microrganismos, evitando a introdução de um contaminante em ambiente ainda não contaminado ou que já foi controlado. Normalmente se utiliza o termo 'técnicas assépticas'. Em um centro cirúrgico ou numa sala limpa de envase de vacinas, por exemplo, deve ser adotado um conjunto de medidas assépticas para se evitar levar microrganismos para aquele local o que causaria contaminação do ambiente.

- **Antissepsia**

Refere-se à desinfecção de tecidos vivos com antissépticos (agentes químicos), eliminando ou inibindo as formas vegetativas dos microrganismos. Os antissépticos são encontrados no mercado em várias apresentações, tais como: solução, pomada, talco e creme.

Em relação à classificação dos materiais hospitalares, temos:

Materiais críticos – Materiais que entram em contato com vasos sanguíneos e tecidos livres de microrganismos. O material crítico deve ser esterilizado. Ex.: instrumentais.

Materiais semicríticos – Materiais que entram em contato com mucosa e pele não íntegra. Esses materiais devem ser esterilizados ou desinfetados de acordo com a necessidade de utilização. Ex.: inaladores.

Materiais não-críticos – Materiais que entram em contato com a pele íntegra. Esses materiais devem ser lavados de acordo com o procedimento operacional padronizado e desinfetados, se for necessário. Ex.: comadre.

- **Desinfecção**

É um processo que reduz o número de microrganismos, eliminando grande parte dos contaminantes existente em um local ou material. Atua sobre as formas vegetativas, sem atingir necessariamente os esporos. A desinfecção pode ser realizada por meios físicos ou químicos e está indicada para materiais semicríticos e não-críticos. Em relação à desinfecção de superfícies, devemos sempre partir do local menos contaminado para o mais contaminado. Outra atividade básica é a troca, sempre que possível, do 'pano' utilizado para a aplicação do desinfetante como, por exemplo, entre bancadas e chão. Além disso, o nível de desinfecção dependerá de variáveis como temperatura, tem-

po e concentração de germicidas adicionados no processo. Pode ser de alto nível, intermediário ou baixo.

Desinfecção de baixo nível – são inativadas as bactérias em forma vegetativa, alguns vírus e alguns fungos. O *Mycobacterium tuberculosis*, os esporos bacterianos, o vírus da hepatite B (HBV) e os vírus lentos sobrevivem. Ex.: álcool etílico e isopropílico, hipoclorito de sódio (100 ppm), fenólicos, quaternário de amônia. Obs.: tempo de exposição < ou = a dez minutos.

Desinfecção de médio nível – além dos microrganismos destruídos na desinfecção de baixo nível são atingidos o *Mycobacterium tuberculosis*, a maioria dos vírus (inclusive o HBV) e a maioria dos fungos. Ainda sobrevivem o *Mycobacterium intracelulare*, os esporos bacterianos e os vírus lentos. Ex.: álcool etílico e isopropílico (70 a 90%), fenólicos, hipoclorito de sódio (100 ppm), pasteurização 75°C a trinta minutos. Obs.: depende da concentração e/ou do período de exposição.

Desinfecção de alto nível – resistem apenas alguns tipos de esporos bacterianos mais resistentes e os vírus lentos. Ex.: glutaraldeído, solução de peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio (1.000 ppm), cloro e compostos clorados, ácido peracético, orthophtalaldeído, água superoxidada, pasteurização 75°C a trinta minutos. Obs.: tempo de exposição > ou = vinte minutos.

Características ideais de um agente desinfetante:

- amplo espectro;
- ação rápida;
- não ser afetado por fatores ambientais (ex.: luz);
- deve ser ativo na presença de matéria orgânica;

- ser compatível com sabões, detergentes e outros produtos químicos;
- atóxico (não deve ser irritante para o usuário);
- compatível com diversos tipos de materiais (não corrosivo em superfícies metálicas e não deve causar deterioração de borrachas, plásticos e outros materiais);
- efeito residual na superfície;
- fácil manuseio;
- inodoro ou de odor agradável;
- econômico;
- solúvel em água;
- estável em concentração original ou diluído;
- não poluente.

Efeitos dos agentes químicos nas bactérias:

Os diferentes agentes químicos, chamados germicidas, quando contidos nas preparações químicas, podem produzir ação bactericida ou ação bacteriostática:

Ação bactericida – O agente químico tem a propriedade de eliminar as bactérias. É uma ação irreversível porque a 'bactéria morta', mesmo que o agente químico seja removido, não é mais capaz de se reproduzir.

Ação bacteriostática – O agente químico tem a propriedade de inibir a multiplicação das bactérias. Quando o agente químico é removido, a multiplicação é retomada.

Principais desinfetantes:

Álcool – O valor do álcool como germicida foi recentemente revisto, uma vez que o álcool tem mais ação fixadora do que

desinfetante, dependendo de sua concentração. Os alcoóis etílico e isopropílico são bactericidas intermediários e rápidos, além de serem notadamente efetivos contra o bacilo da tuberculose, porém não são esporicidas. É conveniente usar uma só concentração de álcool em todo o hospital, sendo a concentração ideal de 70% de peso por volume, visto que a de 60% tem sua atividade bem diminuída. Os alcoóis evaporam-se rapidamente, coagulam proteínas e são solventes orgânicos. Apesar da rápida evaporação, têm a vantagem de não deixar resíduos em superfícies. São necessárias repetidas aplicações com álcool a 70% para se conseguir a ação adequada. Todavia sua utilização pode danificar componentes de alguns instrumentais, ressecar artigos de borracha e branquear a cobertura asfáltica dos pisos. Deve-se evitar exposições por mais de dez minutos na pele por poder causar irritação, apesar de nesse espaço de tempo alcançar toda sua atividade desinfetante considerando sua extraordinária capacidade germicida e bactericida, o etanol a 70% pode ser usado em itens semicríticos e não-críticos.

Compostos de cloro – O cloro inorgânico, apesar de econômico, tem uso limitado, não podendo ser extensivamente usado devido ao seu poder oxidante em várias superfícies, principalmente metais. Apesar disso, a tradicional solução de hipoclorito de sódio a 2% é um dos melhores e mais antigos germicidas para desinfecção local. Na concentração de 4 a 5%, é também tuberculocida, mas sem capacidade esporicida. Hipoclorito de sódio, onde seja aplicável, é capaz de ter ação de amplo espectro (bactericida e viricida), o que o torna recomendável como um efetivo desinfetante intermediário para itens não-críticos e semicríticos.

Compostos fenólicos – O ácido fênico ou carbólico é considerado o mais antigo germicida existente. Apesar de não ser mais usado como desinfetante, seus derivados são muito utilizados e constituem os compostos fenólicos. Essa classe é muito popular para desinfecção doméstica. Os fenólicos são bons bactericidas, são estáveis e permanecem ativos depois de algum tempo secos. Sua diluição a 2 e 3% é ativa quando em contato com matéria orgânica, por isso são os desinfetantes escolhidos para lidar com contaminação fecal. Porém, os fenólicos são absorvidos por material poroso, além de serem irritantes para a pele. Conseqüentemente, seu uso na desinfecção de utensílios ou áreas semicríticas é limitado. Pelas mesmas razões e porque não são esporicidas, não são usados em áreas e material críticos.

Formol ou formaldeído – É um composto líquido claro, com várias aplicações. Sua solução a 37% vem sendo usada, normalmente, como preservativo (peças de anatômico), desinfetante e antisséptico. A formalização ou fumigação é uma desinfecção de ambiente realizada por sublimação de formaldeído durante um mínimo de seis horas à temperatura de 200°C, usando aquecedor elétrico com *timer*. Após a desinfecção, o formol presente no ar é desnaturado por evaporação de 3 g/m³ de carbonato de amônia durante duas horas e trinta minutos a 200°C. Após a desnaturação, o ar é ventilado por duas horas – filtros Hepa (*High Efficiency Particulate Air*) – a fim de retirar os eventuais vapores residuais. O operador deverá utilizar proteção ocular e máscara de gás com cartucho adequado, uma vez que essa substância é cancerígena de mucosa.

Glutaraldeído – O dialdeído saturado é relacionado quimicamente com o formaldeído. Pesquisadores concluíram que a ação

esporicida do glutaraldeído a 2% aquoso é igual ao do formaldeído a 8% também aquoso, desde que a solução seja alcalinizada. As soluções aquosas de glutaraldeído são ácidas e fracamente microbicidas, mas podem ser ativadas pela alcalinização com bicarbonato de sódio. Apesar disso, sofrem uma significativa perda de atividade em temperatura ambiente por duas semanas. O glutaraldeído elimina algumas bactérias rapidamente, vírus não envelopados em dez minutos, bacilo da tuberculose em vinte minutos e esporos em período de três a 12 horas. Portanto, glutaraldeído aquoso a 2% alcalinizado é um poderoso germicida-esporicida, podendo ser usado em materiais danificáveis pelo álcool.

Iodóforos – Sabidamente, o iodo é um dos melhores antissépticos encontrados até os dias atuais – talvez o melhor. Muitos iodóforos são considerados desinfetantes compráveis para uso geral, nas adequadas concentrações, ainda que instáveis na presença de água pura, calor e matéria orgânica. Inativam vírus a 150 ppm e destroem bacilos da tuberculose de 300 a 450 ppm. Consequentemente, na concentração de 300 a 450 ppm são desinfetantes valiosos no uso em itens não-críticos e semicríticos. Apesar disso, sua ação germicida provém da liberação do iodo livre, o que o torna irritável para a pele.

Metanol-etanol (formaldeído-álcool) – A concentração de 8% do formaldeído é um germicida de alto nível. Essa atividade ainda pode ser aumentada, adicionando-se álcool. Uma combinação de 8% de formaldeído com 65 a 70% de álcool (metanol-etanol) é tuberculocida em cinco minutos. Formalina (20%) é um ótimo esporicida, mas o tempo requerido para isso pode ser de trinta horas ou mais. Quando combinado com álcool, apesar de sua

maior atividade, pode necessitar de até 18 horas dependendo das condições do teste. Combinado com outros compostos químicos, pode reduzir mais o tempo necessário para sua ação esterilizante. Um aspecto importante a ser considerado é a possível toxicidade das substâncias utilizadas e o grau de dano que pode causar às superfícies e aos ambientes.

Quaternários de amônio – Os quaternários têm tido seu uso largamente difundido, tanto como desinfetante quanto como antisséptico. Contam com a importante qualidade de serem menos irritantes, por isso são tão populares. É fundamental considerar a suavidade desta classe de germicida quando for necessário escolher um desinfetante e/ou antisséptico.

Avaliação microbiológica dos desinfetantes:

As metodologias de avaliação dos desinfetantes têm sido permanentemente questionadas porque, em alguns casos, a eficácia do composto ativo é diferente daquela testada laboratorialmente. Várias técnicas vêm sendo propostas baseadas na metodologia do coeficiente fenólico, descrita em 1903 por Rideal e Walker e idealizada para comparar a atividade antibacteriana dos derivados fenólicos naturais do ácido fênico (fenol). O teste, que era realizado apenas frente à *Salmonella* Typhi, hoje já sofreu várias adaptações e inclusive é utilizado não só para os compostos fenólicos, mas também para outros compostos com ação antibacteriana. O protocolo oficial usado no Brasil desde 1985 está atualmente descrito no manual da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) para a avaliação microbiológica de desinfetantes químicos.

Na qualificação de desinfetantes domésticos, utiliza-se *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708). Para desinfetantes institucionais, inclui-se também a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC

15442). Para desinfetantes hospitalares, dependendo da área, pode-se adicionar cepas de *Mycobacterium*.

Coeficiente fenólico

Para se standardizar um desinfetante, é necessário determinar o coeficiente fenólico do mesmo (BREWER, 1943). Este coeficiente consiste na determinação da ação germicida do agente químico sobre o organismo teste mediante determinadas temperaturas em função do tempo, comparada com a ação do fenol em condições idênticas.

Meio de cultura

Extrato de carne 0,5%

Peptona 1,0%

NaCl 0,5%

Ajustar o pH = $6,8 \pm 0,1$

Amostras padrão para teste em cultura recente (24 horas):

Salmonella choleraesuis (ATCC 10708)

Staphylococcus aureus – FDA 209 (ATCC 6538)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442)

Distribuir em tubos 25 x 250 ml, 10 ml de meio, e esterilizar. Adicionar a amostra padrão, de escolha.

Técnica:

a) Separar duas baterias, a primeira contendo dez tubos e a segunda, dois tubos. Na primeira, adicionar 5 cm³ de várias diluições do desinfetante em teste. Na segunda, adicionar a diluição de fenol de 1/90 e 1/100 partindo de uma solução de fenol a 5% (titulada por meio de bromo).

b) Adicionar a cada tubo das duas baterias $0,5 \text{ cm}^3$ da cultura padrão. Manter os tubos em banho-maria a 20°C e tirar repiques (alça 4 mm) de cinco em cinco minutos, isto é, após cinco, dez e 15 minutos e se inocula em outros tubos contendo meio de cultura estéril. Os tubos semeados são incubados a 37°C por 48 horas, quando são lidos e comparados os resultados.

Cálculos:

Dividir a diluição do desinfetante capaz de matar a *S. typhi* em dez, mas não em cinco minutos, pela maior diluição de fenol, que produz o mesmo efeito.

Exemplo:

a) Solução de ácido fênico padrão:

Diluição	5 min.	10 min.	15 min.
1/90	+	-	-
1/100	+	+	+

+ crescimento

- estéril

b) Solução do desinfetante a verificar:

Diluição	5 min.	10 min.	15 min.
1/200	-	-	-
1/300	+	-	-
1/400	+	+	+

Coeficiente fenólico:

$$\frac{300}{90} = 3,33$$

Resultado do coeficiente fenólico:

- Ótimo desinfetante, igual ou superior a 3;
- Bom desinfetante, entre 2 e 3;
- Médio desinfetante, entre 1 e 2;
- Péssimo desinfetante, abaixo de 1.

Sanitização

Método que envolve diferentes processos, visando a obter o grau de higiene e limpeza adequadas em todos os componentes do ambiente de trabalho, reduzindo, assim, os microrganismos presentes a um número compatível com o produto e aceito pela legislação. O método envolve quatro estágios:

1. Limpeza inicial da sujidade macroscópica e grossa, utilizando água;
2. Remoção física da sujeira promovida por detergentes;
3. Novo enxágue;
4. Aplicação de sanitizantes (desinfetantes).

1.2.Desinfecção por agentes físicos

• Pasteurização

Processo idealizado por Louis Pasteur, em 1864, que verificou que o aquecimento acima de 60°C de certas bebidas e alimentos, por um determinado tempo (chamado de binômio 'tempo x temperatura'), evitava a sua deterioração, reduzindo de maneira sensível o número de microrganismos presentes na sua composição.

A partir desta descoberta, esse foi o tratamento recomendado para reduzir a população de microrganismos termossensíveis (sobretudo não esporulados) presentes em amostras, principalmente nos alimentos, tais como sucos de frutas e leite. Normalmente, é empregado para produtos que possuem características organolépticas e nutricionais altamente suscetíveis a altas temperaturas. Este tratamento deve ser associado ao emprego de outros métodos, como refrigeração, adicionamento de açúcar ou aditivos e uso de embalagens herméticas.

Existem, atualmente, três tipos de pasteurização:

Pasteurização lenta – na qual se utiliza menores temperaturas (por volta de 65°C) durante maior intervalo de tempo (aproximadamente trinta minutos). Podemos denominar o processo como LTLT (*low temperature long time*) – baixa temperatura e longo tempo. Este tipo é melhor para pequenas quantidades de leite, por exemplo, o leite de cabra.

Pasteurização rápida – na qual altas temperaturas são utilizadas por curtos intervalos de tempo. A temperatura utilizada é de 75°C durante 15 a vinte segundos. Podemos denominar esse tipo de pasteurização como HTST (*high temperature and short time*) – alta temperatura e curto tempo. É mais usada no leite de saquinho, do tipo A, B e C.

Pasteurização muito rápida – na qual as temperaturas utilizadas são bastante altas (130°C a 150°C) mas durante um tempo extremamente curto (de três a cinco segundos). Este tipo é mais conhecido como UHT (*ultra high temperature*). É utilizada nas caixinhas de leite tipo 'longa vida'.

- **Tindalização**

Processo vinculado ao físico inglês Jonh Tindall. É uma técnica de esterilização fracionada, em que o vapor fluente (água de 60°C a 90°C) é aplicado durante trinta a sessenta minutos, por repetidas vezes, resfriando-se entre cada aquecimento. Este processo é usado quando não se deseja a coagulação das proteínas e o seu princípio visa a destruir as formas vegetativas apenas, o que se consegue simplesmente pela aplicação do vapor fluente. Durante o período de repouso à temperatura ambiente (por volta de 24 horas), as formas de resistência (esporos) passam para formas vegetativas e

assim, quando submetidas novamente a vapor fluente, são destruídas. O número de operações pode variar de três a 12 vezes, dependendo do rigor e da qualidade desejada. É um processo muito usado na indústria de alimentos e farmacêutica, quando se deseja preservar a qualidade do produto que está sendo esterilizado, pois podem ser mantidos praticamente todos os nutrientes e as qualidades organolépticas do produto, em proporções maiores do que quando se utilizam outros tratamentos térmicos. Ex.: produtos açucarados ou que contenham gelatina.

1.3. Esterilização

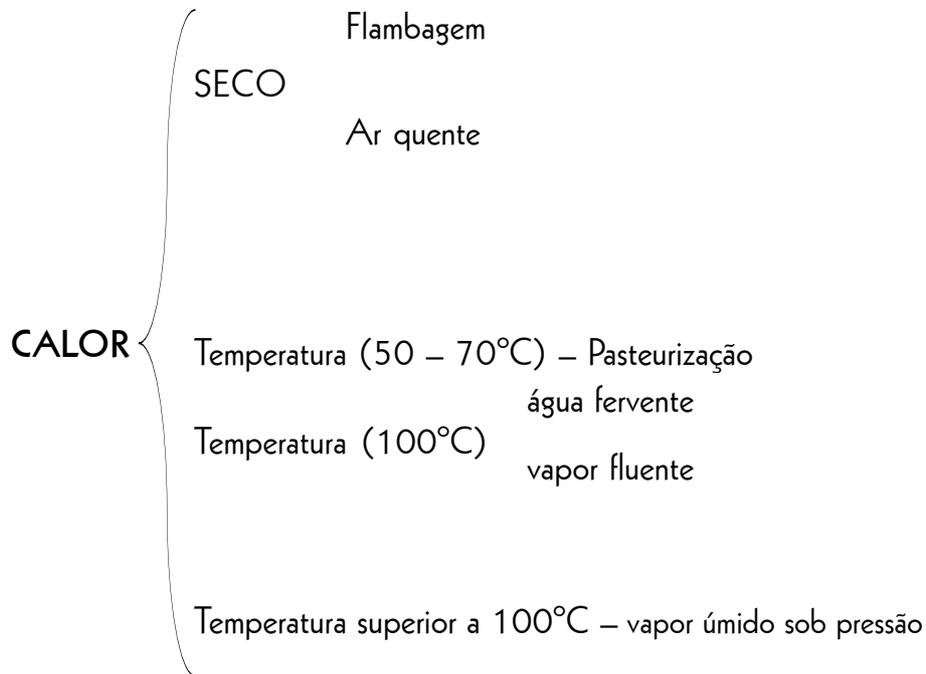
O ato de esterilizar visa à destruição de qualquer microrganismo existente, incluindo esporos, enquanto o ato de desinfetar preocupa-se apenas com a destruição de formas vegetativas. A esterilização, dessa forma, é o processo que promove a completa eliminação de todos os microrganismos presentes (protozoários, vírus, fungos e bactérias), incluindo os esporos, em um determinado material ou ambiente. Utilizam-se agentes físicos e químicos. É diferente de limpeza e de assepsia, uma vez que estes conceitos estão mais ligados ao controle de microrganismos, ao passo que a esterilização se refere à eliminação total dos mesmos.

De uma maneira geral, os processos de esterilização são físicos e os de desinfecção são químicos (o que não quer dizer que não poderíamos fazer uma esterilização química ou vice-versa).

Exemplo de esterilização física:

- **Calor**

Os processos mais comuns de controle baseiam-se no uso do calor, sendo a via úmida a mais efetiva.



- **Calor seco**

De um modo geral, podemos dividir este tipo de esterilização em duas técnicas: a utilização do ar quente e a flambagem (incineração):

Utilização do ar seco ou ar quente – É recomendada quando o contato direto com o calor úmido (vapor) sob pressão não é adequado ao tipo de material, como ocorre com certos tipos de vidraria, óleo, pós e substâncias similares. O aparelho usado neste tipo de esterilização é um forno (elétrico ou a gás) capaz de atingir altas temperaturas. A despirogeneização (destruição de pirogênicos, substâncias capazes de elevar a temperatura corporal, frequentemente polissacarídeos que podem ser de origem microbiana – ver capítulo sobre bacteriologia) só pode ser feita no forno à 180°C. A autoclave não elimina o pirogênio.



Obs.: Para esterilização de vidraria limpa, uma exposição de duas horas a 160°C é considerada suficiente.

Incineração – É a queima total de um material, usada para destruição de carcaças de animais ou outros materiais infectados. A destruição de microrganismos por calor direto é também praticada na rotina do laboratório quando a alça ou agulha de platina é levada à chama do bico de Bunsen (flambagem). Primeiro se leva a alça à chama interna de cor azul, denominada de 'chama fria', e depois, vagarosamente, se desliza a alça para a chama externa (vermelha) para realizar a flambagem. Quando a alça ou agulha de platina ficar totalmente incandescente, é sinal de que foi feita a esterilização. Esse procedimento evita a formação de aerossóis, responsáveis pela contaminação do meio ambiente.



• Calor úmido

O calor sob forma de vapor d'água sob pressão é considerado o agente mais prático e eficiente para esterilização. Proporciona temperaturas mais elevadas que na ebulição, com vantagens como a rápida elevação de temperatura e maior penetrabilidade. O aparelho utilizado para este fim recebe o nome de autoclave. Geralmente, embora não sempre, a autoclave é operada numa pressão de $\cong 15$ libras por polegada quadrada ($1 \text{ atmosfera} = 121^\circ\text{C}$) sendo o tempo variável de acordo com o material a ser esterilizado.

Atualmente, alguns laboratórios já estão adotando normas mais rígidas na autoclavação de seus utensílios, principalmente em casos de material cirúrgico.

Após a descoberta de que os príons (proteínas infecciosas causadoras de doenças chamadas de encefalopatias espongiformes transmissíveis, como Scrapie, Kuru, Creutzfeldt-Jakob e BSE) são capazes de resistir à autoclavação

normal e a várias substâncias químicas, estão sendo preconizadas autoclavagens a 134°C por duas horas, na certeza de inativação destes elementos.

Os materiais que serão autoclavados deverão estar devidamente acondicionados para que ao final do ciclo de esterilização possam ser retirados e utilizados com segurança. Para que isso aconteça, alguns critérios deverão ser levados em conta na hora da escolha da embalagem para a esterilização:

Deve-se levar em conta o material e o método de esterilização sendo compatível e resistente às condições físicas do processo de esterilização.

Deve proporcionar selagem adequada e barreira microbiana.

Deve permitir a penetração e remoção do agente esterilizante.

Deve resistir a rasgos e ser livre de furos.

Não pode ter na sua composição substâncias tóxicas.

Deve apresentar custo-benefício positivo.

Considerando a garantia da qualidade da esterilização, podemos lançar mão de indicadores químicos e biológicos oferecidos de diferentes formas no mercado. Estes deverão ser testados pelo controle da qualidade e mantidos na validade e em condições ideais de estocagem.

Indicadores químicos:

Externos: indicam o contato do vapor com a superfície exposta. Devem ser usados em todos os processos e pacotes.	Fitas ou etiquetas adesivas – impregnadas com substâncias químicas termosensíveis específicas ao vapor que, ao serem retiradas da autoclave, deverão apresentar mudança de cor.
	Impresso – tinta indicativa termosensível impressa diretamente na embalagem que, ao ser retirada da autoclave, deverá apresentar mudança de coloração.
Interno: indicam que o vapor penetrou no interior da embalagem.	Tintas de papel – impregnadas com tinta em concentração graduada com substâncias químicas termosensíveis específicas ao vapor que, ao serem retiradas da autoclave, deverão apresentar coloração marrom a preto.

Indicadores biológicos:

São utilizados espécimes bacterianos não patogênicos com esporos altamente resistentes ao calor úmido e à dessecação. O exemplo mais comum é o *Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus*, utilizado como desafio, já que, uma vez tendo sido eliminado, todos os outros esporos e formas vegetativas também o serão.

Para fazer o teste biológico do funcionamento da autoclave, utiliza-se os esporos dentro de um recipiente, que irá passar pelo ciclo de esterilização da autoclave. Coloca-se o pacote teste embaixo junto ao dreno ou, nos modelos verticais, no meio da câmara, que são os pontos respectivamente mais frios em função da localização das resistências. Ao final do ciclo, após o resfriamento total, abre-se o recipiente expondo os esporos ao meio de cultura. Coloca-se para incubar em estufa bacteriológica com um controle positivo (outro indicador de controle idêntico que não vai para autoclave, mas deve ser ativado da mesma forma, já que a sua finalidade é testar tanto a viabilidade dos esporos quanto verificar se a incubadora está funcionando corretamente).

O resultado esperado é a mudança de cor causada pela alteração de pH da solução que resulta da atividade microbiana. O teste levado ao autoclave não deve mudar de cor, pois o esperado é que os microrganismos tenham sido destruídos no processo de esterilização. A leitura final é feita após 24 a 48 horas de incubação dos indicadores. A recomendação do Ministério da Saúde e da Vigilância Sanitária é o uso semanal dos indicadores biológicos.

• Irradiação

Os efeitos das radiações dependem da sua duração, do comprimento de onda, da intensidade e da distância da fonte. Existem, atualmente,

pelo menos dois tipos utilizáveis no controle de microrganismos. As ionizantes (comprimento de onda mais curto e maior energia) e as não ionizantes. Vamos citar as mais conhecidas:

Raios gama

Radiação do tipo ionizante, sem induzir aumento na temperatura, destrói componentes celulares orgânicos, entre eles as ligações do DNA, através da ionização da água e produção de radicais livres (superóxidos), destruindo formas vegetativas e, em doses mais elevadas, esporos.

Apesar de o custo inicial deste tipo de processo ser elevado, a radiação gama constitui hoje o método de eleição para esterilizar grandes lotes de itens de pequeno volume, como agulhas, seringas, luvas e cateteres. Eventualmente, também pode ser usada para vacinas e na prevenção da deteriorização de alimentos.

Raios UV

Apesar do baixo poder de penetração, a radiação ultravioleta é empregada com sucesso no ambiente hospitalar e no laboratório (lâmpada germicida), funcionando como esterilizante de superfície após limpeza com desinfetante. Usada também para controle de microrganismos do ar, é frequentemente encontrada em centros cirúrgicos e capelas de fluxo laminar. Não é utilizada em larga escala, pois pode causar danos à pele e córnea.

• Filtração

Como outro processo considerado de esterilização, podemos citar a filtração através de substâncias capazes de reter os microrganismos. Antigamente, eram usadas velas e filtros de amianto do tipo 'seitz'. Atualmente, são mais utilizadas as membranas de nitrocelulose de pequena porosidade (0,2µm), embora de forma efetiva estas funcionem muito bem, pois consideram também

a atração eletrostática das partículas e não agem realmente como esterilizantes, já que podem eventualmente permitir a passagem de vírus e alguns gêneros bacterianos de menor diâmetro.

- **Óxido de etileno**

Amplo uso como esterilizante de instrumentos. Tem ação esporicida mais rápida que o formaldeído gás. A esterilização por óxido de etileno é um método específico devido a sua complexidade, tanto relativa ao seu alto custo quanto ao longo tempo requerido.

1.4. Medicamentos para controle bacteriano (ver capítulo sobre Bacteriologia no volume III)

- **Quimioterápicos**

Produzidos por síntese química em laboratório, ao invés de serem produzidos por um microrganismo.

Qualidades ideais de um agente quimioterápico:

- Ser capaz de destruir ou inibir muitas espécies de microrganismos patogênicos. Quanto maior o número de diferentes espécies afetadas, melhor o agente.
- Inibir os microrganismos de tal maneira que se evite o desenvolvimento de formas resistentes produtoras de doenças.
- Não produzir efeitos colaterais indesejáveis no paciente.
- Não eliminar microrganismos que normalmente habitam o trato intestinal ou outras áreas do organismo (flora normal).
- Ser altamente solúvel nos fluidos corporais.
- Não pode ser inativado pelo ácido estomacal, deve ser absorvido pelo trato intestinal.

- **Antibióticos ou agentes antimicrobianos**

São substâncias obtidas a partir de microrganismos (principalmente fungos) que são utilizadas no tratamento de doenças, sobretudo de origem bacteriana. A escolha do antibiótico no tratamento de uma infecção depende do microrganismo obtido a partir da cultura em laboratórios de análises clínicas e da sua sensibilidade verificada no antibiograma (ver capítulo sobre Bacteriologia), pela gravidade da doença, da toxicidade e dos antecedentes de alergia do paciente. Em infecções graves, pode ser necessário combinar vários antibióticos. A via de administração pode ser oral (cápsulas, comprimidos), tópica (colírios, pomada) ou injetável (intramuscular, intravenosa). Nas infecções graves, deve-se utilizar a via intravenosa.

Para proceder adequadamente a qualidade dos testes e o controle dos microrganismos, lançamos mão de processos de esterilização, que podem ser físicos ou químicos, como veremos a seguir.

2. Tratamento de água

Sistemas de tratamento de água

A água que bebemos é denominada potável e, por definição, pode ser consumida por pessoas sem riscos de adquirirem doenças por contaminação da mesma. Ela pode ser oferecida à população das cidades ou de áreas rurais e vai ou não precisar de tratamento prévio dependendo da origem do manancial. O tratamento de água tem como objetivo reduzir a concentração de poluentes até o ponto em que não apresentem riscos para a saúde pública. O grau e o tipo de tratamento vão variar de acordo com as normas de cada país e, principalmente, com a qualidade da água de abastecimento. No Brasil, na maioria das cidades, existe a necessidade de filtros domésticos. Entretanto, o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) alerta para alguns cuidados a serem tomados em relação a este sistema de filtração (www.inmetro.gov.br – acesso em 24 out. 2008):

- Não se deixe levar pelo título, filtro ou purificador; os ensaios mostraram que estes não têm diferença.
- Não se impressione com promessas de água pura ou cristalina, pois isso não significa que o filtro combata bactérias ou elimine possíveis riscos à saúde.
- Em caso de dúvida quanto à procedência da água, não confie somente no filtro. Nestes casos, ferva a água por, pelo menos, 15 minutos.
- Para os consumidores que se utilizam de fonte de água *in natura*, é muito importante que a qualidade da água seja verificada periodicamente através de ensaios microbiológicos e que a água seja fervida após a filtração.
- É de fundamental importância manter a caixa d'água limpa, pois a falta de higiene nesta pode ser um foco de contaminação da água.

Segundo o Inmetro, a qualidade dos filtros domésticos existentes no mercado nacional é preocupante, particularmente no que diz respeito às informações quanto à utilização e finalidade e quanto ao desempenho na eliminação de bactérias. A inexistência de normas e regulamentos contribui para atual situação, cabendo ao Inmetro induzir a criação de uma norma brasileira para este produto.

Entretanto, a água que utilizamos em laboratório tem um nível de exigência química e biológica muito maior, mas, assim como nas vidrarias de laboratório, não podemos generalizar as especificações da qualidade exigida para os diversos laboratórios, sendo assim, os laboratórios de química, de um modo geral, necessitam de água deionizada, isto é, livre de íons, enquanto os de produção de diluentes, vacinas, medicamentos e os de bacteriologia usam sistemas de ultrafiltração ou destilação que removem colóides, bactérias e pirogênicos. Dessa forma, iremos descrever um sistema de tratamento de água, ressaltando que não existe o sistema ideal para todos os laboratórios e a

escolha deve ser feita tendo em vista a finalidade, a origem do manancial, os recursos financeiros disponíveis e o consumo de água. Na hora de se projetar um sistema de tratamento de água, deve-se entrar em contato com as empresas fabricantes dos equipamentos para se verificar o consumo de água, consumo elétrico e gasto de material de consumo.

2.1. Água de alimentação

A origem da água é muito importante para se obter uma água purificada de qualidade WFI (*water for injection*). Independentemente se a água vem de um poço artesiano ou do Centro Municipal de Tratamento de Água, tipo Cedae (no caso do Rio de Janeiro), uma filtração inicial deverá ser realizada. Como o projeto e a operação do sistema de tratamento de água dependem da qualidade da água de abastecimento, é importante conhecer as características e evidenciar as alterações da qualidade da água, com a mudança das estações, já que, dependendo da época do ano, podemos ter na água elementos sólidos provenientes do solo ou de outros locais por onde ela passou, como ocorre nas enchentes, modificando as características desta água (dureza, salinidade, pH etc.).

A água de alimentação deve ser monitorada a cada seis meses para se ter certeza de que as características químicas estão mantidas. No caso de se ter uma água muito ionizada, monta-se, então, um Sistema *Softened* (como explicado a seguir), para se retirar a grande maioria dos íons e remover as substâncias insolúveis em suspensão. Caso haja muita matéria orgânica, faz-se necessária a colocação de filtros de areia e carvão ativado. A qualidade da água de origem vai indicar os próximos passos do sistema de tratamento, nesse caso, tubulações antigas de ferro que levam a água para as cisternas e caixas d'água obrigam a colocar na linha, também, um Sistema *Softened*.

2.2. Sistema *Softened* (água sem ferro)

A retirada de ferro da água é realizada por filtração num leito composto de mistura de calcita (CaCO_3) e dolomita calcinada – $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$. A filtração é precedida por uma oxidação sob ar comprimido em um cilindro para oxidar sais de Fe^{++} . Cátions de Fe^{++} são eliminados por filtração sob a forma de Fe^{+++} hidratado – $\text{Fe}(\text{OH})_3$. O ar comprimido fornece o ar necessário para a oxidação. A água é então distribuída para os filtros desferrificadores.

Esse tipo de tratamento, normalmente, antecede o sistema de purificação de água utilizado nos laboratórios, ficando, geralmente, situado fora do prédio. Caso a água de abastecimento seja fornecida pelo centro de tratamento municipal, essa primeira etapa será dispensada ou trocada por outra de acordo com a necessidade.

Exemplo de utilização da água:

- Instalações sanitárias (chuveiro);
- Circuitos de refrigeração (água gelada);
- Alimentação do desmineralizador ou do deionizador;
- Água para laboratório de química.

2.3. Água desmineralizada

Na realidade, tanto o desmineralizador quanto o deionizador têm o mesmo objetivo: a retirada de íons da água. Entretanto, convencionou-se que o equipamento de desmineralização possui duas colunas separadas, cada uma contendo uma resina diferente (aniônica e catiônica), e no deionizador as duas resinas estão juntas na mesma coluna, isto é, coluna de leito misto. A resina catiônica contém íons disponíveis capazes de remover cátions (Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , etc.). A circulação da água do topo para o fundo do leito de resina e a regeneração são realizadas da mesma maneira com ácido clorídrico (HCl) servindo também como agente sanitizante.

A resina aniônica retira os ânions da água (Cl^- , SO_4^{2-}). A água decationizada passa para a forma hidroxílica. A regeneração é feita da mesma maneira 'contra-corrente' com solução alcalina forte (hidróxido de sódio – NaOH), a qual funciona também como agente sanitizante. A água desmineralizada é distribuída para os laboratórios ou então vai alimentar o deionizador. Apesar de teoricamente a água desmineralizada apresentar uma qualidade química um pouco inferior que a água deionizada, não existe a necessidade de ter os dois sistemas em linha (desmineralizador → deionizador). Muitos laboratórios que possuem recurso financeiro fazem a opção de ter o desmineralizador abastecendo o deionizador, com o objetivo de proteger o segundo equipamento e com isso aumentar o intervalo entre as regenerações e diminuir o gasto de produtos e resinas.

- **Regeneração das resinas:**

O local de entrada do ácido e da base para a regeneração das resinas não deve ficar dentro da sala, e sim do lado de fora. Pode ser comprado na concentração de 30% em tanques adaptáveis à tubulação. Na maioria dos desmineralizadores, todo processo é automático.

A regeneração é baseada no volume de água que passa por aquela resina, a não ser que a condutividade vá além do limite aceitável ($5\mu\text{S}$). O número de regenerações em um ano pode variar de dez a vinte. Isto vai depender da produção anual daquele laboratório e da qualidade da água de alimentação. Conforme for diminuindo o tempo de intervalo entre uma regeneração e outra, é sinal de que a resina está perdendo sua capacidade regeneradora. O controle nesse caso, para ver se é necessário ou não fazer uma nova regeneração, é a condutividade da água. E à medida que se vai aumentando o número de regenerações, a tendência da quantidade de resina é diminuir. Uma preocupação importante nos procedimentos de regeneração das colunas é quanto à biossegurança. Equipamentos de proteção individual e

coletiva devem ser rigorosamente utilizados, uma vez que qualquer acidente pode colocar o operador em risco de ter queimaduras provocadas por ácido e soda ou até mesmo problemas graves de saúde por inalação de vapores. Um reservatório contendo resina sintética com alto poder de absorção, caso haja derramamento de ácido e base no momento do processo de regeneração, deve estar disponível no laboratório em local estratégico. Todas as conexões utilizadas na instalação do equipamento devem ser de aço inox para resistir à ação oxidante dessas substâncias.

Exemplo de utilização da água:

- Produção de vapor (tubulação PVC);
- Água (quente e fria) para lavagem de equipamentos;
- Alimentação do deionizador;
- Água para laboratórios de química.

2.4. Água deionizada

O tratamento de água deionizada é uma unidade composta de duas colunas de leito misto, trabalhando em série, chamada de 'Triobed'. Cada Triobed é composta de uma resina ácido forte, uma resina básica forte e uma resina neutra (que fica localizada no meio e é a mistura das duas resinas).

A unidade Triobed trabalha no sistema clássico de leito misto. As resinas são classificadas ou separadas pela diferença de densidade das partículas depois de enxágue da coluna com água desmineralizada por dez minutos, em 'contra-corrente'. A resina neutra é uma camada com cerca de 12 a 25 cm de altura entre as outras duas.

A resina ácida (camada de baixo) é regenerada em 'contra-corrente' e a resina básica (camada de cima) em 'cocoorrente'. Depois de cada ciclo de regeneração, é feito o enxágue com água desmineralizada. Duas bombas coletoras de água deionizada distribuem água para o sistema.

- **Regeneração das resinas:**

Mover toda a resina para o topo da coluna e passar HCl a 30%. Retirar o ácido, com água desmineralizada, levando para um tanque de neutralização, localizado ao lado de fora do prédio. Esta água ácida só será despejada para o esgoto quando estiver neutralizada com uma solução alcalina. Proceder da mesma maneira com a resina básica, só que usando NaOH a 30%. Usa-se também o tanque de neutralização, colocando-se uma solução ácida. Deve-se lavar as resinas com água desmineralizada, até o condutímetro, localizado no final da coluna marcar em torno de 1 mS.

Exemplos de utilização da água:

- Produção de vapor (tubulação em aço inox);
- Água de lavagem de tanques;
- Laboratórios de química e outros que precisem de água deionizada;
- Alimentação das unidades de ultrafiltração e destilação.

2.5. Água bidestilada (WFI)

A água de alimentação é pré-aquecida num trocador de calor, por condensação de vapor vindo da última coluna e dos pré-aquecedores pelo condensado produzido em cada efeito. A água de alimentação evapora parcialmente na primeira coluna aquecida por vapor industrial. O condensado de vapor passa através do trocador e descarrega. O vapor puro produzido do topo segue para o próximo efeito, onde o processo é repetido. A água destilada produzida por condensação de vapor puro vai para o trocador. O processo é repetido por todas as colunas da mesma maneira. O vapor produzido no último efeito é condensado e resfriado. A água bidestilada não deve ser armazenada. Se isto precisar acontecer, deve ser feito um sistema de 'looping' a 85°C.

Exemplos de utilização da água:

- Água para o preparo de vacinas;
- Água para o preparo de diluentes e soluções (WFI);
- Água final (enxágue) de lavagem de vidrarias, frascos e rolhas;
- Laboratórios em geral, principalmente os que precisam de água com qualidade microbiológica muito boa.

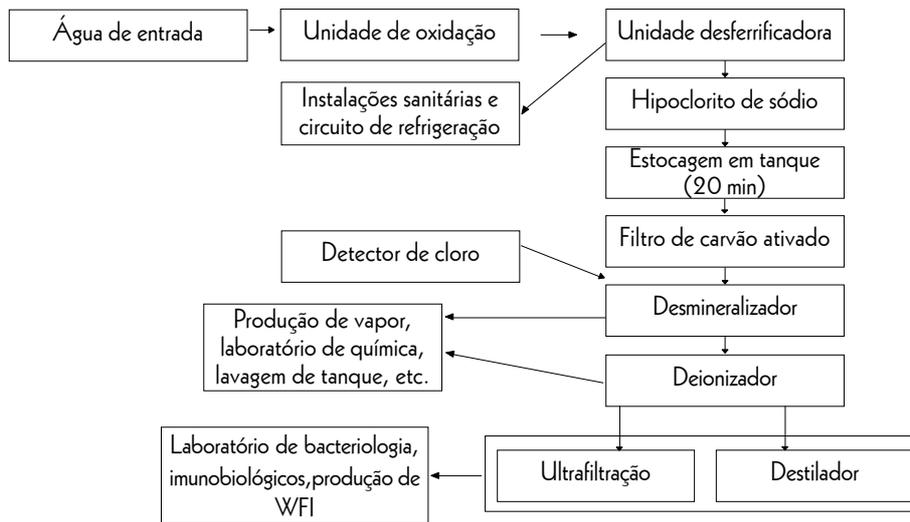
2.6. Água ultrafiltrada (WFI):

Existem no mercado vários modelos de ultrafiltradores que produzem água purificada do tipo WFI. Os cartuchos de ultrafiltração são hidrófilos e o fluxo inicial é necessário cada vez que novos cartuchos são usados. Deixe sempre o sistema funcionar por quatro horas (para drenar) antes de usar a água. Ajuste o ejetor e a passagem das válvulas para obter uma pressão compatível com a pressão transmembrana. A maioria dos equipamentos desta natureza possui *timer* programável. A água ultrafiltrada não deve ser armazenada. Se isto precisar acontecer, deve ser feito um sistema de 'looping' a 85°C.

Exemplos de utilização da água:

- Água para o preparo de vacinas e de diluentes e soluções (WFI);
- Água final (enxágue) de lavagem de vidrarias, frascos e rolhas;
- Laboratórios em geral, principalmente os que precisam de água com qualidade microbiológica muito boa.

Esquema de tratamento de água



3. Equipamentos

3.1. Autoclave

É um equipamento de laboratório utilizado para esterilizar objetos através de calor úmido (vapor) combinado com pressão. Dessa forma, a esterilização a vapor é realizada em autoclaves, cujo processo possui fases de penetração do vapor, remoção do ar e secagem. A utilizar a autoclave, é importante assegurar que o vapor deslocou todo o ar antes que a pressão se eleve. Nesse sentido, o vapor saturado, isento de ar, na pressão de 1 atmosfera, tem uma temperatura de 121°C.



Existem vários modelos de autoclaves, mas, quanto à fundamentação da técnica de autoclavagem, podemos dividi-las em dois grandes grupos:

- **Gravitacional:** o ar é removido pelo vapor que é injetado forçando sua saída ou através de uma bomba. A fase de secagem é limitada, uma vez que não possui capacidade para completa remoção do vapor.
- **Alto vácuo:** introduz vapor na câmara interna sob alta pressão com ambiente em vácuo. A fase de secagem é melhor do que a gravitacional devido à alta capacidade de sucção do ar realizada pela bomba de vácuo.

Os ciclos de esterilização são orientados de acordo com as especificações do fabricante, com o tipo e a quantidade de material a ser esterilizado. Para se ter uma boa esterilização, é preciso dispor o material de forma a permitir a passagem de vapor por toda a câmara de forma homogênea. Os materiais devem ser montados utilizando papel cristal, *kraft* ou plástico especial para autoclavação lacrados com fita para autoclave que serve também como indicador de que o vapor atingiu aquela superfície.

As autoclaves devem ser calibradas e validadas de seis em seis meses pela Garantia da Qualidade e deve ser feita manutenção preventiva anualmente.

3.2. Microscópio

Os estudos morfológicos da célula normalmente começam com o emprego do microscópio ótico, mais comumente denominado de microscópio de luz (por utilizar a luz como fonte de formação de imagens) ou microscópio composto (por ser constituído por dois sistemas de lentes sobrepostas: a objetiva e a ocular). Este instrumento pode ser considerado como a ferramenta básica em laboratórios da área da saúde, dessa forma dedicamos o capítulo 3 desta coleção com detalhamentos da técnica de microscopia de luz.



A observação da célula ao microscópio ótico é feita por luz transmitida, que exige que o objeto a ser estudado atenda a alguns critérios:

- Ser suficientemente fino, para que a luz possa atravessá-lo → o objeto deve ter uma espessura na ordem de $5\mu\text{m}$, tornando-se necessário fazer esfregaços finos ou, em alguns casos, realizar cortes histológicos para atingir a espessura desejada (Ver detalhes no capítulo de Técnicas Histológicas e Citológicas – capítulo 11 e 12 do volume 2 desta coleção).
- Apresentar contrastes, diferenciando as regiões celulares. Como os constituintes celulares têm pouco contraste, é necessário utilizar colorações artificiais. Os corantes são substâncias que absorvem certos comprimentos de onda da luz visível e têm afinidade por determinados constituintes celulares.

○ microscópio de luz é composto fundamentalmente das seguintes partes:

Partes mecânicas

- Pé – base do aparelho, suporta todas as outras partes.
- Braço – preso ao pé, rígido ou articulado, suporta o canhão, a platina, o condensador e o espelho ou fonte luminosa.
- Canhão – é o tubo onde se dispõem as partes óticas de ampliação. Pode ser fixo ao braço ou possuir movimento vertical.
- Revólver – é uma peça giratória onde se conectam as objetivas e que permite a instantânea mudança das mesmas.
- Platina – é a mesa de trabalho, onde se coloca a preparação para exame. Possui uma abertura central que dá passagem à luz proveniente da fonte. Pode ser fixa ao braço ou possuir movimento vertical.
- *Chariot* – é um dispositivo preso à platina, dotado de movimento antero-posterior e lateral, destinado a movimentar a preparação.

- Parafuso macrométrico – é um dispositivo destinado a dar grandes e rápidos deslocamentos verticais ao canhão ou à platina. Serve para focalização grosseira.
- Parafuso micrométrico – é um dispositivo destinado a dar pequenos e lentos deslocamentos ao canhão ou à platina. Serve para focalização fina.

Microscópio óptico:

- Ocular;
- Revólver;
- Objetiva;
- Parafuso macrométrico;
- Parafuso micrométrico;
- Platina;
- Espelho;
- Condensador.

Quanto ao sistema de iluminação, ele pode ser provido de: espelho ou fonte de luz direta, que deve estar preso à parte inferior do braço, refletindo ou projetando a luz para a parte inferior do condensador; diafragma ou íris, que, colocado sob o condensador, destina-se a restringir o diâmetro de feixe luminoso; condensador, que é um sistema ótico de refração, preso à parte inferior do braço sob a platina, podendo ou não possuir movimento vertical (e lateral para centralização), destinado a fazer convergir sobre a preparação a luz proveniente da fonte (consultar cap 3 de Microscopai de Luz).

O sistema de ampliação é formado pelas objetivas e oculares. A qualidade da visualização da imagem será proporcionada pelo poder de

resolução, que pode ser definido como a capacidade que este sistema possui de formar imagens distintas e nítidas de dois pontos situados muito próximos em uma preparação.

Objetivas de imersão (abertura numérica de uma objetiva)

Para se aproveitar uma maior quantidade de luz quando a objetiva é de grande aumento, trabalha-se com a objetiva imersa em um líquido de alta refração, em geral óleo de cedro (índice de refração de 1,575). Com o emprego desse óleo, pode-se fazer convergir o feixe luminoso proveniente do condensador, captando-se aqueles raios luminosos que, com objetivas secas, seriam perdidos. Estas objetivas são denominadas objetivas de imersão. A consequência direta do emprego dessas objetivas é o aumento da luminosidade. No caso de uma objetiva seca, não existe óleo, e o índice de refração é igual ao do ar, que é 1.

Manejo do microscópio óptico

- Colocar na objetiva de menor aumento e baixar a platina completamente. Se o microscópio foi usado corretamente antes, ele já deve estar nestas condições.
- Colocar a lâmina com a preparação sobre a platina e prendê-la com as pinças metálicas.
- Começar a observação com a menor objetiva (colocar na de 10x para observação de bactérias).
- Para obtenção do foco:
 - a) Aproximar ao máximo a lente da objetiva da lâmina, através do parafuso macrométrico. Este procedimento deverá ser realizado observando-se diretamente o local e não através da ocular, para que não haja o risco de incrustar na objetiva a preparação ou mesmo de quebrar a lâmina.

- b) Observar, através das oculares, a amostra e, através do parafuso macrométrico, ir separando lentamente a objetiva da preparação. Quando se observa a nitidez da amostra, gira-se o micrométrico para obter o foco fino.
- Ao mudar para a objetiva de 40x, deve-se redobrar a atenção, pois a partir desta o foco fica muito próximo da lâmina, sendo comum a ocorrência de danos.
 - Utilizando a objetiva de imersão:
 - a) Abaixar totalmente a platina.
 - b) Subir totalmente o condensador para visualizar claramente o círculo de luz que nos indica a zona onde devemos pingar o óleo de imersão.
 - c) Girar o revólver até a objetiva de imersão deixando-a na metade do caminho entre ela e a objetiva de 40x.
 - d) Colocar uma gota mínima de óleo de imersão sobre o círculo de luz.
 - e) Terminar de girar suavemente o revólver até a posição da objetiva de imersão
 - f) Olhando diretamente pela objetiva, levantar a platina lentamente até que a lente toque a gota de óleo. Nesse momento, a gota de óleo se levanta e se une à lente.
 - g) Focar cuidadosamente com o micrométrico. A distância de trabalho entre a objetiva de imersão e a preparação é mínima, menor do que com a de 40x. Deve-se então ter muito cuidado para não ocorrer qualquer problema durante a visualização.
 - h) Uma vez que se colocou o óleo de imersão sobre a preparação, não se pode voltar a utilizar a objetiva de 40x, pois esta objetiva se mancharia de óleo. Portanto, se desejar focar nova-

mente a mesma lâmina, utilize outro campo. Neste caso, deve-se abaixar a platina e repetir a operação a partir do passo três.

i) Uma vez finalizada a observação da preparação, se abaixa a platina e se coloca na objetiva de menor aumento girando o revólver. Neste momento, já se pode retirar a lâmina da platina. Nunca se deve retirar a amostra com a objetiva de imersão em posição de observação.

j) Limpar a objetiva de imersão com cuidado empregando um papel especial para microscopia. Verificar também se a objetiva de 40x está perfeitamente limpa.

Manutenção preventiva

- Ao finalizar o trabalho, deve-se deixar o microscópio na objetiva de menor aumento em posição de observação.
- Quando não se está utilizando o microscópio, deve-se mantê-lo coberto com capa, preferencialmente de tecido, para evitar que se suje e as lentes fiquem danificadas. Se não se utiliza o aparelho com frequência, deve-se guardá-lo em sua caixa dentro de um armário para protegê-lo do pó.
- Nunca se deve tocar as lentes com as mãos. Se elas se sujarem, devem ser limpas suavemente com papel de filtro ou papel para lentes.
- Não se deve deixar lâminas sobre a platina quando não se está utilizando o microscópio.
- Depois de utilizar a objetiva de imersão, deve-se limpar o óleo com lenços de papel especiais para ótica ou papel de filtro (menos recomendável). Em qualquer caso, deve-se passar o papel na lente em somente um sentido com suavidade. Se o óleo chegar a

secar na objetiva, deve-se limpá-la com uma mistura de álcool-éter (9:1). Não se deve abusar deste tipo de limpeza, porque o uso em excesso destes solventes poderá danificar as lentes. Nunca forçar os botões (parafusos) giratórios do microscópio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver e condensador).

- A mudança das objetivas deverá ser realizada girando o revólver e visualizando diretamente sobre a preparação para prevenir o contato da lente com a amostra. Nunca mudar de objetiva segurando pelo tubo, nem fazê-lo observando através da ocular.

3.3. Banho-maria

O banho-maria é um equipamento utilizado em laboratórios, que permite aquecer substâncias de forma indireta (por imersão), ou seja, que não podem ser expostas a fogo direto. Também pode ser utilizado para descongelamento ou incubação de produtos biológicos.



Condições gerais:

A limpeza do equipamento deve ser feita com água potável e sabão neutro (Extran a 10%). Enxaguar bem e enxugar somente com gaze por fora. Não utilize solventes, tais como benzina, *thiner* e álcool.

Manejo:

- a) Verificar a instalação e se a voltagem da tomada é compatível com a do equipamento.
- b) Verificar o nível de água, observando que o volume ideal corresponde à metade do volume total.
- c) Verificar o tipo de água utilizada que deverá ser filtrada.

- d) Depois de ligado o equipamento, a água leva, em média, 15 minutos para aquecer.
- e) O tempo de uso vai variar de acordo com o material utilizado.
- f) Verificar sempre o nível da água, já que esta evapora e, por isso, deverá ser reposta.
- g) Com o fim do procedimento, retirar a tampa e, em alguns modelos, a capa de revestimento interno, para propiciar o despejo da água diretamente na pia.
- h) Após verificar se o equipamento está seco, recolocar a capa de revestimento e a tampa para que o equipamento fique pronto para novo uso.

3.4. Balança eletrônica de precisão

A balança eletrônica de precisão é utilizada para se pesar diferentes substâncias no laboratório de saúde.

Condições gerais:

Observar se a balança está instalada em local livre de altas temperaturas e da ação direta de correntes de ar muito fortes, tais como ventiladores. A balança deve estar instalada em local de fácil visibilidade para o operador e onde não haja vibração. Devem ser ajustados os pés reguláveis da mesma de modo que ela fique bem apoiada e nivelada (verifique a indicação do nível).

Deve-se fechar a 'porta' da balança sempre que se colocar um produto. Procure colocar o produto sobre o prato da balança com suavidade, lembrando-se sempre que se trata de um equipamento sensível. Para limpeza, utilize um pano úmido com água e sabão neutro. Não utilize solventes, tais como



benzina, *thiner* e álcool. Ao transportar o equipamento de um local para outro, sempre trave a balança e procure manuseá-la com cuidado, tomando todas as precauções para reinstalação.

Manejo:

- a) Verificar a instalação e se a voltagem da tomada é compatível com a do equipamento.
- b) A balança não deve ser desligada, permanecendo em *stand-by*.
- c) Aguarde até que haja marcação no visor.
- d) Aparte o botão relativo à calibração para iniciar a mesma.
- e) Calibre de acordo com o manual do fabricante.
- f) Quando a calibração estiver completa, aparecerá no visor vários zeros.
- g) Inicie então a pesagem.
- h) Coloque o recipiente a ser descontado sobre o prato da balança, que imediatamente mostrará seu peso no visor.
- i) Tecla 'tara' para zerar a balança.
- j) Coloque o produto a ser pesado no recipiente 'tarado', sem retirá-lo de cima do prato, e proceda a operação normal de pesagem.
- k) Caso queira eliminar a memorização da tara para obtenção do peso bruto, retire o recipiente com o produto da balança e, em alguns segundos, os visores retornarão à condição inicial ou aperte a tecla 'tara' com a balança vazia, para que o cancelamento desta função seja imediato.
- l) Após o uso, utilizar um pincel fino para retirar todos os resíduos provenientes da pesagem.
- m) Fechar o gabinete da balança e mantê-la em *stand-by*.

- n) Realizar a manutenção preventiva anualmente ou semestralmente de acordo com o fluxo de utilização.

3.5. Centrífuga

É um equipamento que acelera o processo de sedimentação devido ao movimento centrífugo de rotação acelerado, no qual as partículas de maior densidade são arremessadas para o fundo do tubo.

Condições gerais:

Observe se a centrífuga está instalada em local livre de altas temperaturas. Os pés reguláveis devem ser ajustados da mesma de modo que ela fique bem apoiada e nivelada (verifique a indicação do nível). Certifique-se das boas condições da instalação elétrica. Para limpeza, utilize um pano úmido com água e sabão neutro. Não utilize solventes, tais como benzina, *thiner* e álcool. Caso a mesma seja refrigerada, deve-se ligá-la com antecedência para que a temperatura esteja adequada antes da sua utilização.



Manejo:

- a) Verificar a instalação e se a voltagem da tomada é compatível com a do equipamento.
- b) Os tubos que irão para a centrífuga devem conter a mesma quantidade de material e devem ter o mesmo peso.
- c) Colocar os tubos, equilibrando no sentido transverso.
- d) Depois dos tubos equilibrados, deve-se fechar a centrífuga.
- e) Ligar a chave geral e ajustar o tempo e a velocidade de acordo com

o que a técnica pedir.

- f) Após o término do tempo marcado, o equipamento desliga automaticamente.
- g) Esperar parar totalmente e abrir a tampa, retirando os tubos.
- h) Realizar a manutenção preventiva anualmente ou semestralmente de acordo com o fluxo de utilização.

3.6. Capela e Câmaras de segurança

Há muitos tipos de capelas e de câmaras, cada uma com seu próprio projeto e funcionalidade. Para identificar quais tipos você necessita ou estão presentes em seu laboratório ou saber exatamente qual tipo está presente em seu laboratório, apresentamos abaixo uma lista de definições, descrições e características técnicas, suas vantagens e desvantagens.



Capelas para Química geral & orgânica

Uma capela de exaustão é um gabinete com ventilação forçada, localizado em um ambiente laboratorial cujo *layout* deve estar corretamente projetado, de modo a proteger o operador mas não danificar o meio ambiente, utilizando um sistema de filtração que leve para fora do edifício os efluentes indesejáveis provocados por procedimentos efetuados no interior da capela.

Estes gabinetes podem ser construídos de alvenaria ou com materiais adequados para cada caso. É obrigatório que as capelas possuam uma

janela envidraçada que abra verticalmente e permaneça aberta em qualquer posição (altura), uma vez que está balanceada por um sistema de contrapesos. Em alguns casos, dispõe de um sistema defletor para direcionamento do fluxo de ar interno.

O termo 'capela de exaustão' é o mais difundido, mas outros termos também são utilizados, como capelas químicas, gabinetes, etc. As capelas de exaustão são, na realidade, um equipamento de proteção coletiva (EPC) do trabalhador em laboratório, sendo disponíveis no mercado em muitas formas, tamanhos, materiais e diferentes revestimentos, e devem ser configurados para acomodar uma grande variedade de procedimentos químicos. Entretanto, esta flexibilidade pode oferecer equipamentos que resultem em diferentes desempenhos e níveis de proteção ao operador (Para mais detalhes, veja o capítulo 1 de Biossegurança).

Câmaras ou Cabines de segurança biológica e fluxos laminares

As câmaras ou cabines de segurança biológicas (CSB) e os fluxos laminares são usados para a manipulação de agentes biológicos, produção de diluentes e imunobiológicos, meios de cultura e diversos materiais que precisam ser processados em ambiente estéril. Além disso, algumas capelas de fluxo laminar não apenas protegem o operador da exposição de produtos biológicos como também precisam garantir a segurança do produto e do ambiente. Dessa forma, existem diferentes modelos de cabines, mas todos possuem filtros absolutos ou filtros Hepa, que possuem alta eficiência (no mínimo, 99,97% na coleta de partículas de até 0,3 micros) e devem ser substituídos periodicamente de acordo com sua saturação.

Os fluxos podem ser encontrados em dois modelos, chamados de "bancada limpa" que não são de câmaras de biossegurança, pois ou liberam ar filtrado (HEPA) para a superfície de trabalho ou para o operador:

- **Fluxo vertical** – Protege, principalmente, o operador das substâncias que está manuseando.

- **Fluxo horizontal** – Protege, principalmente, o produto que está sendo processado. Somente poderão ser envasados ou manipulados materiais que não tragam riscos de contaminação ao operador.

As cabines de segurança biológica podem ser divididas em 3 classes, sendo a classe II com várias subdivisões:

- **Classe I** – Fornece segurança pessoal e ambiental, mas não do produto, funcionando como uma coifa provida de filtro HEPA para proteção ambiental. Sua utilidade no laboratório é muito limitada, é geralmente usada para acondicionar equipamentos que podem gerar aerossóis, como centrífugas.
- **Classe II** – Pode ser subdividida em vários tipos (A, B1, B2 e B3). Fornece proteção pessoal ambiental e do produto. O ar é captado pela grelha frontal protegendo o operador e passando por filtros HEPA, diminuindo a contaminação na superfície de trabalho interna. Na do tipo A, o ar filtrado é recirculado ao laboratório, sendo a mais comum nos laboratórios brasileiros devido ao fator custo/benefício. Dentre as câmaras do tipo B e B1, é a mais simples, funcionando como a do tipo A, porém com exaustão externa. Na do tipo B2, não há nenhuma recirculação de ar dentro da câmara, o ar que entra é filtrado, com retenção biológica e química e filtrado antes de ser eliminado para o exterior. Na B3, a mais cara desta categoria, o cuidado para não haver nenhum tipo de vazamento de resíduo químico ou biológico é maior, protegendo mais o ambiente.
- **Classe III** – Fornece proteção máxima ao ambiente e ao operador. Foi construída para atividades com nível 4 de biossegurança, é hermeticamente fechada com visor fixo, e tem luvas de borracha resistentes e acopladas. Seu acesso é feito por caixa de porta dupla que poderá ser descontaminada após a operação, além de os filtros possuírem um incinerador de ar.

Condições gerais:

Verificar a voltagem da tomada da capela (110 ou 220 volts).
Passar desinfetante não corrosivo antes e depois da operação se a categoria do equipamento permitir.

Manejo:

- a) Ligar a ventilação e a lâmpada ultravioleta por dez a quinze minutos. Durante esse tempo, não se deve aproximar da capela.
- b) Após esse tempo, desligar a lâmpada ultravioleta e ligar a luz fria.
- c) Se houver mostrador, verificar se a pressão da ventilação está ideal.
- d) Utilizar luvas durante a manipulação do material biológico, tomando cuidado para não fazer movimento muito brusco para não contaminar o material.
- e) Durante a manipulação do material, somente as mãos do operador poderão estar no interior do equipamento.
- f) Terminado o procedimento, desinfetar a bancada e desligar a luz fria e a ventilação.
- g) Se o equipamento apresentar algum problema no seu funcionamento, como falta de luz, por exemplo, os fusíveis ou as lâmpadas deverão ser trocadas antes de chamar a manutenção.
- h) Uma vez por ano, deve-se agendar com o técnico para que seja feita a manutenção preventiva.

3.7. Forno/estufa

Esse equipamento é muito utilizado em laboratórios de saúde, mas possui duas possibilidades de uso. A primeira se refere à esterilização de materiais e geralmente isso é feito na temperatura de 180°C , durante duas horas. Nesse caso, chamamos de 'forno' para secar e esterilizar materiais (forno Pasteur). A segunda tem como finalidade o acondicionamento de meios de cultura proporcionando o crescimento de microrganismos em temperaturas controladas, geralmente utilizando 36°C para bactérias e 25°C para fungos.



Condições gerais:

Tanto o forno quanto a estufa devem ter câmara externa e interna confeccionadas em aço com isolamento interno e na porta. A porta poderá ser do mesmo material da carcaça ou de vidro especial, que permita a visualização da parte interna. Existem vários modelos com capacidade que vai de vinte a mais de trezentos litros e número variado de prateleiras. Precisam ser providos de termostato de controle, indicador de temperatura (termômetro) e regulador de temperatura.

Manejo:

- a) O equipamento deverá ser mantido na temperatura desejada (controle interno com termômetro de máximo e mínimo).
- b) Não se deve abrir toda hora a porta do forno/estufa e nem deixar a porta aberta.
- c) Não se deve guardar nenhum tipo de alimento nem utilizar o equipamento para aquecê-los.

- d) Todo material guardado no forno/estufa deverá ser etiquetado, inclusive com o nome do responsável.
- e) Deverá ser observado o tempo de incubação dos lotes e dos diferentes microrganismos de acordo com suas necessidades, no momento da retirada dos produtos armazenados.
- f) Deverá ser observado o tempo necessário à esterilização/secagem no caso da utilização como forno.
- g) A cada dois meses, deve-se proceder à limpeza total.

A limpeza deve ser feita da seguinte maneira:

- Desligue o aparelho no botão “on/off” e retire a tomada;
- Abra as portas, deixando-as abertas durante todo o processo;
- Passe um pano para secar;
- Passe um pano com desinfetante hipoclorito de sódio (100 ppm).

4. Vidrarias de laboratório

As vidrarias de laboratório são categorizadas de acordo com o fim a que se destinam. Sendo assim, cada laboratório vai demandar características específicas e muitas vezes com alto grau de exigência, de tal forma que não se poderá generalizar as especificações, as lavagens e os tratamentos para todas as vidrarias. Por exemplo, um laboratório de química necessitará de vidrarias volumétricas aferidas enquanto um laboratório de bacteriologia terá como primeira exigência vidrarias estéreis. Se utilizarmos as vidrarias de um laboratório de química para atendermos as necessidades dos microbiologistas, isto é, esterilizarmos tal material em forno ou autoclave, deixaremos os técnicos de química na mão, pois, na primeira esterilização, toda vidraria perderá a aferição e as vidrarias volumétricas construídas para se ter precisão não poderão mais ser utilizadas para este fim – com a dilatação do vidro submetido ao calor, termina-se por descalibrar totalmente a referida vidraria.

As vidrarias volumétricas são construídas para conter precisamente um dado volume líquido e, com exceção das pipetas, possuem forma de pera, fundo chato e gargalo comprido. Podem ser providas ou não com tampa esmerilhada e normalmente são feitas de vidro resistente e com qualidade química que não altere o produto no seu interior. As vidrarias que têm como objetivo medir volumes líquidos devem ser calibradas para conter ou, então, para livrar os volumes requeridos.

Existem, ainda, utensílios semelhantes aos descritos a seguir, manufaturados em outros materiais como polímeros especiais. Seu uso depende da necessidade do laboratório e, em alguns casos, podem ser descartáveis.

Balão de fundo chato

Utilizado como recipiente para conter líquidos ou soluções, ou mesmo para fazer reações com desprendimento de gases. Pode ser aquecido em banho-maria quando não for necessária sua característica volumétrica precisa.



Balão de fundo redondo



Deverá ser utilizado acoplado a um suporte, uma vez que esse tipo de vidraria não possui estabilidade para ser colocado na bancada sem apoio. Normalmente, é empregado em sistemas de refluxo e evaporação a vácuo, conectado a um roto-evaporador.

Balão volumétrico

O balão volumétrico é um recipiente em forma de pera, de fundo plano e com um gargalo retilíneo, comprido, estreito e com tampa que possui volume definido. É utilizado para o preparo de soluções em laboratório.



Erlenmeyer

Este frasco é ideal para armazenar, aquecer e misturar produtos, podendo ser também utilizado em preparo de meios de cultura. Os modelos graduados são muito usados nos laboratórios de química para a realização de titulações com auxílio da bureta.



Becker



É um tipo de recipiente de uso geral em laboratório, normalmente utilizado para fazer reações entre soluções, dissolver substâncias sólidas, efetuar reações de precipitação e aquecer líquidos. Geralmente graduado, pode ser usado para efetuar medidas imprecisas (normalmente com precisão variante em 5% do marcado). Há dois tipos de *becker*: o de forma baixa e o de forma alta.

Tubo de ensaio

Tubos de vidro empregados para fazer reações em pequena escala, principalmente em Microbiologia e Hematologia. São utilizados com ou sem tampa, em várias atividades (ex.: centrifugação, triagem, cultura, etc.). Podem ser aquecidos utilizando acessórios apropriados, diretamente sob a chama do bico de Bunsen, em movimentos circulares.



Pipeta graduada



Vidraria constituída por um tubo de vidro graduado utilizado para medir e transferir

volumes. Permite medir volumes variáveis, portanto, não pode ser aquecida. Não é vidraria de escolha para realizar medições precisas em química, uma vez que para tal existem as pipetas volumétricas.

Pipeta volumétrica

Vidraria constituída por um tubo de vidro com um bulbo na parte central. O traço de referência relativo ao volume definido é gravado na parte do tubo acima do bulbo. É usada para medir líquidos com elevada precisão. Não deve ser aquecida.



Bureta



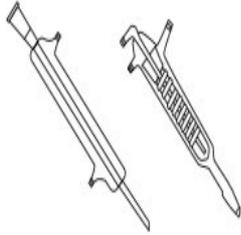
Aparelho utilizado em análises volumétricas, que consiste em um tubo longo com graduações permanentes em linhas bem delineadas a fim de facilitar a leitura. Acompanha torneira de vidro ou teflon que permite o escoamento dos líquidos de forma uniforme. Geralmente, usada em laboratórios de química para práticas de titulações.

Proveta

Instrumento cilíndrico graduado utilizado para medir e transferir volumes variáveis de líquidos em grandes quantidades, se necessário. Pode ser encontrada em diferentes volumes. Não pode ser aquecida.



Condensador



Utilizado na destilação, tem como finalidade condensar vapores gerados pelo aquecimento de líquidos. Os mais comuns são os de Liebig e o de serpentina.

Funil de separação

Utilizado na separação de líquidos não miscíveis e na extração líquido/líquido.



Kitassato



Utilizado em conjunto com o funil de Buchner em filtrações (sob sucção) a vácuo. É constituído de um vidro espesso e um orifício lateral.

Dessecador

Recipiente fechado hermeticamente, contendo um agente desumidificante, usado para guardar substâncias em atmosfera com baixo índice de umidade.



Bastão de vidro

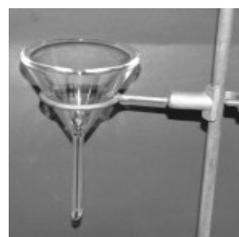


O bastão de vidro é utilizado para agitar substâncias, facilitando a

homogeneização. Auxilia também na transferência de um líquido de um recipiente para outro.

Funil analítico

Usado na filtração e para retenção de partículas sólidas, podendo ser colocado papel de filtro no seu interior. Não deve ser aquecido. Pode ser de vidro borosilicato ou de vidro alcalino. Possui diferentes tamanhos que vão definir sua capacidade volumétrica (ex.: 15 ml, 30 ml, 60 ml, 125 ml, 500 ml, 1.000 ml).



Funil de Buchner



Instrumento de porcelana utilizado em filtrações a vácuo. Pode ser usado com a função de filtro em conjunto com o kitassato.

Vidro de relógio

Peça de vidro de forma côncava usada para separar pequenas quantidades de substâncias, evaporar pequenas quantidades de soluções, cobrir béqueres e outros recipientes, além de auxiliar na pesagem de substâncias não voláteis e não higroscópicas. Por ser frágil ao calor direto, não pode ser aquecido.



Gral e pistilo



O gral também é chamado de almofariz. Usado na trituração e pulverização de sólidos em pequena escala. Pode ser de diferentes materiais (porcelana, ágata ou polietileno) e diversos tamanhos (100 ml, 180 ml, 305 ml, 610 ml e 1.160 ml).

Cadinho

Peça geralmente de porcelana, mas que também pode ser de ferro, chumbo ou platina, cuja utilidade é aquecer substâncias a seco e com grande intensidade de calor, por isto pode ser levado diretamente ao bico de Bunsen.



Cápsula de porcelana



Peça de porcelana que apresenta paredes finas que não resistem ao atrito, usada para evaporar líquidos das soluções e na secagem de substâncias em estufas. Pode ser empregada, também, para a fusão de materiais sólidos e ceras, não devendo ser utilizada na preparação de fórmulas farmacêuticas, pois podem liberar íons.

4.1. Outros equipamentos

Anel ou argola

Acessório usado para fixar alguns tipos de funil no suporte para a realização da filtração.

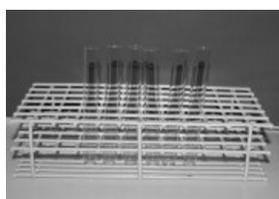


Espátulas e colheres

Instrumentos confeccionados em inox ou polipropileno utilizados para transferir pequenos volumes ou misturar soluções, sendo encontrados no mercado em diferentes tamanhos e formatos.



Estante para tubos de ensaio



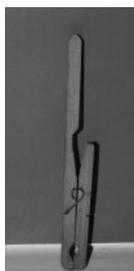
Instrumento confeccionado em madeira ou metal (aço inox, alumínio, etc.), usado como suporte para tubos de ensaio. Possui diferentes diâmetros e alturas para diferentes espessuras e comprimento de tubos. Pode ser levada à estufa e, em alguns casos, à câmara fria.

Garra de condensador

Acessório de metal utilizado para prender o condensador à haste do suporte ou outras peças como balões, erlenmeyers, etc.



Pinça de madeira



Acessório cuja finalidade é prender o tubo de ensaio para que ele seja levado à chama e possa ser manipulado, muitas vezes, fazendo uma pequena agitação durante o aquecimento.

Pinça metálica



Também chamada de tenaz, é um acessório usado para manipular objetos aquecidos, como cadinhos e cápsulas, entre outros.

Pissete ou frasco lavador

Garrafinha plástica com bico acoplado usada para lavagens de materiais através de jatos de água, álcool ou outros solventes. Também serve como recipiente para esses líquidos.



Suporte universal



Acessório feito em ferro utilizado em operações como filtração, suporte para condensador, bureta, sistemas de destilação, etc. Serve também para sustentar peças em geral.

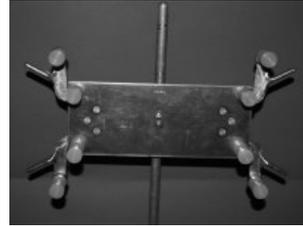
Tripé

Acessório usado para ser colocado sobre a chama, geralmente, do bico de Bunsen, com o objetivo de efetuar aquecimentos de soluções em vidrarias diversas de laboratório.



Garra dupla

Acessório confeccionado em metal utilizado para fixar buretas ao suporte universal, principalmente nas práticas de titulação.



Referências Bibliográficas

- BENNETT, J. W. & CHUNG, H. T. Alexander Fleming and discovery of penicillin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 49: 163 – 184, 2001
- BEST, M. & NEUHAUSER, N.. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf. Health Care.* 13(3): 233-234, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. *Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde.* Segunda Edição: Brasília, 1994.
- BRASIL. ANVISA, *Resolução 2606.* Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 11 de agosto de 2006.
- BREWER, CM, Variations in Phenol Coefficient Determinations of Certain Disinfectants. *American Journal of Public Health*, vol. 33, 261-264. March, 1943
- DUBOS, R.. *Pasteur and modern science.* Anchor Books and Doubleday & Co. Inc, Garden City: NY, 1960.
- FREITAS, Marcelo Bessa de, BRILHANTE Ogenis Magno e ALMEIDA, Liz Maria de. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Cad. Saúde Pública* vol.17 no.3 Rio de Janeiro Maio/Junho, 2001.
- MOROZOWSKI, E. Contenção primária de riscos biológicos. Seleção instalação e uso de gabinetes de segurança biológica. HCL, Curitiba, 68p.1997.
- MOROZOWSKI, E. Contenção primária de riscos biológicos. Seleção instalação e uso de gabinetes de segurança biológica. HCL, Curitiba, 68p, 1997.
- TYNDALL, J.P. On heat as a germicide when discontinuously applied. *Proceedings of the Royal Society of London*, 25: 569, 1877.

Capítulo 3

Microscopia de luz

Pedro Paulo de Abreu Manso
Marcelo Pelajo Machado

1. Introdução

Os conhecimentos que possuímos hoje nas áreas de Biologia Celular, patologia e histologia se devem ao desenvolvimento de técnicas que nos possibilitaram ver um mundo fascinante. Com o avanço tecnológico, estas ferramentas se desenvolveram a um ponto que o microscópio se tornou fundamental em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico.

Conhecer os fundamentos da Microscopia e a forma correta de utilizar um microscópio é essencial para qualquer profissional que trabalha nessas áreas. Neste capítulo, iremos discutir princípios básicos e algumas modalidades de microscopia de luz.

Os microscópios de luz, como o próprio nome sugere, são microscópios que utilizam luz do espectro visível ou não para gerar uma imagem. Também podem ser chamados de fotônicos, ou seja, que utilizam fótons, os quais são partículas de luz. Muitos microscópios, como o confocal, detectam a luz sob esta forma. Muitas vezes, estes microscópios são chamados de ópticos, e de fato o são, pois as imagens são geradas com base em princípios da óptica.

Contudo, os microscópios eletrônicos também utilizam princípios ópticos para gerar a imagem, embora não usem luz e sim elétrons. Então, chamamos de microscópio de luz aqueles que possuem uma fonte de luz para gerar a imagem e eletrônicos aqueles que utilizam elétrons.

2. Luz

Para compreender os princípios da microscopia fotônica, é preciso conhecer algumas características da luz. Dependendo da ocasião em que observarmos o comportamento da luz, podemos considerá-la como uma partícula ou como uma onda. Para a maior parte das explicações aqui apresentadas, nos deteremos ao conceito de que a luz é uma onda.

A luz que enxergamos compreende uma pequena faixa do espectro de ondas eletromagnéticas, que chamamos de região visível. Esta região varia do violeta ao vermelho, o que numericamente pode ser expresso por cerca de 400 e 700 nanômetros (nm) de comprimento de onda. A luz branca que observamos normalmente é formada pelo somatório de todos os comprimentos de onda do espectro visível. Algumas lâmpadas especiais utilizadas em microscopia, como as de vapor de mercúrio, emitem luz em espectros que ultrapassam essa região.

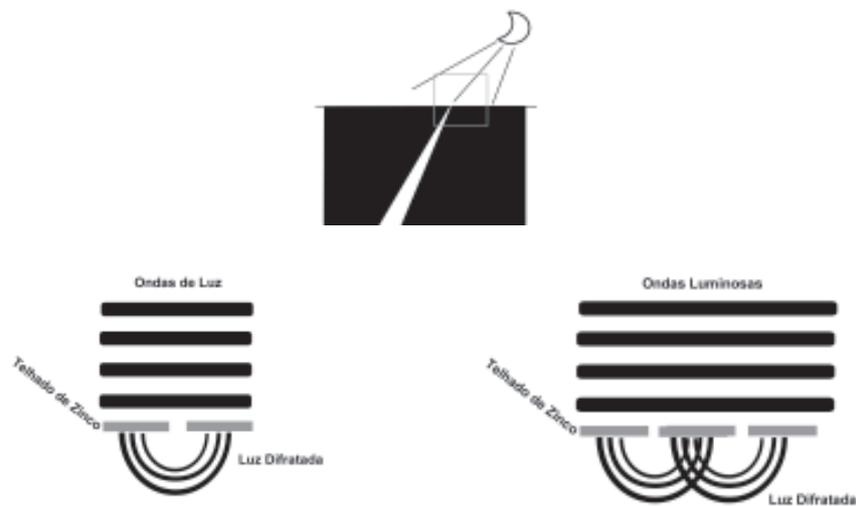
A luz pode sofrer interferências que são fundamentais para o processo de formação da imagem, dentre as quais duas devem ser consideradas para o estudo da microscopia: a difração e a refração. A difração está diretamente ligada ao processo de formação da imagem e a capacidade de resolução de uma lente; já a refração nos permitirá entender tanto por que utilizamos meios de imersão para objetivas quanto o princípio da microscopia de contraste diferencial de interferência.

Para entender o que é difração, tomaremos o exemplo de um telhado de zinco perfurado, muitas vezes citado em músicas e poemas, como o transcrito a seguir, de um trecho da música *Chão de Estrelas*, de Silvio Caldas e Orestes Barbosa.

A porta do barraco era sem trinco
 Mas a lua furando nosso zinco
 Salpicava de estrelas nosso chão
 Tu pisavas nos astros distraída
 Sem saber que a ventura desta vida
 É a cabrocha, o luar e o violão. (grifos nossos)

As estrelas que salpicavam o chão, tão belamente citadas pelo poeta, na verdade fisicamente eram a luz da lua difratada, ao passar por um orifício circular formado pelo furo no telhado de zinco. Se você imaginar esta cena, vai perceber que, ao passar pelos pequenos furos no telhado, a luz se espalha formando um cone de iluminação que chega até o chão, onde ilumina, formando pontos circulares que o autor chamou de estrelas. Se observarmos este fenômeno esquematicamente (Figura 1), veremos a luz chegando ao orifício e sendo difratada, o que gera um espalhamento dessa luz.

Figura 1 – O fenômeno da difração da luz

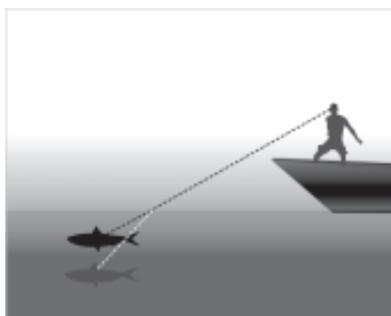


Esquema apresentando o fenômeno da difração, através do exemplo da luz da lua penetrando em um telhado de zinco. A luz que chega ao telhado sofre um espalhamento, formando um cone de iluminação até o chão. No detalhe, as ondas luminosas que chegam ao orifício circular (furo no telhado) sendo difratada (esquerda). Detalhe de dois orifícios próximos, onde a luz difratada nestes orifícios sofre interações positivas e negativas, que formarão regiões claras e escuras (direita).

Ao transportar este exemplo para a formação de imagem em um microscópio, vemos que cada amostra observada é um telhado de zinco cheio de pequenos 'furos', onde a luz passa e sofre difração. Toda amostra possui estruturas que estão separadas por uma distância, que atuam da mesma forma que 'furos' no telhado. A luz difratada de pontos próximos sofrerá interações positivas e negativas que irão gerar regiões de alta luminosidade e de baixa luminosidade, que nos permitirão formar uma imagem da amostra. Além disso, a capacidade que uma lente possui de distinguir dois pontos (resolução) é dada por sua capacidade de captar raios difratados. Quanto mais raios difratados uma lente captar, maior será sua abertura numérica e conseqüente resolução.

A refração da luz é um fenômeno que ocorre devido a diferenças na velocidade em que a luz passa por determinados meios. Dependendo do índice de refração de alguns objetos, a luz passa de forma mais rápida ou mais lenta por este, o que pode gerar desvios que influenciam na percepção da imagem. Um exemplo fácil para compreendermos a refração é a visão de um peixe no fundo de um lago (Figura 2). Como o índice de refração da água é diferente do índice de refração do ar, observamos o peixe acima da profundidade em que ele realmente está, pois a luz sofre um desvio ao mudar de um meio para outro, no caso da água para o ar.

Figura 2 – Exemplo de refração da luz



Um homem observa o peixe no lago acima do nível onde este realmente está. Isso se deve ao desvio que a luz sofre ao passar da água para o ar, os quais possuem índices de refração diferentes. *Arte gráfica: Newton Marinho da Costa Jr.*

O caminho que a luz percorre nos microscópios faz com que um feixe luminoso passe por diferentes meios. No caso, por exemplo, da observação de preparados em lâminas, a luz sofre refração ao passar do vidro da lâmina para o ar e, em seguida, do ar para o vidro presente na objetiva. Essa mudança de meios pode causar perda de raios luminosos que são refratados. A utilização de um meio de imersão com um índice de refração semelhante ao do vidro reduz quase completamente essa perda.

3. Microscópios

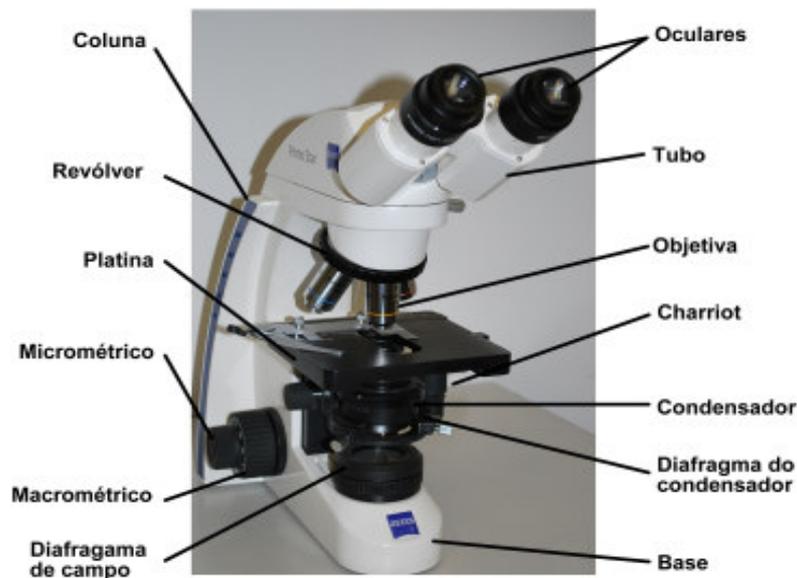
O primeiro microscópio surgiu por volta de 1595, com os trabalhos do fabricante de óculos holandês Zacharias Janssen, que uniu duas lentes em um mesmo eixo, possibilitando a observação de pequenas estruturas. Em 1665, Robert Hooke construiu o primeiro microscópio que se baseava na utilização de uma lente ocular próxima ao olho e uma objetiva. Os trabalhos de Hooke culminaram no livro *Micrographia*, o qual apresenta a descrição de diferentes seres vivos sob Microscopia. Neste tratado, encontra-se a primeira observação de cortes de cortiças, onde foram visualizados poros chamados naquela ocasião de 'células'. Desde então, o microscópio vem sendo crescentemente considerado uma poderosa ferramenta para as ciências naturais, sendo aprimorado ao longo dos anos.

Os microscópios de hoje são mais complexos que os da época de Janssen e Hooke, mas seguem a mesma lógica de utilizar lentes associadas para gerar uma imagem ampliada. Na Figura 3, indicamos cada parte do microscópio. Como todo instrumento de precisão, os microscópios possuem uma parte mecânica que os sustentam e permitem sua regulagem. Esta parte é composta de uma base e uma coluna, que suportam o microscópio; um tubo que une as objetivas às oculares; o macrométrico e o micrométrico, que fazem o ajuste de aproximação entre a objetiva e a amostra, possibilitando que a amostra seja focalizada; uma platina e um *charriot*, que permi-

tem a movimentação da amostra; e o revólver, que sustenta as objetivas e permite a troca destas quando necessário.

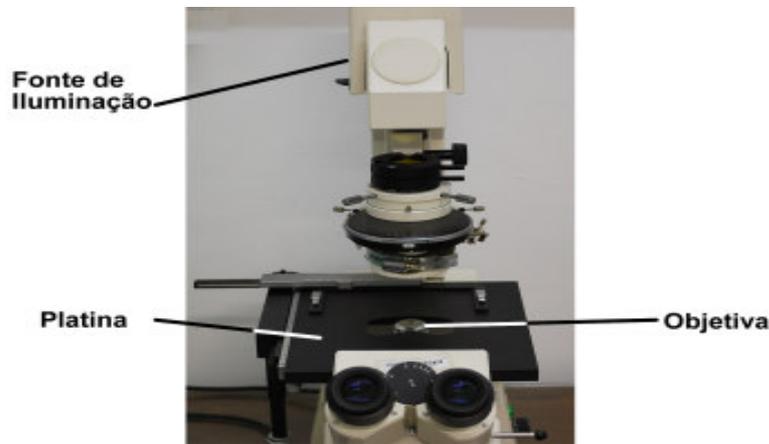
Além dos elementos mecânicos, o microscópio possui ainda componentes ópticos, que são: a fonte de iluminação, que normalmente em microscópios convencionais é uma lâmpada de halogênio; o diafragma de campo; o condensador, que concentra os raios luminosos na amostra; o diafragma do condensador que possibilita a regulação correta do contraste no microscópio; e as lentes objetivas e oculares, que dão o aumento e a resolução da imagem. A ampliação obtida em um microscópio é dada pelo produto entre o aumento da objetiva e o aumento da ocular. Portanto, se estivermos utilizando uma objetiva de 40x e uma ocular de 10x, estaremos ampliando o objeto analisado em 400x. Na parte óptica, os microscópios ainda possuem as lentes do tubo, que ficam no interior do canhão (ou tubo) e são responsáveis por formar a imagem ampliada da objetiva na região de foco da ocular.

Figura 3 – Principais elementos ópticos e mecânicos de um microscópio de luz



Algumas amostras não podem ser observadas em microscópios retos pois não cabem no espaço entre a platina e a objetiva. Garrafas de cultura, por exemplo, não podem ser observadas nestes microscópios, pois a amostra fica muito longe da objetiva. Para este tipo de espécime, utilizamos microscópios invertidos, cuja fonte de iluminação está localizada acima da platina e as objetivas estão posicionadas abaixo desta (Figura 4).

Figura 4 – Microscópio invertido



Obs.: Note que as objetivas estão abaixo da platina e a fonte de iluminação encontra-se na parte superior.

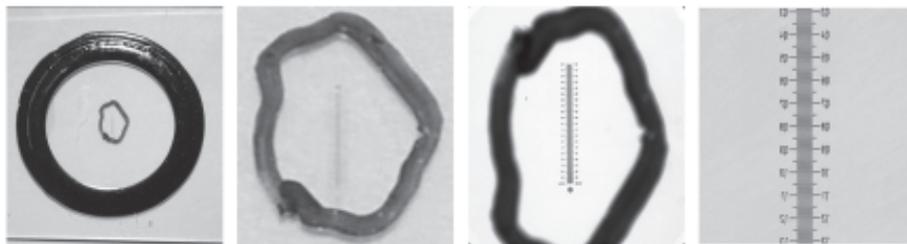
4. Aumento x resolução

Durante a rotina em laboratórios de pesquisa e diagnóstico, é muito frequente a necessidade de utilizar microscópios. Esses equipamentos nos permitem observar muito além de nossa capacidade visual. As medidas utilizadas em um microscópio óptico são da ordem de micrômetros (μm), que equivalem à milésima parte de um milímetro. Para termos ideia do que é isso, podemos pegar uma régua e tentar dividir o espaço de um milímetro em mil pedaços. Isso seria impossível, pois não somos capazes, sem o auxílio de ferramentas apropriadas, de enxergar ou fazer traços com espessura suficiente.

Veríamos estes traços como um borrão. Isso acontece pois nossos olhos não são capazes de aumentar esta régua a ponto de enxergarmos o espaço entre as linhas, além de não possuírem resolução suficiente para distinguir este espaço.

Os microscópios não só nos auxiliam aumentando as estruturas observadas, mas também a resolução de nossa visão. A resolução é a capacidade de distinguir dois pontos próximos. A resolução máxima de nossos olhos é em torno de 200 μm , o que quer dizer que dois pontos separados por uma distância menor que esta são observados como um único ponto, como no caso das linhas da citada régua. O microscópio nos permite aumentar esta resolução para cerca de 0,2 μm . Voltando ao exemplo, observaremos uma régua micrométrica de 2 mm dividida em duzentas partes. Se tirarmos uma foto desta régua e ampliarmos com *zoom* digital, o que observamos é uma única linha na vertical. Isso ocorre porque, embora tenhamos ampliado a imagem, não modificamos a resolução. Se, em uma outra ocasião, utilizando agora uma lente com maior resolução, observarmos a mesma régua, seremos capazes de distinguir os traços que a dividem (Figura 5).

Figura 5 – Régua de 2 mm dividida em duzentas partes



- (A) Foto com máquina fotográfica convencional.
- (B) *Zoom* digital da imagem 'A'. Houve um aumento sem ganho de resolução.
- (C) Imagem adquirida com uma lente objetiva de aumento 2,5x com resolução superior à da máquina fotográfica. É possível ver os traços maiores.
- (D) Fotomicrografia com uma lente objetiva de 10x e resolução superior às anteriores. Podemos observar os traços que compõem a régua.

5. Objetivas

É muito comum olharmos para as lentes que ficam afixadas no revólver do microscópio apenas para averiguar qual é o ‘aumento’ com o qual estamos analisando nossa amostra. No entanto, essas lentes, que por serem o elemento óptico mais próximo da amostra são chamadas de ‘objetivas’, representam muito mais do que isso. Na verdade, elas são provavelmente o componente mais importante do sistema óptico de um microscópio, sendo determinantes na resolução da imagem, no contraste com o qual os detalhes são visualizados, na profundidade do espécime do qual é obtida informação e também no diâmetro do campo de análise. Nesse sentido, os demais elementos ópticos do microscópio são importantes e podem até atuar corrigindo ou modificando o padrão da luz, mas, de fato, servem mesmo para ampliar e manter a qualidade da imagem gerada pelas objetivas.

Entende-se por ‘lente’ um dispositivo habitualmente feito de vidro, capaz de produzir convergência ou divergência de raios luminosos que por ele passem. As ‘objetivas’ modernas, na verdade, são compostas por vários desses elementos, chegando a conter até 15 ou 16 lentes na sua construção interna.

Existem objetivas de diversas especificações e, portanto, destinadas a aplicações mais gerais ou mais específicas. Essas características, detalhadas a seguir e apresentadas na Figura 6, estão anotadas no corpo da ‘lente’:

Figura 6 – Exemplo de objetiva com indicação dos campos nela gravados



5.1. Fabricante

Nome da empresa responsável pela montagem da objetiva.

5.2. Denominação (classe de objetiva e correção cromática)

A geometria óptica possui limitações que precisam ser levadas em conta em Microscopia. Nesse sentido, alguns efeitos indesejados podem ocorrer com a luz quando esta atravessa uma lente, aos quais denominamos 'aberrações'. Por exemplo, duas aberrações ocorrem no mesmo eixo da objetiva: a 'aberração esférica', na qual os raios que passam pelo eixo da lente e os que passam pela periferia possuem pontos de foco diferentes; e a 'aberração cromática', na qual o mesmo ocorre em relação aos diferentes comprimentos de onda.

O termo grafado neste campo se refere à classe e ao tipo de correção que a objetiva possui. Pode variar um pouco de acordo com o fabricante, mas, de forma geral, encontramos as seguintes especificações:

- a) *Plan*: as lentes 'planas' apresentam correção esférica, ou seja, todo o campo está em foco. *Achroplan* são mais recomendadas para uso em luz transmitida e *Epiplan* o são para luz refletida.
- b) *Achromat*: lentes acromáticas que possuem correção cromática para duas cores. É comum que as correções estejam combinadas. Assim, por exemplo, lentes planacromáticas (*Planachromat*) corrigem tanto o foco das duas cores quanto a homogeneidade de foco do campo de análise.
- c) *Apochromat*: lentes acromáticas que possuem correção cromática para quatro cores. Da mesma forma que o item anterior, podem ter também correção esférica, passando a se chamar planapocromáticas (*Planapochromat*).
- d) *Fluar*: lentes que possuem elementos de fluorita (fluoreto de cálcio). Não possuem o campo plano, mas são excelentes para microscopia de

fluorescência. Existem lentes desse tipo com correção esférica (*PlanFluar* ou *PlanNeofluar*), mas que têm menor taxa de transmissão de luz em fluorescência, embora sejam excelentes para microscopia de polarização e de contraste de interferência. Todas as lentes *Fluar* possuem correção cromática para três ou quatro cores.

A 'classe' se refere ao tipo de aplicação para a qual aquela objetiva foi desenhada. Assim, utilizando como exemplo as lentes da fabricante Carl Zeiss, podem constar, entre outros, os seguintes termos:

- a) 'LD' (*long working distance*): para trabalho com grande distância do espécime, como em culturas de células sob análise em microscópios invertidos.
- b) 'EC' (*enhanced contrast*): ideais para fluorescência.
- c) 'LCI' (*life cell imaging*): desenhadas para trabalho com células vivas.
- d) 'C' (*C-Apochromat*): para microscopia confocal.
- e) 'W' ou 'WN': desenhadas para aplicações em eletrofisiologia.

5.3. Magnificação/abertura numérica

O primeiro valor, antes da barra, indica a magnificação, ou seja, quantas vezes aquela objetiva é capaz de ampliar a imagem da amostra. Após a barra, consta a abertura numérica (NA), a qual pode ser expressa pela seguinte fórmula:

$$NA = n (\sin \mu), \text{ onde:}$$

- a) n é o índice de refração do meio entre a objetiva e a lamínula/amostra;
- b) μ é metade do ângulo de abertura da objetiva.

Assim, é importante reparar que, quanto maior a abertura numérica de uma objetiva, mais curta será a sua distância de trabalho. Na prática, lentes

com NA maior que 0,95 tendem a necessitar de um meio de imersão para boa captação da luz.

É fundamental observar também que é a NA que indica a verdadeira capacidade de resolução (d) daquela lente, uma vez que esta última é diretamente proporcional ao comprimento de onda (λ) e inversamente proporcional ao dobro da abertura numérica (NA), como expresso na equação:

$$d = \lambda / 2NA$$

A partir dessa fórmula, podemos observar que, sob um mesmo comprimento de onda (543 nm, por exemplo), uma objetiva 100x/0,75 tem uma resolução ($d = 362$ nm) inferior à de uma 63x/1,40 ($d = 194$ nm).

5.4. Método de contraste

Se a lente contiver um anel de fase no seu interior (destinado à microscopia de contraste de fase), ela indicará '*Ph*', seguida de um número, o qual varia de acordo com o fabricante. Para esse tipo de microscopia, é importante que se observe que este número deve ser o mesmo em relação ao indicado no anel que será colocado no condensador. A presença desse anel no interior dessas lentes reduz a quantidade de luz por elas transmitida, de maneira que não são habitualmente indicadas para microscopia de fluorescência.

Da mesma forma, as inscrições '*Pol*' e '*DIC*' se referem à adequabilidade da lente à microscopia de polarização e de contraste de interferência, respectivamente.

5.5. Meio de imersão

As lentes que exigem a utilização de meio de imersão e, portanto, não devem trabalhar com ar entre elas e o espécime sob análise trazem escrita uma das opções a seguir:

- a) '*Oil*': óleo de imersão para microscopia. Este habitualmente tem índice de refração (n) próximo a 1,51. Alguns fabricantes produzem óleos especiais, com este mesmo n , mas especialmente desenvolvidos para uso em microscopia de fluorescência.
- b) '*W*': água. Deve-se empregar água destilada. O uso de óleo de imersão nessas lentes pode danificá-las.
- c) '*Korr*': Essas lentes possuem um anel que as ajusta para o uso com óleo para microscopia, água ou glicerina ('*Gly*').

Cabe mencionar que, de maneira geral, o mais adequado é usar um meio de imersão que tenha um n semelhante ao meio de montagem da amostra que está sendo analisada. Nesse sentido, se precisarmos usar uma lente que exija imersão, habitualmente escolhemos, por exemplo, uma que trabalhe com óleo para amostras montadas em bálsamo do Canadá e uma que trabalhe com água para células em cultura. A não observância dessa regra pode ocasionar uma grande queda na intensidade da luz captada e no contraste, por conseguinte gerando uma imagem de qualidade inferior à desejada.

5.6. Comprimento do tubo

Indica se aquela objetiva foi desenhada para trabalho em distância fixa (habitualmente 160 mm) ou se é corrigida para óptica infinita (' ∞ ' ou '*ICS*'). Essa distância é chamada de 'comprimento mecânico do tubo' e vai da base da objetiva até a inserção das oculares.

5.7. Espessura máxima da lamínula

Habitualmente, indica algo como '0,17' ou '0,19 – 0,15', que corresponde à espessura de lamínulas padrão. A presença de um sinal de negativo ('-') aponta que esse índice não interfere na qualidade da imagem da objetiva. Por sua vez, o número zero ('0') indica que essa lente deve ser

usada em preparações sem lamínula. Assim como ocorre em algumas lentes de imersão, algumas objetivas possuem um anel de regulação para a espessura da lamínula.

Cabe mencionar que, por vezes, a espessura do material presente entre o espécime e a objetiva pode ser bem maior que os valores mencionados, como é o caso de placas ou garrafas usadas em culturas de células. Nesses casos, habitualmente empregamos microscópios invertidos dotados de lentes 'LD', que permitem o trabalho com distâncias de mais de um milímetro.

Ainda sobre todas essas informações contidas nas objetivas, cabe comentar que alguns fabricantes usam cores diferentes nas letras ou anéis coloridos para indicar, por exemplo, o método de contraste que aquela lente possui, sua magnificação e o meio de imersão necessário.

6. Como utilizar um microscópio

O microscópio é um equipamento caro e frágil. Deve, portanto, ser manipulado com muito cuidado. Para observar uma lâmina ao microscópio, é preciso:

- a) Ligar o microscópio na tomada, observando a voltagem correta, a fim de evitar danos aos componentes eletrônicos do equipamento.
- b) Aumentar a intensidade da luz aos poucos.
- c) Colocar a lâmina na platina e focalizá-la com a menor objetiva.
- d) Regular o microscópio pelo ajuste de Köhler (ver a seguir).
- e) Trocar a objetiva sempre focalizando, até chegar ao aumento de interesse.
- f) Ao final da observação, a luz deve ser diminuída e em seguida desligada.
- g) Com o auxílio do macrométrico, a platina deve ser afastada totalmente da objetiva.

- h) A lâmina deve ser retirada.
- i) A menor objetiva deve ser selecionada.
- j) Retirar da tomada a fonte de alimentação.
- l) Cobrir o microscópio com uma capa de pano, para protegê-lo de poeira.

Se objetivas de imersão forem utilizadas, deve-se retirar o óleo da objetiva com o auxílio de um papel absorvente, passando-o delicadamente para não arranhar a lente.

A limpeza das lentes objetivas e oculares do microscópio deve ser feita com uma solução de álcool-éter (9:1). O uso de xilol e outros solventes orgânicos deve ser evitado, pois pode causar descolamento das lentes.

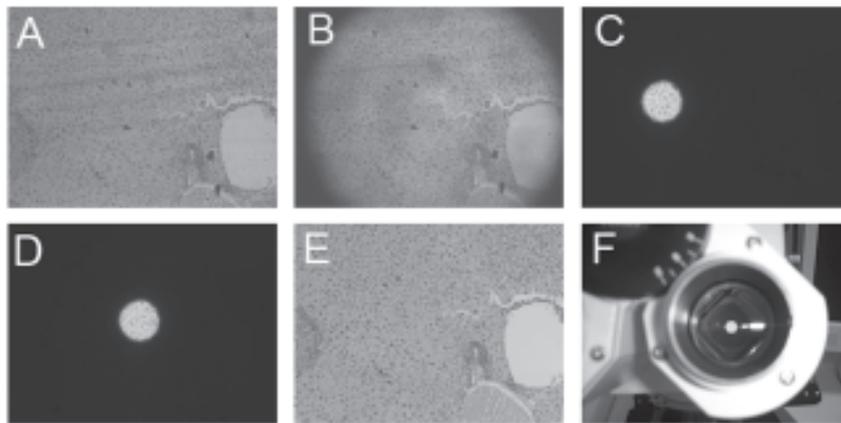
7. Iluminação de Köhler

Desenvolvida por August Köhler em 1893, a iluminação de Köhler é o ajuste dos planos focais do microscópio, promovendo a coincidência dos focos do diafragma de campo, do objeto, da imagem formada no tubo do microscópio e a imagem formada para o observador. O ajuste da iluminação permite que a luz seja aproveitada integralmente e que a imagem possua o melhor contraste possível.

Para realizar a iluminação de Köhler, é preciso inicialmente focalizar uma lâmina (Figura 7A). Em seguida, fecha-se o diafragma de campo que formará um círculo ou um hexágono luminoso (Figura 7B). Com os parafusos do condensador, deve-se centralizar esta figura geométrica no campo visual (Figuras 7C e 7D). As bordas deste hexágono devem ficar nítidas, com o auxílio do ajuste de foco do condensador (Figura 7D). Em seguida, abre-se o diafragma de campo até que a região iluminada ocupe o campo visual, sem que ultrapasse estes limites (Figura 7E).

Para finalizar o ajuste do microscópio, retira-se com cuidado a ocular para correta observação do diafragma do condensador. Este deve ocupar aberto cerca de 80% do campo, dando assim o contraste ideal para a amostra (Figura 7F).

Figuras 7A a 7F - Etapas para obtenção da iluminação de Köhler



8. Tipos de Microscopia de luz

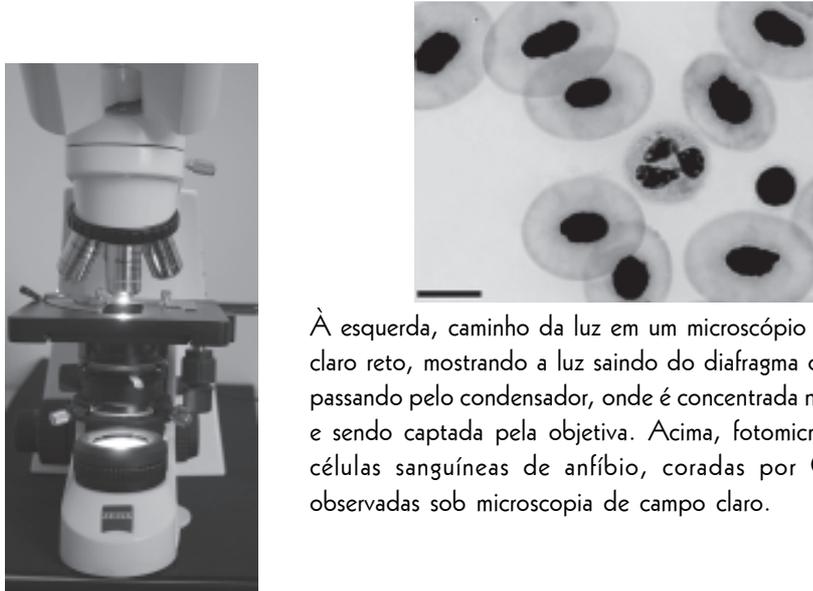
8.1. Microscopia de campo claro

É o tipo de Microscopia básica, em que não há interferências no caminho óptico. Todo microscópio de luz possui esta forma de Microscopia. Na microscopia de campo claro, a luz parte da fonte luminosa, é concentrada pelo condensador, interage com a amostra e é coletada pela objetiva. A imagem ampliada pela objetiva é formada na lente do tubo e mais uma vez ampliada pelas oculares, até chegar ao observador (Figura 8). Como o próprio nome sugere, na microscopia de campo claro o fundo da imagem é branco.

Para que a imagem seja observada neste tipo de Microscopia, é necessário que a amostra possua cor própria ou que esta lhe tenha sido conferida

artificialmente. A cor permite um maior contraste entre as estruturas que possibilita sua correta observação.

Figura 8 – Microscopia de campo claro



À esquerda, caminho da luz em um microscópio de campo claro reto, mostrando a luz saindo do diafragma de campo, passando pelo condensador, onde é concentrada na amostra, e sendo captada pela objetiva. Acima, fotomicrografia de células sanguíneas de anfíbio, coradas por Giemsa e observadas sob microscopia de campo claro.

8.2. Contraste de fase

Algumas amostras são observadas ao microscópio sem coloração, como, por exemplo, células em cultura. Para observação de amostras muito finas que não podem ser coradas, deve-se utilizar técnicas microscópicas de alto contraste. A Microscopia de contraste de fase se baseia no atraso que raios difratados apresentam em relação a raios não difratados. Ao passar pela amostra, os raios difratados adquirem uma diferença de velocidade de $\frac{1}{4}$ de comprimento de onda em relação aos não difratados. Essa diferença pode ser eliminada se os raios que não foram difratados forem acelerados ou retardados. Para tal, utiliza-se um anel de fase no condensador e na objetiva, que une os raios difratados e os não difratados, aumentando assim as interações positivas e negativas entre estes raios e, conseqüentemente, o contraste da imagem (Figura 9).

Figura 9 – Microscopia de contraste de fase

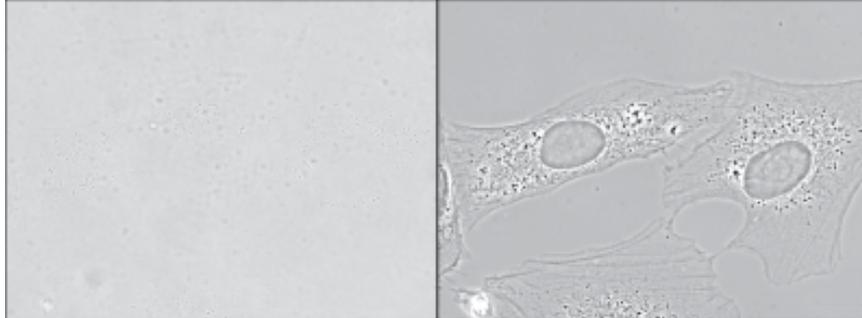


Imagem de campo claro de células em cultura não coradas (esquerda). Imagem em contraste de fase do mesmo campo (direita).

Para que uma amostra seja observada neste tipo de Microscopia, é preciso que haja um anel de fase no condensador e objetivas específicas, identificadas com as letras Ph (Figura 10). Inicialmente, deve-se regular o microscópio, selecionar no condensador o anel de fase e a objetiva de fase. Para ajustar a fase, devemos retirar uma das oculares com cuidado e alinhar o anel de fase da objetiva ao anel de fase do condensador, alinhando a região sombreada de um com a do outro. Em seguida, colocamos a ocular em seu local para a análise do espécime.

Figura 10 – Objetiva e condensador para microscopia de contraste de fase

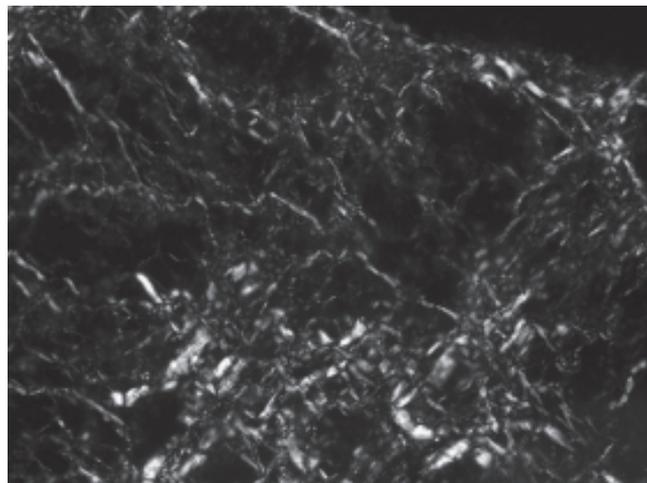


8.3. Polarização

A microscopia de polarização permite que substâncias com capacidade de desviar a direção da luz, chamadas de anisotrópicas, sejam observadas seletivamente. Estas substâncias podem estar depositadas normalmente nos tecidos ou serem ligadas a determinadas estruturas por métodos tintoriais. Este tipo de microscopia é muito utilizado para observação de sais, rochas, cristais, cabelo, ossos, entre outras amostras que possuam em seu interior substâncias anisotrópicas.

O microscópio de polarização possui um funcionamento semelhante ao de campo claro. São adicionados apenas um cristal polarizador, que irá selecionar apenas um plano da luz incidente, e um cristal analisador, que irá bloquear a passagem da luz incidente que não sofreu desvios e selecionar apenas a luz que foi desviada por uma substância anisotrópica. Para realização desta microscopia, basta selecionar o polarizador e o analisador e variar sua angulação, até que a imagem seja formada com um fundo preto (Figura 11).

Figura 11 – Microscopia de polarização



Fotomicrografia de material corado por Picosírius sob observação à microscopia de polarização. Esta coloração especial é própria para identificar fibras colagênicas.

8.4. Contraste diferencial de interferência de Nomarski (DIC)

A Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC) permite que amostras não coradas sejam observadas com alto contraste e sensação de profundidade. Espécimes ligeiramente mais grossos que não podem ser observados em contraste de fase podem ser observados em DIC.

Em uma amostra, diferenças de composição e espessura entre regiões geram índices de refração ligeiramente diferentes. Essa diferença faz com que a luz atravesse o espécime com velocidades distintas. Na década de 1950, o físico francês Georges Nomarski utilizou este princípio para criar um tipo de microscopia de alto contraste. O contraste de Nomarski consiste na utilização de um analisador, semelhante ao da microscopia de polarização, que seleciona a luz em uma única direção. Em seguida, a luz é dividida em dois feixes ligeiramente afastados por um prisma (prisma de Wollaston). Essa separação faz com que uma região da amostra seja iluminada por um feixe e outra adjacente seja iluminada por outro. Depois de interagir com a amostra, esses feixes são reunidos por um segundo prisma e, em seguida, passam por um analisador que seleciona os feixes que sofreram mudança de angulação (Figura 12). A combinação destes feixes de luz, que interagiram com diferentes regiões da célula, criará interações positivas e negativas que irão gerar uma imagem de alto contraste (Figura 13).

Figura 12 – Elementos ópticos da microscopia de DIC

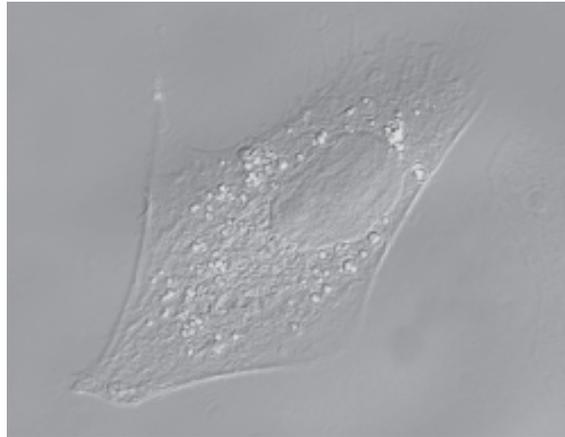


(A) Primeiro prisma de Wollaston situado antes do condensador.

(B) Prisma de Wollaston da objetiva.

(C) Segundo prisma de Wollaston encaixado sob a objetiva.

Figura 13 – Microscopia de DIC



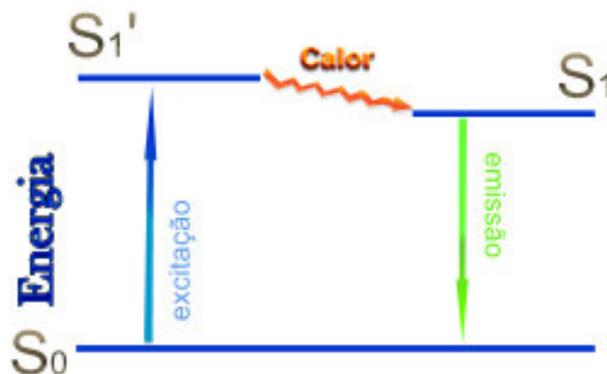
Célula em cultura observada em DIC, evidenciando a sensação de relevo dada por este tipo de microscopia.

8.5. Microscopia de fluorescência

Algumas substâncias apresentam propriedade fluorescente, ou seja, quando excitadas, com uma determinada fonte de energia, emitem luz. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez pelo cientista inglês George G. Stokes, ao trabalhar com um mineral que apresentava essas propriedades.

A fluorescência ocorre quando elétrons de uma molécula são excitados e mudam de camada eletrônica, passando a ocupar uma camada mais energética. Estes elétrons voltam a seu estado original emitindo luz. A luz emitida apresenta energia menor que a recebida durante a excitação. Isso se deve a uma ligeira perda de energia sob a forma de calor. É preciso lembrar que o comprimento de uma onda eletromagnética é inversamente proporcional à sua energia, ou seja, quanto menor a energia, maior o comprimento de onda. Portanto, a luz emitida de uma molécula fluorescente possui um comprimento de onda maior que a fonte de energia que a excitou. Esse fenômeno pode ser representado de forma esquemática pelo diagrama de Jablonski (Figura 14).

Figura 14 – Diagrama de Jablonski



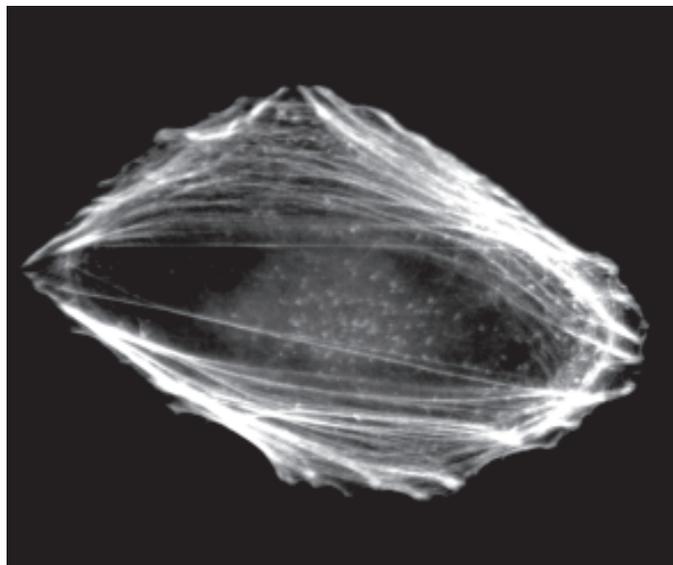
Um elétron em seu estado normal de energia é excitado e elevado a um estado S_1' em uma camada mais energética. Este elétron retorna à camada original, perdendo parte da energia sob a forma de calor e parte emitindo luz, em um comprimento de onda maior. *Arte gráfica: Newton Marinho da Costa Jr.*

O primeiro microscópio que utilizava o princípio da fluorescência foi construído por August Köhler no início do século XX. Contudo, sua aplicação era limitada. Somente com o desenvolvimento de anticorpos ligados a fluoróforos (molécula fluorescente), cerca de cinquenta anos depois, foi possível sua utilização em grande escala nos laboratórios. Os microscópios de fluorescência utilizam a luz como fonte de excitação. As substâncias fluorescentes, ao serem iluminadas por esta fonte, emitem luz em um comprimento de onda maior, ou seja, de menor energia. As moléculas fluorescentes utilizadas como sondas para microscopia, em geral, apresentam um espectro de excitação e de emissão conhecidos. Como a luz emitida possui comprimento de onda diferente do de excitação, é possível separá-las por filtros que limitam a passagem de luz em faixas determinadas. Dessa forma, é possível garantir que a imagem observada é gerada apenas onde há moléculas fluorescentes (Figura 15). Se, por exemplo, esta molécula estiver ligada a anticorpos, podemos então dizer que a imagem gerada representa os locais onde aquele anticorpo se ligou.

Quando observamos uma amostra em um microscópio de fluorescência, estamos observando a luz emitida pela amostra. Neste caso, a luz proveniente da fonte luminosa não passa pela amostra, sofrendo interferências que irão gerar a imagem, como na microscopia de campo claro. A luz é uma fonte de energia que irá apenas excitar a molécula fluorescente. A imagem é formada pela luz emitida pela própria amostra.

Os microscópios de fluorescência atuais geralmente utilizam como fonte luminosa lâmpadas de vapor de mercúrio ou xenônio, capazes de emitir luz branca de alto brilho. Uma faixa desta luz é selecionada por um filtro de excitação, no comprimento de onda ideal de excitação da molécula fluorescente. Os fluoróforos presentes na amostra são excitados e emitem luz em um comprimento de onda maior que o da excitação, que pode ser selecionado por um filtro de emissão e detectado pelo observador ou por uma câmera fotográfica.

Figura 15 – Célula VERO em cultura, marcada com faloidina-FITC



Essa droga é capaz de interagir com filamentos de actina, os quais então podem ser visualizados à microscopia de fluorescência.

Os principais tipos de filtro utilizados em microscópios de fluorescência são:

- Filtros de passagem curta (*Short-pass filters*): são frequentemente utilizados como filtros de excitação, transmitem luz em uma faixa ligeiramente acima de um valor determinado em comprimentos de onda e refletem ou absorvem outros comprimentos de onda.
- Filtros de passagem longa (*Long-pass filters*): transmitem uma grande faixa de luz acima do valor determinado em comprimento de onda e reflete ou absorve valores abaixo.
- Filtros de faixa (*Bandpass filters*): transmitem uma região compreendida entre duas faixas de comprimento de onda, refletindo ou absorvendo as demais.

O caminho óptico dos microscópios de fluorescência (Figura 16) é diferente dos demais anteriormente apresentados neste capítulo. A fonte de luz passa pela objetiva antes de chegar à amostra. Portanto, a luz que chega ao espécime e a que é emitida passa pelo mesmo caminho óptico. Para separá-las, além dos filtros de emissão e excitação, utilizamos um espelho dicróico, que reflete um determinado comprimento de onda e transmite – ou seja, deixa passar – outros comprimentos de onda. Os filtros e espelhos utilizados ficam unidos em um cubo localizado acima da objetiva.

Figura 16 – Caminho óptico de um microscópio de fluorescência



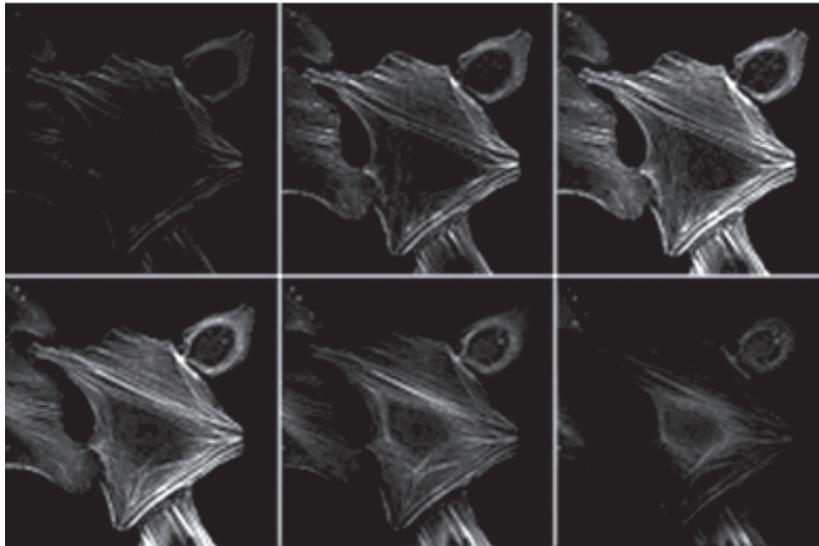
A luz parte de uma lâmpada policromática, passa por uma lente condensadora que concentra os raios e, em seguida, por um filtro de excitação que seleciona o comprimento de onda específico para o fluoróforo observado (feixe azul). Dentro do cubo de fluorescência se encontram o filtro de excitação, um espelho dicróico e o filtro de emissão. A luz refletida pelo espelho dicróico passa pela objetiva, sendo concentrada na região iluminada da amostra. O espécime marcado com um fluoróforo emite luz (feixe verde), que é transmitida pelo espelho dicróico e selecionada pelo filtro de emissão. A imagem final é formada pela ocular e pode ser observada diretamente. *Arte gráfica: Newton Marinho da Costa Jr.*

8.6. Microscopia confocal

A Microscopia confocal se baseia no princípio da confocalidade, descrito pela primeira vez por Marvin Minski, em 1955, no qual dois anteparos físicos com um orifício do tamanho da cabeça de um alfinete (*pinholes*) são colocados junto à fonte de iluminação e ao detector. Estes orifícios estão no mesmo plano focal que a amostra, ou seja, estão em foco. Os anteparos funcionam como uma barreira física que impede a passagem dos raios luminosos das regiões que não estão em foco, possibilitando que a imagem formada seja apenas a do plano focal.

Para que uma amostra seja observada em microscópios fotônicos convencionais, é preciso que esta seja fisicamente cortada em fatias muito finas. Inicialmente, isso se deve ao fato de que a luz precisa atravessar a amostra. Além disso, os planos iluminados irão gerar imagens em foco e fora de foco. Cortes espessos possuem muitos planos fora de foco, os quais irão criar uma imagem borrada que dificultará a observação da imagem em foco. No caso da microscopia confocal, como os planos fora de foco são eliminados pela ação do *pinhole*, cortes relativamente espessos podem ser facilmente analisados, pois somente o plano em foco será observado. Isso permite que espécimes inteiros sejam observados sem a necessidade de cortar fisicamente a amostra. Se movimentarmos o micrométrico, aproximando e afastando a amostra da objetiva, iremos variar o plano que estará em foco (Figura 17). Com o auxílio de um computador, podemos unir as imagens de diferentes planos focais e formar assim uma montagem tridimensional desta amostra.

Figura 17 – Imagem de filamentos de actina em cultura de células observadas sob microscopia confocal



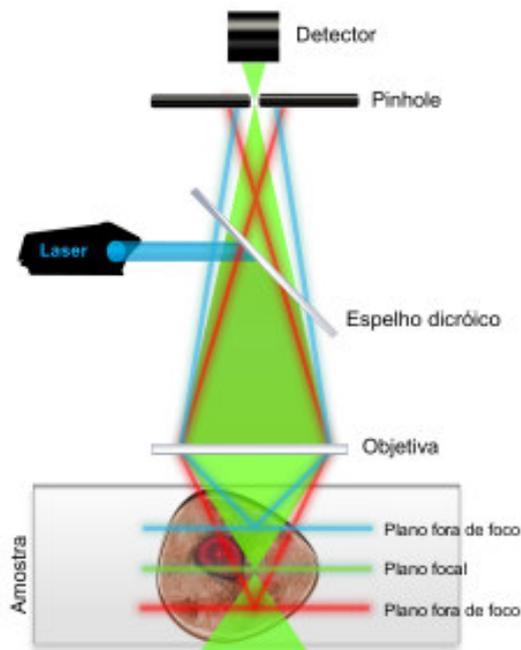
Cada imagem representa um plano óptico de 0,6 micrômetros de espessura.

A maioria dos microscópios confocais utilizam *lasers* como fonte de iluminação. Estes geram um tipo de luz monocromática de alta coerência e intensidade, que compensa a perda de luz causada pela utilização do *pinhole*. Por se tratar de uma luz puntiforme, a iluminação por *laser* não é capaz de formar uma imagem completa do campo sob observação. Por conta disso, a imagem final é montada por um programa de computador a partir de aquisição ponto a ponto. Por esse motivo, não é possível que o pesquisador observe a imagem confocal diretamente nas oculares do microscópio.

A luz emitida pela amostra é captada por detectores especiais chamados fotomultiplicadores. Estes captam fótons e geram sinais elétricos de intensidade proporcional à quantidade de sinal captado. Existem dois tipos de fotomultiplicadores: 1) 'monocromáticos', que detectam qualquer fóton, sendo necessária a seleção do comprimento de onda específico a ser observado, que é feito pela utilização de filtros; 2) 'policromáticos', que possuem regiões com afinidade específica por um determinado comprimento de onda.

O caminho óptico de um microscópio confocal pode ser esquematizado no desenho a seguir (Figura 18). O feixe luminoso parte do *laser* e interage com um ponto da amostra que emite fluorescência. A fluorescência emitida pelo plano que está em foco é captada pelo detector enquanto os planos que não estão em foco são eliminados.

Figura 18 – Esquema mostrando o caminho óptico em um microscópio confocal



Notar que somente o plano da amostra que está em foco é observado enquanto os demais são eliminados pelo *pinhole*. Arte gráfica: *Newton Marinho da Costa Jr.*

9. Considerações finais

Neste capítulo, tivemos como objetivo central delinear alguns princípios de microscopia, enfatizando seus componentes essenciais e apresentando resumidamente os tipos de microscopia de luz mais empregados, cujo conhecimento é mandatório aos profissionais técnicos que atuam em laboratório.

É importante enfatizar que a microscopia de luz é um conjunto de técnicas de complexidade bem maior do que a aqui apresentada. Além disso, esta é profundamente dinâmica, no sentido que o contínuo desenvolvimento de novas tecnologias, sejam ópticas ou mecânicas, tem impacto direto na sua evolução e, portanto, na sua aplicação.

Dessa maneira, a todo o momento, surgem novos componentes para microscópios de luz (ex.: iluminação por LEDs, novas objetivas, fotomultiplicadores de nova geração, entre outros), assim como são desenvolvidas novas modalidades de microscopia (ex.: TIRF, iluminação estruturada, *spinning disk*, entre outras). Cabe ao profissional que utiliza essa ferramenta estar sempre atualizado para que possa sempre obter o máximo de informação possível de suas amostras.

Bibliografia consultada

BENCHIMOL, M. Métodos de estudo da célula. FENORTE/UENF, 1996.

BÜCHERL, W. Introdução às técnicas microscópicas. 4^o ed. Editora Polígono, São Paulo. 1972.

DAVIDSON, M.W. and Abramowitz, M., "Optical Microscopy", Encyclopedia of Imaging Science and Technology, Hornak, J. (ed.), 2, 1106-1141, 2002.

KAPITZA, HG. Microscopy from the very beginning. Carl Zeiss, Oberkochen. 1994

PAWLEY, JB. Handbook of biological confocal microscopy. 2^o ed. Plenum press, New York. 1995.

Capítulo 4

Animais de laboratório

Etelcia Moraes Molinaro

Joel Majerowicz

Sebastião Enes R. Couto

Cleide Cristina Apolinário Borges

Wildeberg Cal Moreira

Simone Ramos

1. Considerações gerais

A pesquisa científica, o ensino e as atividades relacionadas ao desenvolvimento tecnológico e à produção e ao controle da qualidade de vacinas e medicamentos utilizam-se de animais de laboratório. Seu uso com objetivos científicos ainda é absolutamente necessário para alcançar avanços na compreensão da biologia descobrindo-se novos medicamentos para o tratamento ou a profilaxia de enfermidades e permitindo pesquisas básicas, desenvolvimento tecnológico, ensino, produção e testes de imunobiológicos. Uma vez que ainda não há sistemas alternativos disponíveis que permitam a substituição completa dos animais, é necessário o estabelecimento de uma cultura de cuidados, consciência e responsabilidade dirigidos à melhoria e confiabilidade das descobertas científicas e ao bem-estar animal.

Os biotérios¹ são planejados de forma a atender às diretrizes de Biossegurança² e garantir as condições adequadas de trabalho com animais, suas secreções e seus tecidos, além de considerar a transmissão de zoonoses³ e os riscos inerentes aos agentes potencialmente perigosos.

A utilização de animais de laboratório permite várias abordagens experimentais que não são possíveis, ou mesmo permitidas por lei, em seres humanos. Além disso, é possível mantê-los em condições controladas (em biotérios) que permitam estudar uma doença, seu agente patogênico, os sinais clínicos e sua própria evolução. Há também algumas linhagens de animais que são geneticamente padronizadas e auxiliam a compreensão de fatores ambientais e genéticos que incidem na evolução de determinada enfermidade, sendo assim, é possível estudá-las em raças e/ou linhagens criadas para esse fim.

Animais de laboratório ou modelos biológicos são aqueles utilizados com o intuito de alcançar analogia dos resultados experimentais que seriam transferidos para os homens e outros animais. Por exemplo, em estudos pré-clínicos, uma das etapas mais importantes para a pesquisa na área da saúde. Estes animais são selecionados, criados em biotérios com adequações quanto à segurança biológica, tem seu comportamento, origem e linhagem conhecidos, recebem cuidados especiais para a manutenção de seus ambientes (alojamentos, temperatura e umidade controlados) e é ofertada nutrição adequada visando ao seu bem-estar.

¹ Biotérios: 'casa da vida'. Termo genérico que designa o local onde é criado ou mantido qualquer animal de laboratório ou modelo experimental.

² Conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem e dos animais, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados (TEIXEIRA & VALLE, 1996).

³ Zoonoses são doenças transmitidas entre animais e o homem.

Ética e bem-estar: princípios

O controle da experimentação animal é regido por legislações restritivas internacionais que impulsionam a maior conscientização dos cientistas envolvidos na manipulação e adoção de boas práticas. É consenso que, além da atualização da formação técnica, é imperioso exigir conscientização ética e imputação de responsabilidade legal na manipulação animal. Organizações de fomento para pesquisas, protocolos internacionais de produção de vacinas e medicamentos, bem como para a publicação de resultados em periódicos científicos, exigem que todos os trabalhos que se utilizem de animais sejam avaliados, monitorados e licenciados por Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs)⁴ visando ao seu bem-estar.

A Associação Mundial de Veterinária (WVA), por exemplo, sugere requisitos de bem-estar animal que deverão ser seguidos:

- Ausência de fome e sede (água e comida adequadas à espécie).
- Não podem permanecer desconfortáveis. O ambiente animal deve possuir abrigo e local para descanso.
- Prevenção e diagnóstico de enfermidades, bem como providenciar os melhores meios para evitar dor, traumatismos e injúrias.
- Os animais devem possuir liberdade para manifestarem comportamentos normais e estar em companhia de outros de sua espécie.
- Assegurar as melhores condições para que não ocorra estresse, medo e situações aflitivas.

Ressalta-se que os beneficiários de vários experimentos, vacinas e medicamentos são os próprios animais, no campo da medicina veterinária.

⁴Comissões de ética são órgãos colegiados instituídos obrigatoriamente em instituições que se utilizam de animais para fins científicos.

Em 1959, foi sustentada pelos cientistas W. M. S. Russel e R. L. Burch a ideia dos três 'Rs' (redução, refinamento e substituição - o terceiro erre 'replacement', do inglês) sendo considerados como princípios básicos no mundo científico contemporâneo para verificar os objetivos, as necessidades e a importância da utilização de animais pelos cientistas.

É fundamental ter-se a consciência de que o animal, como ser vivo, possui hábitos de vida próprios da sua espécie, apresenta memória, preserva o instinto de sobrevivência e é sensível à angústia e à dor, razões que preconizam posturas éticas tanto na criação como no desenvolvimento dos estudos experimentais.

2. Conceitos básicos

Edificação e instalações prediais

Os biotérios classificam-se basicamente em criação e experimentação. Os de criação se destinam à reprodução e/ou manutenção das diversas espécies e linhagens de animais, com o objetivo de manter o padrão genético e sanitário das colônias, através de técnicas de manejo zootécnico⁵ e procedimentos operacionais (POP). Os biotérios de experimentação são destinados à realização dos experimentos e testes com animais.

O desenvolvimento de projetos de arquitetura e o planejamento operacional de biotérios são processos criativos que devem ser cuidadosamente avaliados de acordo com as espécies animais envolvidas. Os riscos associados aos experimentos e outras particularidades para estas instalações também

⁵ Manejar: em sua forma literal, significa 'conduzir ou trabalhar com as mãos'. Na área animal, é um conjunto de técnicas de reprodução, criação e manutenção que propicie bem-estar comportamental e fisiológico e que garanta os padrões genético e sanitário.

são considerados. O projeto arquitetônico das instalações prediais, as barreiras sanitárias e as barreiras de contenção são elaborados de modo a facilitar as atividades e atender as condições ambientais próprias às espécies, minimizando ou mesmo eliminando a ocorrência de contaminações (animais, pessoal e de ambientes).

As instalações são fisicamente separadas de outras construções e planejadas visando à correta higienização e desinfecção e para facilitar a manutenção predial e de seus equipamentos. Os fluxos de processos e pessoal devem ser delineados para que não ocorra o cruzamento entre entrada e saída desses elementos, evitando a contaminação.

A arquitetura de um biotério compreende uma estrutura básica composta de salas de animais entre dois corredores. Na Figura 1, observa-se um esquema da estrutura básica de um biotério com as instalações necessárias para a criação, manutenção e experimentação de roedores e coelhos. Estas instalações também são adequadas para a manutenção de primatas não-humanos.

Figura 1 – Desenho esquemático básico de um biotério



Áreas comuns (administração e vestiários). Área de lavagem contendo depósitos, tanque de imersão, autoclaves de dupla porta, guichês de passagem. Antecâmara de acesso, corredores limpo (de distribuição) e sujo (de recolhimento) e quarentena. Salas de animais, procedimento ou laboratórios.

Algumas recomendações:

- As superfícies de pisos, paredes e tetos devem ser lisas, resistentes e impermeáveis, fáceis de lavar e desinfetar. Acessórios internos, como luminárias, dutos de ar e tubulações, são instalados de modo a evitar pontos de acúmulo de poeira. Uma pia para higiene das mãos deve estar disponível próxima da saída das salas, provida de torneira com acionamento por pedal, com o cotovelo ou automática. A exaustão do sistema de ar condicionado é diretamente para o exterior do prédio, sem recirculação dependendo do nível de biossegurança exigido.
- A quarentena possui dois objetivos: avaliar a saúde e dar condições aos animais de se recuperarem do transporte, aclimatando-se ao novo ambiente. Se possível, a quarentena deve ser isolada de outras áreas do biotério. Em primatas, a quarentena é necessariamente realizada em ambientes externos à área de criação e seus procedimentos são os mais restritos. Ainda para este animal, o local da quarentena possui áreas contíguas para apoio diagnóstico e de cuidados de manejo.
- As áreas para estocagem de rações secas, equipamentos e materiais utilizados pelos animais deverão ser arejadas, a fim de minimizar a proliferação de microrganismos e evitar outras contaminações. Um refrigerador ou uma câmara frigorífica deve estar disponível para o armazenamento de hortifrutigranjeiros.
- A área de higienização, desinfecção e esterilização é isolada e afastada das salas de animais, para não causar distúrbios a eles, uma vez que as autoclaves e os equipamentos de higienização geram níveis elevados de ruídos, umidade e calor. A ventilação deve ser suficiente para evitar o acúmulo de odores e temperaturas elevadas, e os tanques são dimensionados para a higienização e desinfecção dos diversos materiais de uso na manutenção animal. O ideal é que haja separação entre ambientes 'limpo' e 'sujo'.

- As salas de animais são construídas de forma a permitir a separação por espécie/linhagem. São isoladas dos outros ambientes e constantemente higienizadas. Só é permitido o acesso aos trabalhadores habilitados à manipulação animal. Nos biotérios de experimentação, cada pesquisa é desenvolvida em ambiente exclusivo e salas especiais devem ser preparadas para os estudos que envolvam o uso de radiações, agentes infecciosos com alto potencial de risco e substâncias tóxicas.
- A paramentação dos trabalhadores, de uso exclusivo, é obrigatória nas áreas técnicas, de forma a não carrear possíveis contaminantes. Conforme a classificação microbiológica dos animais, a higienização corporal dos trabalhadores é obrigatória no acesso e na saída da área controlada.

Barreiras sanitárias ou de contenção

As barreiras sanitárias ou de contenção compreendem as instalações prediais, os equipamentos e materiais utilizados para esterilização ou desinfecção e os procedimentos de boas práticas. Essas barreiras são determinadas em função das espécies e da quantidade de animais, tipos de materiais, fluxos de processos, manejo animal etc. Serão mais complexas quanto maior forem a exigência microbiológica e/ou os riscos biológicos associados.

O biotério deve possuir como condições mínimas:

- Sistema de ventilação apropriado assegurando a filtração do ar para evitar a contaminação de áreas contíguas.
- Possuir um programa de controle periódico de animais invasores, utilizando produtos químicos não tóxicos para vertebrados.
- Fazer uso de sistemas que impeçam o refluxo de água, gases e a penetração de insetos e outros animais.
- Higienização ambiental regularmente.

- **Materiais, equipamentos, alimentos e todos os insumos vindos do exterior podem estar contaminados e devem ser esterilizados ou desinfetados e estocados em local específico.**

As barreiras sanitárias ou de contenção impedem que partículas indesejáveis tenham acesso às áreas de criação ou de experimentação e que agentes patogênicos se dispersem no ambiente, garantindo o *status* sanitário dos animais.

Alguns equipamentos são essenciais para garantir o *status* sanitário dos animais de criação ou de experimentação:

- **Autoclave** – É o principal equipamento utilizado na esterilização de materiais e insumos, uma vez que a esterilização por calor sob pressão é um dos métodos mais seguros e confiáveis. Os materiais autoclaváveis são: gaiolas, tampas de gaiolas, frascos bebedouros, comedouros, ninhos, materiais de enriquecimento ambiental, bicos, forração de gaiolas,⁶ uniformes, fichas e rações. Em biotérios de experimentação, é recomendado que existam duas autoclaves: um para entrada de matérias e insumos e outro para descontaminação de resíduos e materiais, evitando o contrafluxo.
- **Estufa de óxido de etileno** – Equipamento utilizado para materiais que não podem ser esterilizados por calor. O gás de óxido de etileno atua oxidando as proteínas dos seres vivos presentes nos materiais, promovendo sua inativação. Os materiais normalmente processados neste equipamento são os mesmos citados para a autoclave, com exceção de rações e material de forração das gaiolas, pois concentram o gás que pode intoxicar os animais se ingerido ou inalado.

⁶ Para forração de gaiolas, são utilizados a maravalha (raspas de madeira especial), sabugo de milho etc. É também chamada de 'cama'.

• **Isoladores** – Utilizado para criar e manter animais livres de microrganismos. Os isoladores comportam várias gaiolas de pequenos animais dependendo de sua capacidade. Existe uma variedade de modelos de isoladores, como os rígidos e os flexíveis, providos de filtros de entrada e saída de ar, onde a renovação do ar é mantida através de ventilação forçada, com pressão positiva ou negativa.⁷ A introdução de insumos e materiais é feita pelo ‘porto de passagem’⁸ com auxílio do cilindro de esterilização,⁹ onde os materiais foram previamente esterilizados. A utilização de isoladores com pressão negativa, em estudos com risco biológico, confere ao pesquisador um eficiente método de segurança, além de propiciar a vantagem de ter numa mesma sala isoladores com inóculos diferentes.

• **Microisolador** – São gaiolas para pequenos animais com tampa com filtro, que isolam o ambiente interno da gaiola. São indicadas para preservar a condição microbiológica dos animais e também para evitar que aerossóis do seu interior se dispersem pelo ambiente. Há o inconveniente de uma menor troca de ar da gaiola com o ambiente, aumentando a temperatura, a umidade relativa e a concentração de gases. Todas as atividades que necessitam da abertura deste tipo de gaiola serão realizadas em cabine de contenção biológica.

• **Módulo para microisoladores** – Existem dois tipos. Um possui portas e o fluxo de ar filtrado circula por todo o ambiente interno do módulo. No outro tipo, as gaiolas contêm filtro e válvulas para conexão de ar individual e não têm porta, pois a circulação do ar é restrita ao seu interior. Esses equipamentos podem ser de pressão positiva ou negativa.

⁷ Pressão positiva ou negativa em biotérios está relacionada ao diferencial de pressão entre duas áreas ou ambientes diferentes. A movimentação de ar segue um fluxo contínuo e controlado da área de maior pressão para a de menor pressão. Isto impede que partículas em suspensão circulem ou sejam carreadas de um ambiente para outro.

⁸ Porto de passagem: abertura do isolador que, por métodos químicos, pode ser esterilizada e permitir a entrada e saída de materiais, insumos e animais.

⁹ Cilindro de esterilização: acessório utilizado em isoladores para esterilização de materiais e insumos.

São equipamentos de contenção primária¹⁰ que têm como uma das principais vantagens a contenção de aerossóis e de alérgenos no interior da gaiola. Como vantagem adicional, há o controle dos parâmetros relativos à temperatura, umidade relativa e ventilação, propiciando um ambiente favorável aos animais.

3. Biossegurança

Diferente de laboratórios, os biotérios possuem características particulares. Pelo fato de alojarem animais, há sempre riscos associados a seu manejo. Além deste, outros riscos associados aos biotérios são os riscos químicos, físicos e ergonômicos.¹¹

Os riscos químicos estão relacionados principalmente ao uso rotineiro e de grandes quantidades de desinfetantes e sanitizantes na higienização de materiais e ambientes, bem como de substâncias tóxicas ou perigosas utilizadas na experimentação animal. Já os riscos físicos envolvem o modo como os animais se defendem perante os fatores de estresse ou medo. Arranhaduras e mordeduras são as causas mais representativas de acidentes.

Os problemas de ergonomia estão associados ao levantamento de materiais e cargas de peso considerável e aos movimentos repetitivos na troca de gaiolas e de outras práticas no manejo animal.

Os animais são reservatórios naturais de várias zoonoses e podem, portanto, abrigar ou serem suscetíveis a agentes infecciosos capazes de causar doenças também nos seres humanos (riscos biológicos). Dependendo da sensibilidade individual dos trabalhadores, podem ocorrer sérios distúrbios de saúde, pois os animais produzem constantemente, através de dejetos, urina,

¹⁰ Contenção primária: é a proteção individual e do ambiente diante de um agente infeccioso. Essa contenção se efetiva pelo emprego de técnicas de manejo animal e pelo uso de equipamentos de proteção individual e/ou coletivo.

¹¹ É a ciência que estuda as relações da adequação do ambiente de trabalho ao homem. (COSTA e COSTA, 2003).

secreções e descamação da pele, substâncias causadoras de alergias (reação de hipersensibilidade).

Risco biológico e níveis de proteção

Forma de escape – O agente infeccioso pode ser expelido pelos animais por via natural ou artificial. Excreções do agente pela urina, saliva e fezes ou através de lesões na pele são exemplos. Há vários mecanismos de escape artificial, como biópsia, coleta de sangue, tecidos e fluidos corpóreos, necropsia e instrumental cirúrgico contaminado.

Transmissão – A transmissão do agente do animal ou do laboratório pode ocorrer por várias rotas. A mais frequente envolve agulhas e seringas contaminadas e a formação de aerossóis e sua fácil disseminação é uma forma comum de transmissão.

Exposição – A inalação, o contato com membranas mucosas e a inoculação parenteral são as formas de exposição mais frequentes. Os mecanismos mais comuns de exposição, quando animais de laboratório estão envolvidos, são:

- Inoculação direta por agulhas, contaminação de cortes ou arranhões preexistentes por instrumentos contaminados e agressão animal;
- Inalação de aerossóis durante o manejo animal e nos procedimentos e manipulação na experimentação animal;
- Contato das membranas mucosas dos olhos, boca ou narinas por gotículas de materiais, mãos e superfícies contaminadas;
- Pipetar com a boca, embora esta ingestão seja pouco comum, uma vez que as Boas Práticas Laboratoriais (BPL) desaprovam esta ação.

As características do animal, o agente infeccioso envolvido, o treinamento e a experiência do pessoal, as atividades e os procedimentos requeridos na experimentação devem ser considerados na avaliação e seleção das regras de biossegurança.

Os laboratórios que manipulam microrganismos patogênicos ou que tenham a possibilidade de contê-los no material de trabalho são especiais. Nesses ambientes de trabalho, há risco de se contrair doenças infecciosas tanto pelo pessoal que nele trabalhe como para os que estão próximos. A minimização ou mesmo a eliminação dos riscos se tornam possíveis quando se faz uso das BPL e empregam-se normas de biossegurança específicas ao nível do risco.

- **Contenção** – São métodos e técnicas, procedimentos e práticas, equipamentos de proteção individual e coletivo e condições de instalações laboratoriais que devem ser empregados ou é condição básica preconizada na manipulação ou estocagem de agentes infecciosos no ambiente laboratorial. A finalidade da contenção é eliminar ou reduzir a exposição do pessoal, do laboratorial e do ambiente externo ao agente de risco.
- **Contenção primária** – É a proteção individual e do laboratório diante de um agente infeccioso. Essa contenção se efetiva pelo emprego de técnicas laboratoriais e pelo uso de equipamentos de proteção individual e/ou coletivo.
- **Contenção secundária** – É a proteção das áreas externas ao laboratório de uma contaminação do agente em uso. Isso ocorre por meio de instalações, sistemas de utilidades prediais e métodos operacionais.

Recomendações de biossegurança em biotérios

O nível de biossegurança de um experimento é determinado segundo o microrganismo de maior risco. Existem quatro níveis de biossegurança, crescentes em função do grau de contenção e complexidade do nível de proteção. A seleção do nível apropriado de biossegurança para o trabalho com um determinado agente ou em experimentos com animais depende de inúmeros fatores. Alguns mais importantes são: virulência, patogenicidade,¹² estabilidade biológica, meio de propagação, natureza e função do laboratório, procedimentos e manipulações envolvendo o

¹² É a capacidade do patógeno de causar enfermidades e suas manifestações clínicas nos hospedeiros suscetíveis.

agente, endemicidade¹³ do agente e existência de vacina ou medidas terapêuticas efetivas (Tabela 1).

Tabela 1 – Recomendações de biossegurança para atividades com vertebrados

Nível	Agentes de risco	Práticas	Equipamentos (Barreiras primárias)	Instalações (Barreiras secundárias)
1	Não causa doença.	Manejo e procedimentos padrões preconizados para animais e vigilância sanitária.	Os normalmente preconizados para alojamento das espécies animais.	Biotério convencional, sem recirculação de ar, o direcionamento de ar é recomendado.
2	Associado com doença humana. Contaminação por autoinoculação, ingestão e exposição de membranas mucosas.	As práticas do nível 1 mais: acesso limitado; símbolo de risco biológico; alerta de precaução; manual de biossegurança; descontaminação de todo material infeccioso e gaiolas de animais antes da lavagem.	Os equipamentos do nível 1 mais: equipamentos de contenção apropriado por espécie; equipamentos de proteção individual (EPI); proteção facial e respiratória, se necessário.	As instalações do nível 1 mais: autoclave; pia na saída da área de animais.
3	Nativo ou exótico com potencial de risco por aerossóis; doenças que podem causar sérios efeitos à saúde.	As práticas do nível 2 mais: acesso controlado; descontaminação das roupas antes de lavar; descontaminação de gaiolas antes de remover a forração da gaiola; desinfecção de calçados.	Os equipamentos do nível 2 mais: equipamentos de manutenção e manuseio de animais; cabines classe I ou II para manipulação que possam criar aerossóis (inoculação, necropsia etc.); EPI; proteção respiratória apropriada.	As instalações do nível 2 mais: separação física entre corredores de acesso; acesso por dupla porta com fechamento automático; autoclave no biotério; janelas lacradas; aberturas seladas.
4	Agentes perigosos / exóticos que ponham em risco a vida por inexistência de tratamento; transmissão por aerossóis ou agente relacionado com riscos desconhecidos de transmissão.	As práticas do nível 3 mais: entrada com troca de roupas onde roupas pessoais são retiradas e paramentação apropriada é usada; banho na saída; todo material é descontaminado antes de removido do biotério.	Os equipamentos do nível 3 mais: equipamentos de contenção máxima (classe III) ou equipamento de contenção parcial em combinação com proteção total do corpo, suprimento de ar sob pressão, usado em todos os procedimentos e práticas.	As instalações do nível 3 mais: prédio separado ou em zona isolada; sistema de suprimento e exaustão de ar, vácuo e descontaminação exclusivos; outros requerimentos específicos.

¹³ Caráter de endêmico de uma enfermidade. Presença de uma doença ou de um patógeno em uma população ou área geográfica.

Os requerimentos de construção, os procedimentos, as práticas, os equipamentos e as precauções que devem ser consideradas na elaboração de projetos e no desenvolvimento de atividades que envolvam animais vertebrados e em função do nível de biossegurança estão descritos a seguir.

Nível de biossegurança 1

Práticas padrões

A – Acesso ao biotério é limitado ou restrito ao critério do coordenador.

B – Fazer a higienização das mãos após manusear culturas e/ou animais e após remover as luvas e antes de sair do biotério.

C – Nas áreas de animais, não é permitido comer, beber, fumar, estocar alimentos de uso humano, aplicar cosméticos e manusear lentes de contato.

D – Todos os procedimentos devem ser realizados cuidadosamente, visando a minimizar a formação de aerossóis.

E – As superfícies de trabalho devem ser descontaminadas após o uso ou imediatamente após o derrame de material viável.

F – As portas das salas de animais devem abrir para seu interior e serem de fechamento automático.

G – Todo resíduo proveniente da sala de animais deve ser apropriadamente descontaminado, preferencialmente por autoclave, antes de ser disponibilizado como lixo. Carcaças de animais são incineradas.

H – Deve haver um programa efetivo para controle de insetos e roedores.

Práticas especiais

A – O coordenador do biotério é o responsável pelo acesso limitado às áreas de animais e deve informar dos riscos potenciais a quem precisa entrar nessas áreas. Em geral, pessoas em condições que possam elevar os riscos de aquisição de infecções não devem ter acesso às áreas de animais.

B – O coordenador do biotério deve estabelecer diretrizes e procedimentos pelos quais as pessoas tomarão conhecimento dos riscos em potencial e procedimentos específicos antes de terem a liberação para o acesso às salas de animais.

C – O material utilizado para forração das gaiolas é removido de forma a minimizar a criação de aerossóis e deve ser descartado em concordância com os requerimentos apropriados (legais ou institucionais).

D – As gaiolas podem ser lavadas manualmente ou em máquinas. A temperatura final de enxágue na lavagem mecânica deve ser de 82,7°C (180°F).

E – Deve-se usar roupas apropriadas (jalecos, aventais ou uniformes) na área de animais. Recomenda-se que o uniforme de uso no biotério não deva ser usado em outras áreas.

F – Um manual de biossegurança é preparado e adotado. As pessoas são informadas dos riscos especiais e é requerido que elas leiam e sigam as instruções, práticas e/ou procedimentos.

Equipamentos de segurança (barreiras primárias)

Não são requeridos equipamentos de contenção para animais no nível 1 de biossegurança.

Instalações (barreiras secundárias)

A – O biotério deve ser projetado e construído visando a facilitar a limpeza, desinfecção e manutenção.

B – Pias para higiene das mãos devem estar disponíveis em diversas áreas do biotério.

C – No caso de existência de janelas que se abram, estas devem estar protegidas contra a penetração de insetos.

D – A exaustão de ar deve ser descarregada para o exterior do prédio, sem recircular por outros ambientes.

Nível de biossegurança 2

Práticas padrões

Todas as recomendações do nível de biossegurança 1.

Práticas especiais

Todas as recomendações do nível de biossegurança 1, acrescidas de:

A – Quando agente(s) patogênico(s) estiver (em) sendo usado(s) nas salas de animais, deve-se assegurar que todas as providências requeridas e necessidades especiais de entrada sejam efetivadas ou estejam disponíveis, tais como vacinação e EPI.

B – Um aviso com símbolo universal de biossegurança deve ser afixado no acesso da área de risco e na porta da sala de animais. O aviso de risco deve identificar o agente patogênico em uso, nome e telefone dos supervisores ou outros responsáveis e indicar os EPI requeridos para entrada na sala.

C – As pessoas devem receber imunização apropriada quando uma vacina estiver disponível.

D – Avaliações sorológicas periódicas das pessoas, considerando o agente de risco, é uma medida que deve ser adotada quando técnicas para tal estiverem disponíveis.

E – Um manual de biossegurança deve ser elaborado e adotado. Todos devem ser informados de riscos especiais e são instruídos a ler e seguir as instruções de práticas e procedimentos.

F – Todos devem receber treinamento apropriado em riscos associados com o trabalho e aprender sobre as precauções para prevenir exposições aos riscos. Devem receber, anualmente, reforço de treinamento ou treino adicional quando houver mudanças de procedimentos técnicos e operacionais.

G – Preocupação adicional deve ser observada com materiais e utensílios contaminados (agulhas, seringas, lâminas, pipetas, tubos capilares). Agulhas e seringas ou outros utensílios perfurocortantes são restritos às áreas de animais para uso somente quando não há alternativas, como inoculações parenterais, coleta de sangue ou aspiração de fluidos de animais e de frascos. Tubos plásticos devem ser usados em substituição aos de vidro, quando possível.

H – Agulhas descartáveis nunca devem ser dobradas, cortadas, quebradas, reencapadas ou removidas de seringas descartáveis ou outra forma de manipulação, com as mãos, depois de descartadas. Preferencialmente, elas devem ser cuidadosamente colocadas em um recipiente resistente a perfurações usado para materiais descartáveis. Utensílios não descartáveis são obrigatoriamente colocados em recipientes de paredes espessas para transporte à área de descontaminação.

I – Frasco de vidro quebrado não deve ser manuseado diretamente com as mãos, e sim removido mecanicamente através de

vassoura e pá de lixo ou pinças. Recipiente para agulhas, peças de equipamentos e cacos de vidro devem ser descontaminados antes de descartados.

J – Culturas, tecidos animal e fluidos corpóreos são colocados em recipiente que previna vazamento durante a coleta, o manuseio, o processamento, o estocagem, o transporte ou o envio.

K – Gaiolas são apropriadamente descontaminadas, preferencialmente por autoclave, antes da limpeza e lavagem.

L – Equipamentos e superfícies de trabalho devem ser descontaminados com desinfetante apropriado em uma rotina básica após o término do trabalho com materiais infecciosos e especialmente após o derrame, gotejamento ou outra forma de contaminação com esse material.

M – Equipamentos contaminados devem ser descontaminados de acordo com as recomendações antes de serem enviados ou disponibilizados para reparo ou manutenção ou transportados para fora das instalações.

N – Derramamentos ou acidentes que resultem em exposição ao material infeccioso são imediatamente relatados ao coordenador do laboratório. Acompanhamento médico é providenciado e os registros devem ser mantidos.

O – Animais que não estejam envolvidos no trabalho em andamento não são permitidos no biotério.

Equipamentos de segurança (barreiras primárias)

A – Cabine de Segurança Biológica (CSB) e EPI (ex.: proteção respiratória, máscaras faciais) são usados sempre que procedimentos com alto potencial de formação de aerossóis são conduzidos. Isso in-

cluiu necropsia, coleta de tecidos ou fluidos de animais, inoculação intranasal e manipulações com alta concentração ou grande volume de material infeccioso.

B – Apropriada proteção facial e respiratória é usada por todas as pessoas que entrem nas salas de primatas não-humanos.

C – Aventais, jalecos ou uniformes são usados nas áreas de animais. Essas roupas de proteção são retiradas antes de sair dessas áreas.

D – Especial cuidado deve ser tomado para evitar a contaminação da pele com materiais infecciosos. O uso de aventais com manga comprida e luvas é obrigatório quando manusear animais infectados e quando o contato de material infectado com a pele for inevitável.

Instalações (barreiras secundárias)

Todas as recomendações do nível de biossegurança 1, acrescidas de:

A – Se houver ralos, esses devem possuir tampas e serem sifonados de forma a conter sempre um volume de água e/ou solução desinfetante.

B – É recomendado, porém não exigido, que a direção do fluxo de ar seja para o interior da sala de animais.

C – Autoclave, que pode ser usada para descontaminação de resíduos e outros materiais do biotério, deve estar alocada nessa instalação.

D – A exaustão das CSBs ou de outros equipamentos de contenção é descarregada diretamente para fora da edificação.

E – Deve haver um sistema de gerador de energia elétrica para atender as áreas críticas da edificação.

Nível de Biossegurança 3

Práticas padrões

Todas as recomendações do nível de biossegurança 1.

Práticas especiais

Todas as recomendações do nível de biossegurança 2, acrescidas de:

A – É proibido o acesso de pessoas com maior propensão a riscos, incluindo-se crianças, mulheres grávidas e pessoas que são imunodeficientes ou estão imunosuprimidas. O coordenador tem a responsabilidade final para definir cada circunstância e determinar quem pode entrar ou trabalhar no biotério.

B – Todos os resíduos oriundos das salas de animais são descontaminados, preferencialmente por autoclave, antes de disponibilizados como lixo ou enviados para reprocessamento.

C – Todas as carcaças de animais são incineradas. Animais mortos são transportados da sala de animais para o incinerador em recipientes herméticos e à prova de vazamentos.

D – O trabalho sempre é realizado por pelo menos duas pessoas. Não é permitido acessar sozinho as áreas de animais.

Equipamentos de segurança (barreiras primárias)

Todas as recomendações do nível de biossegurança 2, acrescidas de:

A – EPI são usados para todas as atividades que envolvam manipulações de material infeccioso ou animais infectados.

B – Uniformes de frente fechada ou de frente sólida são usados pelas pessoas para entrar nas salas de animais. Vestimentas com botões na parte anterior são inadequadas ou impróprias. As

vestimentas devem ser acondicionadas em recipientes antes de encaminhadas para descontaminação.

C – As luvas são removidas assepticamente e autoclavadas como outros resíduos das salas de animais antes de descartados.

D – Apropriadas proteções de olhos, face e respiratória são usadas por todos que entram nas salas de primatas não-humanos.

E – Deve-se fazer uso, quando indicado, de calçados, sapatilhas ou outra proteção dos calçados. A desinfecção desses é obrigatória na saída da área de experimentação.

F – Contenção física e equipamentos apropriados para cada espécie animal são usados para todos os procedimentos e manipulações de material infeccioso e animais infectados.

G – O risco de infecção por aerossóis, provenientes dos animais ou do material usado na forração das gaiolas, pode ser reduzido ou mesmo eliminado se os animais são alojados em gaiolas com filtro (mini-isoladores), sendo a abertura das gaiolas em local de ventilação fechada (CSB).

Instalações (barreiras secundárias)

Todas as recomendações do nível de biossegurança 2, acrescidas de:

A – O biotério é construído obrigatoriamente separado de outras áreas abertas e que não tenham restrição de trânsito de pessoas.

B – Uma antecâmara com portas intertravadas é um requerimento básico antes da área de animais.

C – Separação física das salas de animais dos corredores de acesso ou de outras áreas de trabalho deve ser por dupla porta intertravada.

D – As superfícies das paredes internas, dos pisos e dos tetos devem ser resistentes à água e ao calor moderado para facilitar a limpeza.

E – As tubulações e os dutos são selados ou possíveis de serem selados para facilitar a fumigação ou descontaminação.

F – As pias devem ter torneiras de acionamento por pedal, com o cotovelo ou automática e devem ser alocadas próximas da porta de saída.

G – O processo usado para descontaminação de efluentes com risco biológico deve ser validado física e biologicamente pelo uso constante de registro de temperatura através de sensor, em conjunto com um indicador microbiológico com uma definida suscetibilidade ao calor.

H – Efluentes de banho podem ser descarregados no sistema sanitário sem tratamento.

I – Se um sistema de vácuo é usado, cada ponto de serviço deve ter sifão com líquido desinfetante e filtros Hepa.

J – Visores ou janelas nas salas de animais não podem ser de abrir e são seladas.

K – Autoclave para descontaminação de resíduos é obrigatória no biotério e deve ser de dupla porta, de forma a retirar os materiais e resíduos diretamente da área após a descontaminação.

L – O sistema de ventilação e exaustão de ar é sem recirculação. O insuflamento e a exaustão são balanceados de forma a ter um direcionamento de ar para o interior das salas de animais.

M – O sistema central de exaustão em instalações com trabalhos em CSB classe III é tratado por passagem através de filtro Hepa antes de descarregá-lo no exterior do prédio. Os filtros Hepa são localizados o mais próximo possível do ambiente, de modo a minimizar a extensão do risco potencial de contaminação do duto.

N – Deve haver um sistema de gerador de energia elétrica para atender a todo o sistema da edificação.

Nível de Biossegurança 4

Práticas padrões

Todas as recomendações do nível de biossegurança 3.

Práticas especiais

Todas as recomendações do nível de biossegurança 3, acrescidas de:

A – Somente pessoas envolvidas nos programas ou que dão suporte técnico são autorizadas a entrar nas instalações ou em uma determinada sala de animais.

B – O acesso ao biotério é limitado por segurança e portas trancadas. O acesso é controlado pelo supervisor do biotério, pela chefia da biossegurança ou por outra pessoa responsável pela segurança física do prédio.

C – Antes de permitir o acesso às áreas de experimentação, as pessoas são advertidas dos riscos em potencial e instruídas sobre como devem se proteger. Elas devem concordar e se comprometer a seguir todos os procedimentos de entrada e saída.

D – Um protocolo para situações de emergência deve ser estabelecido.

E – Avaliação sorológica periódica do pessoal, considerando o agente de risco, é uma medida que deve ser adotada quando técnicas para tal estiverem disponíveis.

F – Entrada e saída de pessoal do biotério deve ser feita somente através de troca de roupas e banho. Pessoal toma banho a cada vez que sai do biotério.

G – As roupas são removidas em área própria e depositadas em recipiente apropriado e específico. A paramentação completa inclui roupas de baixo, calça, camisa ou jaleco, calçados e luvas. Quando da saída, a paramentação é retirada no interior da área própria antes de entrar no boxe de banho. Roupas usadas são autoclavadas antes de lavadas.

H – Suprimentos e materiais que são trazidos para o interior da instalação são introduzidos por autoclave de dupla porta, câmara de fumigação ou antecâmara.

I – Deve ser estabelecido procedimento para relato de acidentes no biotério e exposições a agentes patogênicos.

J – É necessário existir, nas instalações, uma área de quarentena, isolamento e cuidados médicos para pessoa com suspeita ou com conhecida enfermidade associada ao trabalho.

K – Materiais e animais não relatados no experimento não são permitidos nas instalações.

Equipamentos de segurança (barreiras primárias)

Todas as recomendações do nível de biossegurança 3, acrescidas de:

A – Animais infectados com agentes classificados no risco 4 são alojados em gabinetes de máxima contenção em área especial em que todas as pessoas são requeridas a usar roupa com pressão positiva e sistema de suporte de oxigênio.

B – Trabalhos com vírus que requerem nível 4 de biossegurança e nos quais uma vacina de alta efetividade é existente podem ser feitos com contenção parcial e sem a roupa de ventilação de pressão positiva se as instalações são descontaminadas regularmente, se não há outro experimento em andamento que exija o

nível 4 de biossegurança, tanto de barreiras primárias como das secundárias, e se todos os procedimentos padrões e especiais são efetivamente postos em prática.

Instalações (barreiras secundárias)

Todas as recomendações do nível de biossegurança 3, acrescidas de:

A – O biotério é localizado em um prédio separado ou em zona claramente demarcada e isolada.

B – Paredes, pisos e tetos das instalações são construídos de modo a não terem superfícies que acumulem sujidades e facilitem a limpeza dessas superfícies. O acabamento dessas superfícies deve resistente a líquidos e substâncias químicas, de modo a permitir a limpeza e descontaminação.

C – Acessórios internos, como luminárias, dutos de ar e tubulações, são instalados de forma a minimizar superfícies horizontais que acumulem poeira.

D – Se há uma central de vácuo, essa não pode servir outras áreas fora dessa instalação. O sistema de vácuo possui filtro Hepa instalado o mais próximo de cada ponto de uso ou válvula de serviço. Filtros são instalados de forma a permitir, no local, sua descontaminação e substituição.

E – Outros sistemas de líquidos ou gases são protegidos para evitar o refluxo.

F – Portas externas do biotério são de fechamento automático e estanque.

G – Todas as janelas são à prova de impacto e seladas.

H – Autoclave de dupla porta é disponibilizada para descontaminação de materiais que saem do biotério. A porta da

autoclave que se abre para o exterior das áreas de animais é controlada por sistema automático, de forma que somente se abra após o ciclo de esterilização ter sido realizado.

I – Efluentes oriundos de pias, CSB e autoclave são descontaminados por calor antes de descarregados no sistema sanitário.

J – O sistema de ar condicionado é exclusivo e sem circulação de ar. O insuflamento e a exaustão são balanceados para assegurar o direcionamento do fluxo de ar da área de maior risco. O diferencial de pressão entre áreas adjacentes é monitorado e deve possuir alarme que indique falha de funcionamento do sistema.

K – Área para troca de roupa deve ser providenciada para que as pessoas que entrem nessa área usem uma roupa de pressão positiva, ventilada e que possua suporte de respiração artificial.

L – A entrada nessa área é feita por antecâmara com diferencial de pressão, com portas com fechamento estanque.

M – Um chuveiro químico é instalado para descontaminação da superfície da roupa antes da saída da área.

N – A exaustão de ar oriunda dessas áreas é filtrada por dois jogos de filtros Hepa instalados em série. Duplicação das unidades de filtração e exaustão é providenciada.

3.5. Modelo animal

A pesquisa científica é necessária para que o ciclo do conhecimento se complete e se renove. Tem o objetivo de proteger o homem e os animais de danos causados por substâncias e produtos indesejáveis ou efeitos colaterais de medicamentos e, ainda, entender e pesquisar a cura de doenças. Diversas espécies de animais são utilizadas na pesquisa biológica e médica, entre estas,

sapos, rãs, peixes, aves, roedores, coelhos, cães, gatos, primatas não-humanos e animais de fazenda.

A utilização de animais com objetivos científicos é uma prática comum, sendo absolutamente necessário o estabelecimento de uma cultura de cuidados, consciência e responsabilidades dirigida à melhoria da descoberta científica e ao bem-estar. Esses conhecimentos são de fundamental importância tanto para o estabelecimento de colônias de animais de laboratório como para a sua utilização na experimentação (Tabela 2).

Modelo animal – Animal utilizado em pesquisa biomédica.

O conhecimento da Biologia (anatomia, fisiologia, genética e aspectos etológicos) e do manejo da espécie animal possibilita a padronização e a harmonização dos ensaios, aumentando a *confiabilidade dos resultados*, garantindo, simultaneamente, o bem-estar dos animais e a alta qualidade dos dados.

Tabela 2 – Classificação taxonômica de algumas espécies de animais de laboratório

	Ordem	Família	Gênero	Espécie
Camundongo			<i>Mus</i>	<i>M. musculus</i>
Rato	<i>Rodentia</i>		<i>Rattus</i>	<i>R. norvegicus</i>
Hamster		Cricetidae	<i>Mesocricetus</i>	<i>M. auratus</i>
Cobaia		Cavidae	<i>Cavia</i>	<i>C. porcellus</i>
Coelho	<i>Lagomorfa</i>	Leporidae	<i>Oryctolagus</i>	<i>O. cuniculis</i>
Macaco Rhesus			Macaca	<i>Macaca mulatta</i>
Macaco Cynomolgus	<i>Primate</i>		Macaca	<i>Macaca fascicularis</i>
Macaco Esquilo			Saimiri	<i>Saimiri sciureus</i>
Macaco da noite		Aotidae	<i>Aotus</i>	<i>Aotus trivirgatus</i>

Manejo e características gerais dos animais de laboratório

Uma criação de animais de laboratório deve ser iniciada com animais comprovadamente puros, de *pedigree* e criteriosamente selecionados pelos valores genéticos e sanitários. Os métodos de acasalamento empregados devem ser de acordo com o comportamento social dos animais e as condutas relacionadas com a reprodução e o cuidado com os filhos.

Para se instituir o manejo adequado, é importante considerar também as instalações, o conforto físico e proporcionar um estado adequado de nutrição aos animais. Este conjunto proporciona a prevenção de fatores predisponentes às doenças e possibilita a adoção de métodos de controle.

As instalações devem ser planejadas de maneira a permitir a realização de procedimentos de higienização, desinfecção e outros que sejam necessários, bem como respeitar os aspectos etológicos. A construção deve permitir o controle da iluminação e ventilação e a manutenção de temperatura adequada, ser de material resistente e de fácil higienização.

Etológico – Estudo do comportamento animal em seu *habitat*. Constitui conjunto de comportamentos resultantes da evolução da espécie.

As gaiolas devem ser sólidas e seguras, apropriadas para a espécie alojada, livres de superfícies perfurantes ou cortantes, fáceis de serem lavadas, construídas de modo a prevenir fugas ou a entrada de animais estranhos.

Outro aspecto importante do manejo é o conforto físico para os animais, assim como para os profissionais de criação ou experimentação. Os animais alojados devem ser mantidos em ambiente seco, limpo, livre de ruído excessivo, com trocas de ar fresco e filtrado, com intensidade luminosa e ciclos de claro e escuro controlados, dentro da faixa de temperatura e umidade relativa adequada a cada espécie. No caso dos roedores, as trocas de ‘cama’ (material absorvente) podem variar de uma a três vezes por semana, depen-

dendo da necessidade, o que evita o acúmulo excessivo da amônia em decorrência da decomposição bacteriana de fezes e urina. Este gás pode provocar irritação do trato respiratório daqueles animais e mesmo dos trabalhadores.

Os animais de laboratório possuem características particulares e próprias de cada espécie. Por esse motivo, não devem ser alojadas espécies diferentes em uma mesma sala de criação ou experimentação. Da mesma forma, os profissionais, sempre que possível, deverão trabalhar exclusivamente em uma única área predeterminada. Proceder rotineiramente à inspeção dos animais e de seus alojamentos, detectando precocemente alterações que necessitem intervenção, favorece o bem-estar e o estado sanitário.

As barreiras sanitárias e o acasalamento controlado têm sido as medidas utilizadas pelos bioteristas para obter as linhagens da espécie animal com padrão sanitário e genético recomendado para pesquisa. O padrão sanitário dos animais se classifica em três grupos distintos: animais gnotobióticos, que possuem microbiota associada definida e devem ser criados em ambiente com barreiras sanitárias absolutas; animais livres de germes patogênicos específicos (*specific pathogen free* – SPF), que não apresentam microbiota capaz de determinar doença, ou seja, albergam somente microrganismos não patogênicos; e animais denominados de convencionais, que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.

Quanto ao padrão genético, são classificados em dois grandes grupos: não-consanguíneos e consanguíneos. Os animais não-consanguíneos, heterozigotos ou *outbred* são aqueles que apresentam constituição genética variada, em estado de heterozigose, o que deve ser conhecido e mantido.

Para o acasalamento monogâmico de roedores e poucas espécies de primatas, mantém-se um macho para uma fêmea, na gaiola, em caráter permanente. Tem a vantagem da fácil identificação dos filhotes e a manutenção de registro fidedigno, elevada porcentagem deaios férteis pós-partos, de filhotes desmamados (no caso dos roedores), maior controle das enfermidades, boa

seleção dos reprodutores e, no caso de roedores, é amplamente utilizado em colônias de fundação de animais consanguíneos onde se empregam acasalamento entre irmãos. As desvantagens são o aumento de mão-de-obra e a necessidade de grande número de machos reprodutores, de espaços maiores e de mais pessoal.

○ acasalamento poligâmico é um método que compreende um macho para um grupo de duas ou mais fêmeas. Esse método é mais utilizado em colônias de animais de produção de roedores e na grande maioria das espécies primatas com esta característica reprodutiva. A vantagem consiste em ter o maior número de animais produzidos em menos espaço. Tem como desvantagem a dificuldade para registro dos animais e a identificação da fêmea e do macho não fértil.

Características gerais dos roedores e coelhos

• **Camundongo** – Foi introduzido como animal de laboratório pelo fato de ser pequeno, muito prolífero, ter curto período de gestação, fácil domesticação e manutenção. Por todas essas características, tornou-se o mamífero mais utilizado na experimentação biológica. Quando as fêmeas se agrupam em grande quantidade em ausência de macho, se produz o período de anestro,¹⁴ entrando novamente em atividade três a quatro dias depois de introduzir o macho. ○ bioterista se utiliza deste conhecimento para obter várias gestações no mesmo período. Outro fenômeno de interesse na reprodução deste roedor consiste na absorção do embrião, que ocorre com maior frequência nas fêmeas consanguíneas, e está relacionado com a presença de feromônio.¹⁵ ○ camundongo adulto deve ser manipulado individualmente pela base da cauda, com polegar e indicador ou pinça anatômica, mas o peso

¹⁴ Fase de repouso do ciclo estral (cio).

¹⁵ São substâncias químicas captadas por animais de uma mesma espécie (intraespecífica), que permitem o reconhecimento mútuo e sexual dos indivíduos.

do animal deve ser apoiado na mão do profissional ou outra superfície, tão rápido quanto possível. Para contenção de camundongos, coloca-se o animal sobre uma superfície, segurando sua pele da região entre as orelhas na parte dorsal da cabeça, com os dedos polegar e indicador.

O emprego de acasalamento rotacional (método Poiley) em roedores e lagomorfos visa a manter estes animais heterozigotos, evitando-se o acasalamento de parentes próximos e assegurando que a geração seguinte descenda de um maior número de pais, ao contrário do que ocorreria se fossem acasalados ao acaso. Ao empregar esse sistema, a colônia se desenvolve em vários grupos de igual número, de modo que a quantidade de fêmeas e machos em todos os grupos é sempre igual. O número de grupos de uma colônia está diretamente relacionado ao seu tamanho (número de reprodutores). Quanto menor a colônia, maior o número de grupos.

Animais consanguíneos, homozigotos ou *inbred* são obtidos pelo acasalamento entre irmãos e/ou pais e filhos durante vinte ou mais gerações consecutivas. Utilizando esse tipo de acasalamento em colônias de roedores, consegue-se obter um índice de homozigose de 99%, o que torna os animais o mais possível idênticos. O aparecimento desses animais ocorreu no começo do século XX, com os estudos do geneticista americano Clarence C. Little sobre herança na cor da pelagem de camundongos. Após o surgimento da linhagem de camundongo denominada DBA, pesquisas em câncer geraram outras linhagens. Com o surgimento das inúmeras linhagens, alguns pesquisadores reconheceram o potencial dos híbridos F1 (produto do acasalamento entre duas linhagens consanguíneas), já que esses animais são geneticamente homogêneos e heterozigotos para aqueles pares de genes em que as linhagens parentais diferem entre si.

Nas linhagens consanguíneas, para que a homozigose seja mantida nas gerações seguintes, os reprodutores devem ser acasalados indefinidamente, entre irmãos ou pais e filhos, e essa é a razão para que as colônias das

linhagens consanguíneas tenham maior chance de fixação de mutações. Os animais mutantes resultantes desses acasalamentos foram selecionados e reacasalados com representantes da linhagem parental ou de outras linhagens, constituindo, assim, as linhagens congênicas.

Os animais transgênicos são aqueles em que o genoma foi modificado pela introdução de sequências de DNA de outro organismo. Nos animais *knockout*, a modificação genética introduzida é capaz de interromper ou anular um gene, que deixa de ser expresso.

No anexo 1 são demonstradas a contenção de camundongo (Figs 1, 2 e 3) e a técnica de eutanásia por deslocamento cervical (Fig 4).

- **Rato** – Criado atualmente na maioria dos biotérios, é semelhante aos outros animais monogástricos, exceto pelo fato de não possuir vesícula biliar e de seu pâncreas ser difuso. Ratos são dóceis e fáceis de manusear: uma compressão firme e suave ao redor da cavidade torácica restringe os seus movimentos sem trazer sensação de desconforto. A contenção também pode ser feita colocando o polegar e o indicador ao redor da nuca e, com a palma da mão sobre o dorso, use os dedos para ajudar a manter a posição quando o animal se movimentar.

Tão logo a fêmea é coberta, forma-se um tampão na vagina, que é expelido nas 24 horas pós-cobertura. Este fato é observado também em outros membros da família dos roedores. O tampão pode ser notado facilmente entre as fezes, na forma de um cilindro branco seroso e sua observação indica que houve cobertura do macho.

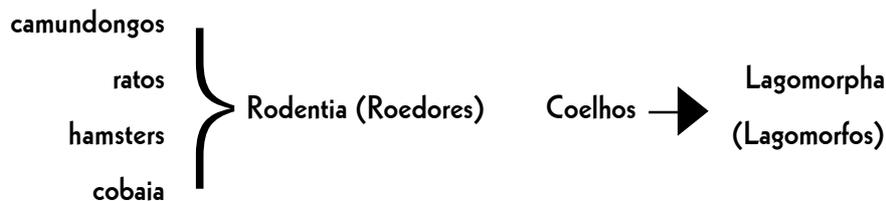
- **Hamster** – Em condições naturais, o *hamster* sírio é uma espécie sazonal que entra em hibernação durante os períodos de dias curtos com baixa luminosidade, baixas temperaturas (inferiores a 5°C) e escassa disponibilidade de recursos alimentares e de material para construção de ninho. No biotério, o controle ambiental com temperatura constante da ordem de 21 a 22°C e 12

horas de claridade por dia evita a manifestação de sazonalidade, inclusive na esfera reprodutiva. Foi amplamente demonstrado o efeito das condições de alojamento sobre o crescimento, o peso e a composição corporal de *hamsters*. O alojamento em grupo acelera o crescimento e a deposição de gordura, induzindo à obesidade, especialmente nas fêmeas, porém sem ocorrência de hiperfagia.¹⁶

• **Cobaia** – São animais sociais, tímidos, dóceis e raramente mordem ou arranham. Assustam-se facilmente, defecam e urinam nos comedouros e derramam sua alimentação pelo piso da gaiola. Gritam de prazer antes de situações gratificantes (alimentação) e ficam muito juntos ou em cima uns dos outros durante o manejo da colônia pelo técnico. Os animais adultos, frequentemente, mordem as orelhas dos jovens e os machos podem brigar violentamente, principalmente durante disputas por uma fêmea em estro, até que se estabeleça a hierarquia do grupo. Outra característica marcante das cobaias é a sua extrema suscetibilidade a estímulos estressantes, principalmente a alterações ambientais. Simples modificações na ração, no comedouro, na água e no bebedouro podem levar os animais a recusar o alimento. Além disso, estímulos como barulho intenso ou movimentos bruscos os assustam, fazendo com que passem a correr de um lado para o outro, provocando ferimentos. Ocasionalmente, durante a contenção para a troca de gaiolas, podemos observar a paralisação do animal por vários minutos e até mesmo a morte. Isso implica dizer que o trabalho com esta espécie deve ser realizado com muito cuidado, principalmente no que se refere às fêmeas grávidas ou com filhotes recém-nascidos, que podem ser pisoteados pelos outros animais do grupo. O método mais seguro para conter uma cobaia é colocar uma mão sob o tórax e, com a outra, apoiar a parte posterior, para suportar o peso do animal, permitindo que ele fique 'sentado' sobre a palma da mão. Deve-se evitar comprimir o tórax pela sua fragilidade.

¹⁶ Alimentação em excesso.

Figura 2 – Ordem de alguns animais de laboratório



• **Coelho** – De uma maneira geral, é dócil, podendo morder ou arranhar em razão da contenção incorreta. Suscetível ao estresse, assusta-se facilmente. Não se deve manter machos adultos em uma mesma gaiola para evitar brigas (disputa de território). As fêmeas também não devem ser mantidas na mesma gaiola porque podem apresentar pseudogestação.¹⁷ Para o acasalamento, a coelha deve ser levada à gaiola do macho para facilitar a cobertura, pois, caso contrário, o macho fora do seu território passará a examinar o novo local, deixando de fazer a mesma. Uma vez introduzida a fêmea na gaiola do macho, deverá ocorrer a cobertura após alguns minutos. É conveniente que o técnico assista e constate a cobertura, observando o comportamento do macho (que se deixa cair de costas emitindo ruídos guturais) e/ou, por meio de um simples exame da vagina, observa-se a presença de líquido seminal. Após a cobertura, a fêmea deve retornar a sua gaiola de origem. Esses animais são mais sensíveis ao calor do que ao frio. A temperatura recomendável varia de 17°C a 21°C e a umidade relativa, de 40% a 60%. A forma mais segura de conter um coelho é pegando-se com uma das mãos a pele do pescoço e com outra as patas traseiras, segurando-o junto ao corpo. Para grandes trajetos, coloca-se o animal sobre o antebraço com a cabeça dirigida para o corpo, segurando firmemente as patas traseiras. Nunca se deve levantar um coelho pelas patas ou pelas orelhas, pois há a propensão a lesões de coluna vertebral e fraturas.

¹⁷ Gestação psicológica.

Tabela 3 – Parâmetros importantes de algumas espécies

	Camundongo	Rato	Hamster	Cobaia	Coelho
Peso macho adulto	25-30 g	300-400 g	95-120 g	400-500 g	4-5 kg
Peso fêmea adulta	25-30 g	250-300 g	95-120 g	300-400 g	4-5 kg
Peso ao nascer	1-1,5 g	5-6 g	5 g	70-100 g	70-80 g
Maturidade sexual do macho	40-50 dias	60-80 dias	60-70 dias	70-80 dias	5-6 meses
Maturidade sexual da fêmea	40-50 dias	60-80 dias	60-70 dias	70-80 dias	5-6 meses
Ciclo estral	4-5 dias	4-5 dias	4-5 dias	16 dias	irregular
Gestação	19-21 dias	21-22 dias	16-19 dias	59-72 dias	30-31 dias
Desmame	19-21 dias	21-22 dias	21 dias	15-21 dias	42 dias
Tamanho da ninhada	1-22	8-10	4-12	1-6	6-8
Cobertura pós-parto	imediate	imediate	4 dias	imediate	14-28 dias
Vida reprodutiva do macho	1 ano	1 ano	1 ano	2-3 anos	2-3 anos
Vida reprodutiva da fêmea	1 ano	1 ano	1 ano	2-3 anos	2-3 anos
Consumo diário de ração	4-5 g	15-20 g	7-9 g	35 g	100-150 g
Consumo de água	<i>Ad libitum</i>				

Primates não-humanos

A distribuição geográfica silvestre de origem deste modelo está atualmente restrita aos continentes centro sul-americano, africano e asiático. O Brasil é o país com a maior diversidade desta ordem zoológica, a mesma que o homem.

Muitas espécies de primatas¹⁸ são utilizadas há muitos anos como modelos para as pesquisas biomédica e farmacêutica e, por esta razão, várias instituições desenvolvem colônias para sua criação. São reagentes biológicos de importância vital para testes e experimentos que requeiram respostas precisas, análogas e confiáveis, quando nenhum outro animal pode substituí-lo por sua precisão em resultados compatíveis às respostas humanas.

¹⁸ Primatas não-humanos (Filo *Chordata* subfilo *Vertebrata*, superclasse *Tetrapoda*, classe *Eutheria*, ordem *Primate*). Macacos, símios: nome comum a todos os mamíferos da ordem dos primatas, com exceção do homem.

A espécie de primata deverá ser escolhida criteriosamente conforme a proposta de sua utilização, como, por exemplo, modelos reconhecidamente compatíveis para enfermidades tropicais, que são macacos originários do neotrópico – do Brasil e de outros países da América do Sul e América Central (neotropicais) – como o macaco-de-cheiro (*Saimiri* sp.), mico comum (*Callithrix* sp.), sagui (*Saguinus* sp.) e macaco-prego (*Cebus* sp.). Os primatas asiáticos (Velho Mundo¹⁹) são utilizados em várias investigações, entretanto, são animais com alto custo para sua manutenção e com maior dificuldade de obtenção, destacando-se, entre eles, os do gênero *Macaca*.²⁰

Os primatas não-humanos pertencem à ordem mais elevada dos mamíferos. A maioria é gregária em seu ambiente natural, vivendo em grupos sociais sob a proteção de um macho alfa. É um animal buliçoso, inquieto, observador e repetidor de atitudes humanas. Por este motivo, os profissionais que trabalham em biotérios deverão ter atitudes conscientes no trato diário, para que não transmitam ensinamentos prejudiciais ao comportamento habitual da espécie.

Ressalta-se como característica e diferenciação entre espécies e sua hierarquia na classificação taxonômica a existência ou não de cauda (mais próximas ao homem). Em algumas delas, é utilizada como um quinto membro (quando prensil), um recurso em seus deslocamentos e para sua proteção contra predadores naturais.

¹⁹ Primatas do Velho Mundo (infraordem *Catarrhini*) são os macacos originários do continente africano e asiático. Possuem a membrana internasal (septo nasal) estreita. Os primatas neotropicais (infraordem *Platyrrhines*), ao contrário, possuem narinas bem separadas. Estes últimos são de porte menor, sendo exclusivamente arborícolas (poucos descem ao solo em busca de água ou alimento), distinguindo-se também das espécies do Velho Mundo pela dentição de 32 ou 36 dentes, por polegar não completamente oponível e pelas ausências de calos ciáticos e de bolsas jugais.

²⁰ Algumas espécies deste gênero são modelos biológicos para várias pesquisas, entre elas os macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) e *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*).

No planejamento de instalações para a criação ou experimentação, além das medidas de biossegurança e bem-estar, deve-se levar em conta suas características físicas e comportamentais (sociais, reprodutivas, entre outras). Cada espécie tem características próprias (algumas possuem hábitos diurnos e outra espécie é noturna), grandes diferenciações e comportamento peculiares. A complexidade de seus alojamentos visando ao seu bem-estar deve levar em conta sua biologia e a boa utilização do espaço pelo animal. Conforme é demonstrado na Tabela 4, alguns vivem em grandes grupos familiares hierarquicamente constituídos – sistema poligâmico (um macho dominante ou alfa acasala com várias fêmeas). Outros vivem em famílias menores – sistema monogâmico (um casal e seus filhotes). Umhas espécies alimentam-se preferencialmente de vegetais, outras são onívoras²¹ (deve-se observar, também, que as necessidades nutricionais variam conforme a época do ano e a idade reprodutiva).

Grande parte das criações de primatas é realizada em ambientes com grandes espaços para os animais – gaiolas coletivas, pois se pressupõem que maiores áreas são favoráveis a seu bem-estar, e melhor tolerância destes com o trabalhador. Estas gaiolas são propícias para a convivência de famílias com indivíduos hierarquicamente organizados por eles mesmos, em sistema de poligamia, onde o macho adulto dominante²² convive com seu grupo de fêmeas adultas e em idade reprodutiva e seus filhotes (que devem permanecer com seus pais até atingirem a puberdade).²³ Vale ressaltar que estes ambientes devem possuir locais contíguos específicos para permitir o descanso e a privacidade dos indivíduos dos grupos e que se destina também como área de contenção e captura de todos ou de indivíduos isoladamente.

A higienização das gaiolas coletivas é realizada com máquina de lavagem sob pressão de forma a recolher os resíduos líquidos e sólidos do local, o que

²¹ São os que se alimentam tanto de produtos de origem animal como vegetal.

²² Macho dominante ou alfa: único líder e reprodutor do grupo social e de sua gaiola ou recinto.

²³ Sempre que possível, os filhotes devem permanecer com seus pais durante os primeiros anos de vida e que sejam naturalmente desmamados por sua mãe, para favorecer a aprendizagem social e reprodutiva. Este período é muito importante, pois comprovou-se que os animais que passaram por esse aprendizado demonstram maior sucesso na criação futura de seus próprios filhotes.

se constitui em risco à saúde dos trabalhadores pelo carreamento destes aerossóis. Eles deverão, portanto, estar corretamente paramentados com os equipamentos de segurança individual.

As mesmas especificidades dos outros modelos anteriormente descritos, como controle de umidade, ventilação, luminosidade, tratamento de efluentes e barreiras que impeçam a circulação de animais invasores e deletérios, devem ser atendidas. Destaca-se também que a criação deste modelo requer muitas vezes áreas grandes e abertas em ambiente seminatural (locais com vegetação circundante, com o intuito de propiciar bem-estar visual e térmico), onde são construídos seus recintos, de forma a propiciar segurança ao meio externo e à comunidade circundante e também adotar medidas para impedir que animais sinantrópicos²⁴ circulem nestes ambientes.

Como nos outros modelos, o manejo²⁵ de primatas em criação e experimentação e o monitoramento de sua saúde são de importância primordial para evitar a possibilidade de enfermidades previsíveis, bem como sua reprodução seja controlada de forma a não permitir acasalamentos consanguíneos estreitos entre o grupo ou as famílias da colônia.

De acordo com a biologia da espécie de primatas, as gaiolas podem ser coletivas ou individuais,²⁶ com espaço adequado, equipamentos e materiais necessários a sua criação ou manutenção em biotérios. Seja qual for a forma e a necessidade do cativeiro, estabelece-se um programa de interação positiva

²⁴ São aqueles que se adaptaram a viver junto ao homem e, em alguns casos, podem transmitir agravos a sua saúde e de outros animais, como, por exemplo, roedores domésticos, aves, etc.

²⁵ Manejar significa, em sua forma literal, 'conduzir com as mãos'. Na área animal, é um conjunto de técnicas corretas, desenvolvidas com o intuito de reproduzir, criar, manter animais de forma segura e propiciar bem-estar fisiológico, comportamental e produtivo a estes.

²⁶ Nas gaiolas coletivas, algumas vezes o trabalhador, ao capturar um indivíduo específico neste tipo de recintos de criação, necessita utilizar puçás — redes de malha em forma de coador — para primatas de pequeno e médio porte. Recomenda-se que este material seja confeccionado com malhas e bocal adequados para cada espécie, idade e/ou peso, para a segurança do animal e do trabalhador. Em gaiolas individuais, a atividade de captura é realizada com maior facilidade, pois estas possuem uma de suas paredes com mobilidade que, quando acionada, conterá o animal contra a parede fixa. A partir deste momento, com o animal fisicamente contido, realiza-se a administração de imobilizante químico para sua retirada deste local com maior segurança.

fornecendo 'brinquedos', ninhos, poleiros e alimentos diversificados, enriquecendo estes ambientes e proporcionando o bem-estar de seus integrantes.²⁷

Em face da biossegurança, como já foi destacado, todos estes locais deverão atender a requisitos bem definidos, pois são locais de possíveis riscos biológicos diretos ao trabalhador, o que é imperioso para esta espécie animal, devido exatamente a sua semelhança com o homem, transformando-a em um maior risco de transmissão de zoonoses, algumas vezes fatais. A contenção de primatas em cativeiro configura-se como o momento mais delicado do manejo, estressante para os animais e de grande risco para o trabalhador, devendo ser executada pelos membros da equipe com maior experiência.

Tabela 4 – Características sociais e reprodutivas de alguns primatas não-humanos

Espécie animal	Característica reprodutiva	Gestação	Alimentação		Filhotes por gestação	Hábitos
			Vida livre	Em cativeiro		
<i>Rhesus</i> (<i>Macaca mulatta</i>)	Poligâmico	146 a 180 dias	Onívoros	Ração industrializada e suplementação de hortifrutigranjeiro	1	Diurno
<i>Cynomolgus</i> (<i>Macaca fascicularis</i>)	Poligâmico	155 a 165 dias	Onívoros	Ração industrializada e suplementação de hortifrutigranjeiro	1	Diurno
Macaco esquilo (<i>Saimiri</i> sp)	Poligâmico	150 a 172 dias	Onívoros	Ração industrializada e suplementação de hortifrutigranjeiro Fornecimento de larvas <i>Tenebrio molitor</i> *	1	Diurno
Mico comum (<i>Calithrix</i> sp)	Monogâmico	130 a 145 dias	Onívoros	Hortifrutigranjeiro Fornecimento de larvas <i>Tenebrio molitor</i>	1-3	Diurno
Macaco da noite (<i>Aotus</i> sp)	Monogâmico	120 a 130 dias	Onívoros	Ração industrializada e suplementação de Hortifrutigranjeiro Fornecimento de larvas <i>Tenebrio molitor</i>	1	Noturno

*Em alguns biotérios de primatas, são criadas para suplementação nutricional larvas de *Tenebrio molitor*.

²⁷ Técnicas de enriquecimento ambiental: permitem a interação social e/ou o interesse individual proporcionando quebra na rotina do cativeiro, mantendo-os em permanentes atividades físicas e lúdicas com aqueles ambientes.

Macroambiente²⁸ e microambiente

O alojamento e a manutenção das condições ambientais apropriadas são essenciais para o bem-estar animal. Um ambiente adequado propicia que os animais cresçam, reproduzam-se, mantenham um bom estado de saúde, tenham conforto e bem-estar, não podendo ser, portanto, um fator que afete o resultado das pesquisas. Essas condições refletem nos resultados e na qualidade final das pesquisas.

Microambiente

O microambiente para o animal é o ambiente físico com o qual mantém contato direto, por exemplo, a gaiola. Proporciona as condições e o espaço suficiente para as necessidades comportamentais, fisiológicas, manutenção da temperatura corporal, movimentação e postura normal da espécie animal, além de permitir acesso facilitado à água e à alimentação sólida. Construído de forma que não machuque os animais e, em caso de biotérios de criação, deve também ser adequado às necessidades reprodutivas. As gaiolas são construídas com materiais não tóxicos, que atendam as necessidades dos animais, mas que também propiciem uma fácil higienização, desinfecção e/ou esterilização. Devem ser impermeáveis com superfícies sem ângulos fechados, sem cantos vivos ou bordas que possam acumular sujidades e dejetos.

Dimensões de gaiolas e espaço recomendados

A necessidade de espaço para um animal é complexa e não se pode considerar somente o seu peso corporal *versus* a superfície de área. As dimensões da gaiola devem levar em consideração as necessidades individuais, situações particulares e condições fisiológicas dos animais. Desde que a *performance* animal associada à saúde, à reprodução, ao crescimento, ao bem-estar e à

²⁸ É constituído pelas condições do ambiente onde estão as gaiolas dos animais.

atividade normal esteja atendida no espaço disponível, pode-se considerar um alojamento adequado (Tabela 5)

Tabela 5 – Dimensões mínimas e altura das gaiolas segundo a espécie animal e o peso corporal

ANIMAL	PESO (g)	ÁREA DE PISO (cm ²)	ALTURA (cm)
Camundongo	< 10	38,7	12,7
	Até 15	51,6	12,7
	Até 25	77,4	12,7
	> 25*	≥ 96,8	12,7
Rato	< 100	109,7	17,8
	Até 200	148,4	17,8
	Até 300	187,1	17,8
	Até 400	258	17,8
	Até 500	387	17,8
	> 500*	≥ 451,5	17,8
<i>Hamster</i>	< 60	64,5	15,2
	Até 80	83,9	15,2
	Até 100	103,2	15,2
	> 100*	≥ 122,6	15,2
Cobaia	≤ 350	387	17,8
	> 350	≥ 651,5	17,8
Coelho	< 2.000	1,35	35,6
	Até 4.000	2,7	35,6
	Até 5.400	≥ 3,6	35,6
Primatas não-humanos	< 1.000	150	50,8
	1.000-3.000	280	76,2
	3.000-10.000	400	76,2
	10.000-15.000	560	81,28
	15.000-25.000	740	91,44

* Animais maiores requerem mais espaço

Fontes: NRC (2003); Kelly e Hall (1995).

Alimentação

As rações peletizadas são as mais utilizadas para alimentação de animais de laboratório, que devem ser palatáveis, balanceadas nutricionalmente e sem contaminantes químicos e microbiológicos. Algumas delas são autoclaváveis e, por esta razão, têm seus níveis de nutrientes aumentados, pois durante o processo de esterilização pelo calor há perdas de vitaminas, proteínas e outros elementos nutricionais. Outro método de esterilização de rações para uso em biotérios é a irradiação, que não provoca perdas nutricionais como na autoclavação.

Animais gnotobióticos e SPF, por possuírem uma microbiota diferenciada ou ausente, podem ter dificuldades na síntese de vitaminas. As vitaminas do complexo B e a vitamina K são suplementadas à dieta para garantir os níveis mínimos necessários à nutrição do animal. Primatas não-humanos e cobaias não sintetizam a vitamina C, que precisa ser disponibilizada de forma artificial em sua dieta diária. Animais que não tenham acesso à luz solar natural precisam receber também um suplemento de vitamina D3.

Água potável deve estar sempre disponível e sua análise quanto à qualidade microbiológica e aos contaminantes químicos precisa ser efetuada periodicamente. O método de seu tratamento é definido em função do experimento, pois a acidificação ou cloração podem causar alterações fisiológicas ou da microbiota do animal, interferindo em seu bem-estar e nas condições de saúde. A filtração e a esterilização por autoclave são os métodos mais empregados em biotérios e os frascos bebedouros devem ser substituídos, pelo menos, uma vez por semana, para minimizar a proliferação de microrganismos.

Forração das gaiolas

A forração das gaiolas tem por objetivo manter os animais secos e limpos e proporcionar um ambiente confortável. O material mais comumente utilizado para a forração das gaiolas é a maravalha de madeira. A madeira utilizada para a produção de maravalha

deve ser seca, isenta de contaminantes químicos, e sua produção e seu armazenamento devem ser feitos de forma a minimizar o acesso de roedores, insetos e outros animais que possam contaminá-la. As madeiras 'verdes' possuem fortes aromas que podem afetar os animais e até intoxicá-los. A esterilização por autoclave reduz a concentração desses aromas e previne esse problema, principalmente se a madeira já os possui em níveis baixos.

Temperatura

Embora a maioria dos animais de laboratório tolere a mesma faixa de temperatura do homem, a temperatura de salas de manutenção em biotérios deve ser mantida para atender as condições ideais da espécie. Amplas variações de temperatura são mais prejudiciais que uma temperatura constante próxima a um dos extremos da faixa de tolerância. Os animais de laboratório, em sua maioria homeotérmicos,²⁹ tentam manter a temperatura corporal constante. A mudança na temperatura ambiental resultará em alterações compensatórias que afetarão o padrão metabólico, a circulação, a atividade e o comportamento. Deve ser lembrado que a temperatura no interior das gaiolas, normalmente, é superior em alguns graus à do ambiente externo e varia em função das dimensões da gaiola e do número de animais alojados.

Ventilação

Os animais estão constantemente perdendo calor, umidade, dióxido de carbono, entre outros produtos metabólicos, que irão se acumular no ambiente caso a sala não possua ventilação adequada. As trocas de ar têm por propósito suprir o ambiente de oxigênio, remover o calor produzido pelos animais, lâmpadas e equipamentos e diluir gases e partículas em suspensão. O ambiente, para a maioria dos animais, requer de 15 a vinte trocas de ar (volume do

²⁹ Animais homeotérmicos ou de 'sangue quente'. É a característica de alguns animais que lhes permite manter sua temperatura corporal relativamente constante à causa de uma alta taxa metabólica gerada pela intensa queima de energia nas células.

ambiente por hora), visando a eliminar odores e gases e auxiliando a manter a temperatura e umidade. Se a troca de ar é insuficiente, a densidade animal na sala deve ser reduzida e as gaiolas limpas com maior frequência. Porém, essa deve ser uma solução provisória.

Umidade relativa (UR)

A maioria dos animais de laboratório compensa o excesso de calor através do aumento do ritmo respiratório. Contudo, se o ar inspirado possui alto índice de umidade, afetará a capacidade de o animal ajustar sua temperatura corporal. A umidade relativa de 55 +/-5% é recomendada para a grande maioria dos animais e a tolerância está na faixa de 30 a 70% UR. A umidade relativa no interior das gaiolas é em torno de 10% maior que no ambiente. Flutuações e extremos na UR podem propiciar o aparecimento de doenças, principalmente respiratórias, bem como alterações no consumo de ração e água. A umidade relativa é a maior responsável pela rapidez de evaporação de gotículas e sua dispersão, e estas gotículas em suspensão influenciam na sobrevivência de microrganismos.

Luz

A regularidade do fotoperíodo³⁰ é importante para a manutenção da normalidade comportamental dos animais (por exemplo, sincronização do ciclo circadiano,³¹ ciclos reprodutivos, efetividade de drogas). Variações no fotoperíodo (claro/escuro), em função da duração dos dias ou das estações

³⁰ Fotoperíodo representa o comprimento de um dia e consiste na duração do período de luz de um determinado ambiente.

³¹ Ciclo circadiano ou ritmo circadiano. Designa o período de aproximadamente 24 horas sobre o qual se baseia todo o ciclo biológico dos animais e de qualquer outro ser vivo, que são influenciados pela luminosidade (fotoperíodo ou luz solar).

do ano, influenciam o comportamento reprodutivo, o tempo de duração do parto e os hábitos comportamentais. Animais mantidos em ambiente com iluminação artificial requerem controle automático do fotoperíodo. É recomendado 12 horas de luz e 12 horas de escuridão ou 10 horas de luz e 14 horas de escuridão. A luminosidade deve possuir característica mais próxima possível da luz natural, propiciar boa visibilidade e ser uniforme. Ressalta-se que várias espécies de animais de laboratório, como os camundongos, ratos, *hamsters* e o macaco da noite têm hábitos noturnos.

Ruído

As instalações devem ser planejadas visando a evitar a propagação de sons naturais, pois podem causar distúrbios por estresse. Sons de alta intensidade ou súbitos são mais prejudiciais que os habituais e rotineiros. De alta significância são os ruídos ultrassônicos, que os humanos não percebem, porém são escutados por várias espécies animais (camundongos e morcegos).

Controle da qualidade animal

Um laboratório de controle de qualidade animal tem como objetivo definir padrões e garantir a qualidade de animais mantidos e criados em biotérios. A saúde e o bem estar dos animais, assim como a classificação de seus padrões, são obtidos através de um programa de monitoramento de rotina e práticas sanitárias rigorosas. O controle sanitário e genético só será eficaz caso o biotério utilize técnicas de criação e manutenção, mantendo os animais livres de patógenos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) e geneticamente estáveis.³² Os métodos utilizados para certificar a qualidade sanitária de uma colônia podem incluir o monitoramento sanitário de rotina e a checagem ocasional ou o levantamento microbiológico.

³² Padrão genético que caracteriza a linhagem.

- **Monitoramento sanitário** – Realização de testes de análises laboratoriais: bacteriológicas, parasitológicas, virológicas, micológicas e anatomopatológicas. Estas análises devem ser realizadas pelo menos trimestralmente, tendo como principal objetivo evidenciar a presença de agentes patogênicos em determinada colônia.
- **Checagem ocasional** – Pode ser realizada apenas quando identificarmos algum achado clínico. São feitos testes específicos para determinado patógeno de acordo com as suspeitas clínicas.
- **Levantamento microbiológico** – Testes para a obtenção de informações referentes à prevalência da infecção entre os animais. Os resultados refletem o estado sanitário da colônia em determinado período, ou seja, apenas no momento em que foram realizados.

O monitoramento sanitário animal deve ser elaborado através de um programa de diagnóstico que tem como principais objetivos:

- Monitorar as condições de saúde dos animais que tenham sido inseridos nas instalações.
- Monitorar possíveis surtos epidêmicos nas colônias.
- Determinar parâmetros fisiológicos e epidemiológicos de espécies animais e linhagens específicas.
- Diferenciar novas mutações.
- Identificar possíveis zoonoses.

Para a implantação deste programa de controle da qualidade, o primeiro passo é selecionar os patógenos (tabela 7 e 8) que serão pesquisados, levando em consideração fatores como limitações das instalações, prevalência das doenças, potencial patogênico e confiabilidade dos métodos de diagnósticos aplicados.

O ideal é a pesquisa de todos os agentes primários, porém, algumas instituições realizam o monitoramento apenas de alguns agentes considerados relevantes de acordo com suas instalações e outras pesquisam, além dos agentes primários, os agentes oportunistas. Consideráveis prejuízos nas pesquisas podem ser causados por microrganismos oportunistas, sendo estes manifestados apenas em determinadas condições, como estresse animal, uso de linhagens suscetíveis, coinfeções, entre outras.

Agentes primários – São parasitas, bactérias, vírus ou fungos que têm um potencial significativo para causar doenças. Estes patógenos podem acarretar grandes interferências em pesquisas. Exemplos de agentes primários: vírus da hepatite de camundongos, vírus Sendai, coronavírus, vírus Kilham, vírus da coriomeningite linfocítica, *Salmonella* sp. e *Citrobacter freundii*.

Agentes oportunistas – São normalmente bactérias e fungos comuns em animais de laboratório ou em seres humanos. Possuem baixa probabilidade de causar doenças clínicas, porém elevado potencial de latência. Exemplos de agentes oportunistas incluem *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.

Outra etapa importante para a implantação do controle é o cálculo da amostragem que será submetida à avaliação no laboratório. O tamanho desta amostragem poderá ser calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$n = \log 0,05 / \log N$$

n = número de amostras, N = % de animais não infectados na prole e $\log 0,05$ = 95% nível de confiabilidade dos testes.

Em média, as doenças de animais criados em biotérios possuem uma morbidade mínima em torno de 30 a 35%.

O uso desta fórmula impõe uma série de pressupostos:

- A população estudada deve possuir no mínimo cem animais em suas colônias.
- A escolha dos animais que serão submetidos ao monitoramento deverá ser aleatória, sem predileção por sexo ou outros fatores, para que não influencie o resultado final dentro do grupo.
- A percentagem de animais infectados (morbidade) por determinado microrganismo deve ser conhecida.

A maioria das doenças virais em uma população fechada trará morbidade de pelo menos 30 a 35%. Por exemplo, se determinado vírus tem 80% de prevalência de infecção em colônias de camundongos, precisaremos de apenas três animais para realizar o diagnóstico da ocorrência do vírus na colônia (Tabela 6).

Tabela 6 – Tamanho mínimo da amostra para detecção de uma infecção em determinada colônia com no mínimo cem animais

Incidência da infecção população (%)	Amostra (quantitativo)*
90	2
80	3
70	4
60	5
50	7
40	9
30	13
20	21
10	44

* Limite de confiança de 99% ($\alpha=0,01$).

Para minimizar erros diagnósticos, o ideal seria utilizar uma amostragem em torno de dez a doze animais de cada sala de criação de colônias, tanto de fundação como de criação, com intervalos trimestrais ou semestrais, dependendo da espécie animal ou do agente etiológico. Existe a possibilidade de utilização dos chamados 'animais sentinelas': animais imunocompetentes que devem ser introduzidos na colônia e mantidos para o monitoramento por no mínimo quatro semanas.

Controle virológico

Um programa de boas práticas laboratoriais, integrado a um sistema de garantia de qualidade, deve complementar o uso de metodologias adequadas para o monitoramento virológico de colônias. Estas metodologias podem ser classificadas em:

- **Metodologias diretas** – Quando se realiza a pesquisa a partir do material clínico colhido de produtos antigênicos ou de partículas virais propriamente ditas. Ex.: microscopia eletrônica, imunohistoquímica, imunoensaioenzimático para pesquisa de antígenos virais e imunofluorescência direta.
- **Metodologias indiretas** – São aquelas onde pesquisamos anticorpos contra determinados vírus. Entre os métodos de escolha estão os testes sorológicos. Existem diversas metodologias para realização desta pesquisa, dentre elas: testes imunoensaioenzimáticos (Elisa – *enzima linked immunosorbent assay*), testes de imunofluorescência indireta (IFI – *indirect immunofluorescence*), testes de inibição da hemaglutinação (IH), *immunoblot*³³ (*Western Blot*) e, reação da cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*).

Um resultado positivo automaticamente requer um curso de ação para confirmar a presença do agente através de testes confirmatórios, com o aumen-

³³ O termo 'imuno' refere-se à natureza da reação de detecção (anticorpo-antígeno) e o termo 'blot', ao sistema utilizado para imobilizar o antígeno (*blot*, do inglês: impressão, borrão).

to da amostragem ou repetição dos testes. É importante salientar que o agente etiológico pode ter sido introduzido na colônia muito antes dos sinais clínicos ou da morte de algum animal. Diante deste fato, podemos concluir que a aplicabilidade da avaliação diagnóstica contínua é de extrema importância.

Tabela 7 – Principais vírus que afetam animais de laboratório

Agente etiológico	Espécie afetada	Sinais clínicos	Transmissão	Período de incubação	Observações
Vírus Sendai Família Paramyxoviridae	<i>Hamster</i> , camundongos e ratos	Acomete o trato respiratório. Disseminação é rápida. Dispneia e estertores, perda de peso, redução no tamanho da prole, gestações prolongadas, alta mortalidade em recém-nascidos e em filhotes até o desmame.	A sua transmissão ocorre por aerossóis ³⁴ e por contato direto.	7 a 14 dias	Parainfluenza I
Vírus da Hepatite de Camundongos (MHV) Família Coronaviridae gênero Coronavírus	Camundongos	Na maioria dos casos é assintomática. Urina com coloração amarronzada, manchas na região perianal, icterícia, ³⁵ espasmos, incoordenação e morte.	Via oral-fecal.		Possui grande capacidade de disseminação. Podem surgir sintomas dependendo da cepa viral e do estado do animal (linhagem, imunossupressão, estresse, idade etc.). Duas formas principais de doença, dependendo do tropismo da cepa viral. Padrão respiratório: geralmente assintomático. Padrão entérico: dissemina-se além do intestino para outros órgãos abdominais (fígado e nódulos linfáticos abdominais). Diarreia e alta mortalidade em animais jovens. Algumas cepas podem disseminar para o cérebro.

³⁴ Aerossóis: constituídos por partículas com tamanho menor ou igual a 5 μm . A proteção respiratória para as doenças de transmissão aérea por aerossol é obtida através da seleção e do uso dos EPI adequados. Estertores (estalos ou crepitações) são pequenos sons de estalidos, borbulhantes ou do tipo chocalho, que se ouvem numa parte do pulmão. Eles ocorrem quando o ar se move através das vias respiratórias repletas de líquido.

³⁵ Icterícia: coloração amarelada nas membranas mucosas e nos olhos, causada por excesso de bilirrubina no sangue.

Agente etiológico	Espécie afetada	Sinais clínicos	Transmissão	Período de incubação	Observações
Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV) Família Coronaviridae gênero Coronavírus	Ratos	O vírus afeta as glândulas salivares e lacrimais, linfonodos cervicais, timo e mucosa do trato respiratório. Os sinais clínicos, quando presentes, são: fotofobia, lesões oculares, edemas no globo ocular, lacrimejamento alterado e, em alguns casos, edema na região cervical. Em animais lactentes, ³⁶ pode ocorrer conjuntivite com fotofobia e exsudato ocular. Os sintomas mais graves são: edema cervical, espirros, descarga nasal, descarga ocular e úlcera de córnea.	Contato direto e aerossóis.	-	Alta morbidade e baixa mortalidade.
Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV) Família Arenaviridae gênero arenavírus.	Camundongos, hamster, coelhos, cobaias, primatas não-humanos.	Os sinais clínicos variam de acordo com a cepa viral, linhagem e idade dos animais. Quando a infecção é adquirida ainda no útero ou poucos dias após o nascimento, os animais sofrem um retardo no seu crescimento, desnutrição, irritabilidade, ascite e morte. Apesar da forma mais comum ser assintomática, em hamster observamos glomerulonefrite progressiva e redução de seu tamanho. Em humanos, a doença se manifesta com febre, mialgia, náuseas, vômito, fotofobia e tosse, ocasionalmente rash cutâneo, linfadenopatia, otite, delírio e amnésia.			Possui importância significativa por se tratar de uma zoonose.

³⁶ Lactentes: Mamíferos jovens, sem desmame. Refere-se aos animais sob proteção que são alimentados pela mãe biológica, mãe adotiva ou por mamadeira.

Agente etiológico	Espécie afetada	Sinais clínicos	Transmissão	Período de incubação	Observações
Vírus da Desidrogenase Láctica Família Togaviridae	Camundongos	A atividade da enzima desidrogenase láctica (LDH) no plasma aumenta 24 horas após o contato com o vírus, com picos de até dez vezes mais após 72-96 horas, permanecendo elevados por toda a vida do animal.	Embora os camundongos eliminem o vírus pela urina, saliva, fezes e leite, os títulos virais decaem após a primeira semana da infecção, diminuindo consideravelmente o risco de transmissão.	-	O diagnóstico pode ser realizado através da análise bioquímica dos animais, podendo encontrar elevação em todas as enzimas plasmáticas além do aumento considerável da LDH.
Vírus da Encefalomielite Murina (Vírus Theiler) Família Picornaviridae gênero Enterovirus.	Camundongos e ratos	Os sinais clínicos são inaparentes e presumidamente causados por cepas menos virulentas. Os camundongos afetados apresentam paralisia flácida dos membros. A lesão típica da doença é a poliomielite não supurativa com necrose e neuronofagia. As cepas mais virulentas causam movimentos em círculos, vagarosos, hiperexcitabilidade, convulsões, tremores, paralisia flácida nos membros e alta mortalidade. ³⁷	Fecal - oral.	-	A infecção normalmente é adquirida em 3 a 6 semanas de idade. O vírus tem sido demonstrado nas fezes por até 53 dias após infecção, apresentando uma taxa de mortalidade baixa.
Ectromelia vírus Família Poxviridae Gênero Orthopoxvirus.	Camundongos	Aproximadamente dez dias após a infecção, lesões características se desenvolvem na pele, levando a liberação viral para o ambiente. Estes também podem ser eliminados nas excreções da orofaringe, do trato genital e do intestino. As lesões na doença aguda incluem necrose do baço, linfonodos, timo e fígado.	A transmissão ocorre através de fissuras na pele.	-	-

³⁷ Supurativa: formação ou acúmulo de secreção purulenta. Neuronofagia: neurônios sendo fagocitados por macrófagos do tecido nervoso. Paralisia flácida: perda do tônus muscular.

Agente etiológico	Espécie afetada	Sinais clínicos	Transmissão	Período de incubação	Observações
<i>Herpesvirus simiae</i>	Primates não humanos.	Na sua grande maioria, os animais são assintomáticos. Em alguns casos, podem causar lesões nas mucosas, semelhantes a úlceras aftosas presentes no dorso da língua, lábios ou face, parecidas com as causadas pelo vírus herpes simplex. No homem, conjuntivite ligeira e descarga nasal. Também podem ser observadas doenças neurológicas nos casos mais graves.	Contato direto. Para o homem, ocorre através de mordidas, arranhões, aerossóis ou manuseio inadequado de tecidos contaminados.	Normalmente, a doença em primatas dura, em média, de sete a 14 dias. O vírus permanece latente e pode reativar de forma espontânea ou quando os animais são submetidos a condições de estresse.	O vírus enzoótico em Macaco Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>), Macaco Cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>), e outros primatas não humanos. O vírus pode ser isolado de saliva, sangue, urina, fezes e rim. Nos seres humanos, esta doença tem sido caracterizada por uma variedade de sintomas que geralmente ocorrem dentro de um mês de exposição. Os sintomas incluem: lesões vesiculares localizadas na pele ou nas proximidades do local da inoculação, sintomas neurológicos, paralisia ascendente e, em última instância, encefalite. A morte normalmente ocorre de três a 21 dias após o aparecimento dos sinais clínicos.

Controle bacteriológico e micoplasma

O conhecimento da microbiota do modelo animal utilizado em pesquisa é importante para definir seu estado sanitário.

Tabela 8 – Principais bactérias e micoplasma que afetam animais de laboratório

Agente etiológico	Espécie afetada	Características	Transmissão
<i>Bacillus piliformis</i> Responsável pela doença de Tyzzer.	Afetam uma variedade de animais, incluindo camundongos, ratos, hamsters, coelhos e primatas não-humanos (Rhesus).	São bacilos gram negativos, intracelulares. Células mononucleares infiltradas e neutrófilos são observados em áreas afetadas, mesmo podendo não ser observado o bacilo nas lesões. Lesões da doença são caracterizadas por necrose hepática, hepatite, colite e miocardite. As lesões entéricas são mais graves em coelhos e hamsters.	A transmissão ocorre após ingestão de esporos pelas fezes (transmissão fecal-oral).
Bacilo associado aos cílios respiratórios (CAR <i>Bacillus</i>) Causam doença respiratória crônica.	Ratos, camundongos, coelhos, hamsters e cobaias.	São bacilos gram negativos. A mortalidade na maioria dos casos está associada à coinfeção com <i>Mycoplasma</i> e Vírus Sendai. As lesões causadas por esta bactéria se localizam no trato respiratório superior. A bactéria pode ser visualizada entre os cílios do epitélio respiratório. Devido à dificuldade em isolar as bactérias em meios comuns, o ideal para o diagnóstico é a pesquisa de anticorpos através de técnicas de sorologia ou a pesquisa do bacilo pela reação em cadeia da polimerase (PCR).	Através de fômites e contato direto.
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Ratos, camundongos, hamsters e cobaias.	São cocos gram positivos. Em roedores, pode causar o surgimento de abscessos nos tecidos, atingindo tímpano e ouvido médio. Quando sua forma é epizootica, os ratos podem desenvolver embolia pulmonar. Em camundongos, a doença pode evoluir para articulações, fígado e rim. O diagnóstico se dá através da observação direta das bactérias em cultivo dos abscessos com meios apropriados (ex.: ágar sangue, tripticase soy com 5% de sangue de carneiro etc.). A pesquisa de anticorpos através de sorologia é indicada devido ao baixo custo e fácil manuseio. Outra forma é através de técnicas moleculares.	Contato direto com urina e fezes contaminadas.

Agente etiológico	Espécie afetada	Características	Transmissão
<i>Staphylococcus aureus</i>		Como se trata de uma zoonose, a contaminação pode ter sido levada pelo homem aos animais. As formas clínicas são as dermatites ulcerativas, abscessos e pododermatites (dermatite que afeta apenas as patas dos animais). O diagnóstico depende do isolamento e da identificação bacteriana em material das lesões, utilizando meios de cultivo seletivos de forma que outros microrganismos não interfiram nos resultados.	
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Ratos, camundongos, hamsters, coelhos e cobaias.	Principal agente responsável pelas doenças respiratórias crônicas dos ratos. A infecção assintomática é a mais comum. Os sinais clínicos podem ser: otite média e interna, que leva o animal a movimentar-se em círculos, rinite com espirros e descarga nasal mucosanguinolenta e pneumonia com dispneia e debilidade progressiva. Pode infectar o trato genital das fêmeas, causando baixa fertilidade e redução de peso da prole. O diagnóstico pode ser feito pelo isolamento através de material do trato respiratório, sorologia ou técnicas de reação em cadeia da polimerase. Somente a seleção de animais livres de micoplasma, identificados por monitoramento contínuo, pode permitir a obtenção de estoques negativos.	A transmissão ocorre por aerossóis e por via transplacentária.

Controle parasitológico

Os animais de laboratório criados e mantidos nas colônias em condições convencionais são comumente afetados por uma grande variedade de ectoparasitas e endoparasitas (tabela 9). De um modo geral, estes parasitas atuam comprometendo a saúde e interferindo em trabalhos realizados com os animais. É aconselhável promover medidas preventivas antiparasitárias e mantê-las com as diferentes espécies criadas em biotérios. Há a necessidade de fazer exames periódicos, verificando o aspecto e a sanidade, além de se manter os animais sob condições sanitárias controladas. A presença de parasitas na colônia influencia na fisiologia dos animais e na suscetibilidade a outros agentes infecciosos.

○ parasitismo geralmente é assintomático, mas, dependendo da intensidade, produz uma ampla variedade de sinais clínicos. Os ectoparasitas (tabela 10) podem causar prurido, dermatite, perda ou rarefação da pelagem nas regiões afetadas, pelos arrepiados, descamação epidérmica e ulcerações de pequena ou grande extensão, redução nos índices de reprodução e conseqüentemente perdas econômicas, além da interferência nos resultados de pesquisa. Os sinais clínicos causados pelos endoparasitas incluem diminuição da taxa de crescimento, irritação anal, prolapso retal, intussuscepção intestinal, enterite catarral, granuloma hepático, queda no ganho de peso, acúmulos de gases, distensão abdominal, fezes amolecidas ou aquosas, constipação intestinal, pelos arrepiados, colite, perdas econômicas ligadas à diminuição da taxa de produtividade das colônias e interferir nos resultados.

○ tratamento das ectoparasitoses em animais de laboratório baseia-se na aplicação de substâncias químicas solúveis sob a forma de banhos de imersão, diretamente sobre a pelagem do animal, misturadas à cama pela administração subcutânea e na água dos bebedouros. ○ tratamento de helmintos pode ser realizado com o uso de várias drogas anti-helmínticas, isoladas ou combinadas. Os anti-helmínticos são administrados por via oral, adicionados à ração ou água.

Exames endoparasitológicos

○ exame endoparasitológico constitui um valioso recurso para o diagnóstico das doenças parasitárias. Os parasitas intestinais são habitualmente identificados por sua morfologia ao microscópio. Este exame consiste na pesquisa de cistos, trofozoítos e oocistos de protozoários, ovos, adultos e larvas de helmintos.

Cuidados com as amostras de fezes:

- As amostras fecais devem ser recentes.
- Preferencialmente coletadas diretamente da ampola retal do animal.

- Em situações especiais, fezes frescas podem ser coletadas do fundo da gaiola.
- Amostras devem ser coletadas em frasco limpo e seco.
- Examinar as amostras de fezes macroscopicamente e microscopicamente.
- Processar as amostras o mais rápido possível.
- As amostras que demorarem a serem analisadas devem ser colocadas em conservantes químicos.
- Identificar as amostras com espécie animal, idade, sexo e hora da coleta.

Para animais que não podem ser retirados da colônia, recorre-se a técnicas onde a amostra não requer eutanásia. A técnica da fita celofane para pesquisa de ovos de *Syphacia* spp. é uma delas.

Técnica da fita celofane adesiva:

- Realizar a contenção do animal e, com fita adesiva celofane, fazer uma impressão na região perianal.
- Colocar a fita com face adesiva voltada para a lâmina de microscopia devidamente identificada.
- Observar a lâmina ao microscópio usando a objetiva de menor aumento (10x).

Os animais de pequeno porte enviados ao laboratório são submetidos ao exame direto da mucosa intestinal. Esta técnica possibilita um diagnóstico amplo, pois se obtém amostra de todas as porções do intestino.

Exame direto da mucosa intestinal:

- Após eutanásia, fazer uma incisão pré-retro-umbilical na linha mediana do abdome.

- Retirar intestinos, delgado e grosso, e colocar em placas de Petri identificadas.
- Adicionar solução salina (NaCl a 0,85%).
- Abrir os intestinos longitudinalmente.
- Realizar o exame macroscópico, através de observação da placa de Petri sob um fundo preto, a fim de facilitar a visualização dos helmintos.
- Porção do material que está na placa é colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio óptico.

Para a pesquisa de oocistos de *Eimeria stiedae* em coelhos é utilizado o método de exame direto da bile.

Exame direto da bile:

- Após a eutanásia, realizar a incisão pré-retro-umbilical no abdome do coelho.
- Retirar a vesícula biliar, colocar em placa de Petri e abrir para expor o seu conteúdo.
- Adicionar solução salina a 0,85%.
- Preparar lâmina de microscopia com este conteúdo.
- Observar em microscópio óptico.

Amostras de fezes de roedores, coelhos, ovinos e primatas não-humanos podem também ser testadas pelo exame direto, em fezes frescas pela diluição de pequena porção da matéria fecal em solução fisiológica e identificação do material ao microscópio. No método de Willis (flutuação), é misturada pequena quantidade de fezes à solução saturada de cloreto de sódio ou açúcar. Para complementar o diagnóstico parasitológico em primatas não-humanos, é utilizada a técnica de sedimentação espontânea de Dennis-Stone & Swanson –modificada, onde a amostra fecal é diluída em solução de detergente neutro.

Há muitos outros métodos coproparasitológicos que podem ser utilizados, permitindo detectar parasitas nas fezes dos animais de laboratório.

Tabela 9 – Principais endoparasitas de animais de laboratório

<i>Espécies</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Habitat</i>	<i>Características</i>
<i>Aspicularis tetraptera</i>	Camundongos, ratos e hamsters	Nematódeo encontrado no ceco e cólon	Os vermes adultos apresentam asa cuticular cervical. As fêmeas medem de 3,0 a 4,0 mm de comprimento e os machos entre 2,0 a 4,0 mm de comprimento. Seus ovos são elipsoides com presença de uma massa de blastômeros visíveis. O ciclo é de 23 dias, os ovos são observados nas fezes e necessitam de seis dias para embrionação.
<i>Syphacia obvelata</i>	Camundongos, ratos e hamsters	Ceco e cólon	É o parasita que promove a oxiúriase em camundongos, normalmente não patogênicos. A infecção de animais de laboratório ocorre após a ingestão de ovos embrionados. Os ovos alongados apresentam como característica achatamento em um dos lados, em forma de D, medindo entre 72 a 82 por 25 a 36 micrômetros. A fêmea mede 3,4 a 5,8 mm de comprimento e deposita os ovos no cólon ou na região perianal. O macho é menor e mede 1,1 a 1,5 mm de comprimento e possui três dilatações, chamadas mamelões, na face ventral terço posterior do corpo. Os vermes adultos apresentam dilatação cuticular cefálica. Apresentam um ciclo direto com um período de oito a 15 dias.
<i>Syphacia muris</i>	Ratos	Ceco e cólon	As fêmeas medem entre 2,8 a 4,0 mm e os machos entre 1,2 a 1,3 mm de comprimento. Os ovos são similares aos de <i>Syphacia obvelata</i> .
<i>Passarulus ambiguus</i>	Coelhos	Oxiurídeo do ceco e cólon	Podem ser encontrados em grandes quantidades. Os machos medem de 4,0 a 5,0 mm em seu comprimento e as fêmeas de 9,0 a 11,0 mm. Possuem corpo semitransparente o que facilita a visualização do bulbo esofágico. O ovo apresenta parede fina, com achatamento lateral em um dos seus lados, medindo entre 95 e 103 por 43 micrômetros. Seu ciclo de vida é direto com 55 a 65 dias e a infecção é por ingestão do ovo embrionado.
<i>Paraspidodera uncinata</i>	Cobaias	Parasita do ceco e cólon	As fêmeas adultas medem 18,4 a 20,9 mm de comprimento e os machos, 16,3 a 17,6 mm.
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Primatas	Intestino delgado	As fêmeas adultas medem entre 30 a 40 cm de comprimento e os machos, 15 ou 30 cm. Os ovos férteis medem entre 60 a 45 micrômetros e os ovos inférteis, mais alongados, entre 80 a 90 micrômetros de comprimento.
<i>Trichuris trichiura</i>	Primatas	Ceco	Os vermes adultos medem entre 3 a 5 cm de comprimento. Os ovos variam de tamanho entre 50 e 55 micrômetro de comprimento por 22 ou 23 micrômetro de largura.
<i>Hymenolepis nana</i>	Camundongos, ratos, hamsters e primatas	Intestino	Essa espécie é também muito encontrada no homem. O verme adulto tem comprimento que varia entre 2 e 4 cm e possui escólex pequeno e globoso com presença de vários acúleos dispostos em torno do rostro. Os ovos têm formato oval ou arredondado e medem de 40 a 50 micrômetros de diâmetro. Causa doenças ao homem, podendo ser infectado pela manipulação dos animais.

<i>Espécies</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Habitat</i>	<i>Características</i>
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Camundongos, ratos e <i>hamsters</i>	Intestino delgado	Conhecido como a tênia do rato. O verme adulto mede entre 10 e 20 cm de comprimento e possui um escólex pequeno, com quatro ventosas, desprovido de acúleos. Os ovos são esféricos, com casca dupla, e medem de 70 a 80 micrômetros de diâmetro.
<i>Balantidium caviae</i>	Cobaias	Ceco e cólon	Protozoário ciliado encontrado comumente em animais convencionais. Aparentemente não patogênicos. A forma trofozoíta mede entre 55 a 115 micrômetros de comprimento por 45 a 73 micrômetros de largura e a forma cística, entre 40 a 50 micrômetros de largura.
<i>Eimeria stiedae</i>		Duodeno, fígado e vias biliares	A coccidiose é causada por protozoários patogênicos que costumam ter localização bem específica no organismo do hospedeiro. Causam doenças graves em diversas espécies animais. O gênero <i>Eimeria</i> caracteriza-se por apresentar no interior dos oocistos quatro esporocistos, cada um deles com dois esporozoítas.
<i>Eimeria flavescens</i> , <i>E. irresidua</i> , <i>E. neoleporis</i> , <i>E. intestinalis</i> , <i>E. magda</i> (São as mais patogênicas) <i>Eimeria perforans</i>	Coelhos		
<i>Eimeria media</i>		Intestino grosso e delgado	
<i>Eimeria falciformis</i>	Camundongo	Intestino grosso	
<i>Eimeria caviae</i>	Cobaia		
<i>Eimeria nieschulzi</i> e <i>E. separata</i>	Ratos	Intestino	
<i>Balantidium coli</i>	Primatas	Intestino	Encontrado nas fezes, os trofozoítas medem entre 30 e 150 μm de comprimento por 25 a 120 μm de largura. Os cistos são ovoides ou esféricos e medem entre 40 e 60 μm de diâmetro.
<i>Cyathodium cunhae</i>	Cobaias	Ceco e cólon	Ciliado, não patogênico. Sua forma trofozoíta mede entre 10 a 36 μm por 9 a 24 μm . Caracteriza-se pela forma afunilada. A única forma encontrada é a trofozoíta.
<i>Tritrichomonas muris</i>	Camundongos, ratos, cobaias e <i>hamsters</i>	Cólon e ceco	Protozoário com uma forma intermediária de pseudocisto e trofozoíta. O trofozoíta mede entre 16 a 26 μm de comprimento por 10 a 14 μm de largura. O período de desenvolvimento é de três a dez dias.
<i>Spironucleus muris</i>	Ratos, <i>hamsters</i> , camundongos e vários roedores selvagens ao redor do mundo	Intestino delgado e ceco	Protozoário anteriormente conhecido como <i>Hexamita muris</i> . Apresenta aspecto piriforme, simetria bilateral, mede de 7 a 9 μm de comprimento por 2 a 3 μm de largura.
<i>Giardia muris</i>	Camundongos, ratos e <i>hamsters</i>	Porção anterior do intestino delgado	É um protozoário flagelado causador da giardíase. O trofozoíta mede entre 7 a 13 μm comprimento por 5 a 10 μm de largura. O ciclo leva em torno de 5 a 15 dias. <i>G. muris</i> se reproduz por participação binária ou múltipla.

<i>Espécies</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Habitat</i>	<i>Características</i>
<i>Giardia caviae</i>	Cobaias		Não é patogênica. A forma trofozoíta mede entre 8 a 15 μm por 6 a 10 μm de largura.
<i>Giardia intestinalis</i>	Primatas não-humanos	Porção anterior do intestino delgado	Apresenta a forma cística e trofozoíta. A forma trofozoíta mede 12 a 15 μm de comprimento por 6 a 8 μm de largura. Os cistos medem 8 a 12 μm e 7 a 10 μm de comprimento e contém quatro núcleos.
<i>Entamoeba muris</i>	Camundongos, ratos e hamsters	Cecum e cólon	Espécie não patogênica. A forma trofozoíta mede de 8 a 30 μm de comprimento e os cistos de 9 a 20 μm de diâmetro. Podem conter oito núcleos.
<i>Entamoeba caviae</i>	Cobaias	Ceco	A forma trofozoíta mede de 10 a 20 μm de comprimento e o cisto de 11 a 17 μm de diâmetro.
<i>Entamoeba cuniculi</i>	Coelhos	Ceco e Cólon	Não patogênica, o trofozoíta mede de 12 a 30 μm de comprimento e os cistos de 7 a 21 μm de diâmetro.

Exames ectoparasitológicos

O exame de ectoparasitas consiste na identificação dos artrópodes ectoparasitas de interesse veterinário, encontrados na pele dos animais de laboratório convencionais. A contaminação dos animais convencionais por ectoparasitas é problema de importância sanitária e de difícil controle. Algumas espécies podem atuar como vetores biológicos de outros agentes infecciosos. Devido as suas características anatômicas e alimentares, os ácaros que mais frequentemente acometem os animais de laboratório ficam confinados ao hospedeiro e aderem firmemente à pelagem. Os métodos a serem empregados consistem em exame de inspeção, com observação macroscópica do animal no intuito de detectar alguma evidência relacionada com ectoparasitas.

Procedimentos:

Para o diagnóstico dos ectoparasitas em animais de laboratório, várias técnicas podem ser utilizadas:

- Os cadáveres dos animais são colocados em decúbito ventrais e expostos à iluminação de uma lâmpada incandescente, mantendo uma distância de aproximadamente 30 cm, para induzir a migração dos ectoparasitas para o dorso do animal. Após vinte minutos, com o auxílio de microscópio estereoscópio, toda pelagem é

vistoriada. Os ectoparasitas encontrados são removidos do corpo hospedeiro e imersos entre lâmina e lamínula com gota de líquido de Hoyer (clarificador) para serem identificados ao microscópio óptico.

- Também se pode colocar o cadáver, logo após sua morte, no refrigerador durante trinta minutos e posteriormente à temperatura ambiente por dez minutos ou mais. Os ácaros abandonam o corpo do hospedeiro assim que a temperatura começa a cair, deixam as camadas mais profundas do pelo e migram para as pontas. Observar o cadáver em microscópio estereoscópio.
- Em um papel preto, colocar a carcaça do animal. Este papel é então margeado com fita celofane com o lado colante voltado para cima, evitando, desta maneira, que os parasitas fujam ao tentar deixar o corpo do hospedeiro. O papel preto facilita a observação dos artrópodes pequenos.
- Outro método utilizado é o da fita adesiva de celofane, colocando a mesma no pelo do animal e retirando-a logo depois. Colocar em lâmina de microscopia devidamente identificada e levar ao microscópio óptico.
- No caso de raspado de pele, este deve ser profundo e a região escolhida próxima de uma lesão. Os pelos são removidos com lâmina de bisturi, untada com glicerina ou óleo lubrificante. O material do raspado é colocado imerso em óleo entre lâmina e lamínula e observado em microscópio óptico.
- Para a pesquisa de ácaro do canal auditivo externo, remove-se com *swab* o cerume e se examina ao microscópio.
- Identificar os espécimes com chaves para classificação e livros de referência.

Tabela 10 – Principais ectoparasitas de animais de laboratório

<i>Espécies</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Habitat</i>	<i>Características</i>
<i>Chirodiscoides caviae</i>	Cobaia	Pelo	Ácaro que, em infestações maciças, pode ser encontrado por todo o corpo e pode provocar sinais clínicos como alopecia e prurido. Fêmeas e machos apresentam o corpo alongado e medem de 300 a 500 μm de comprimento.
<i>Cheyletiella parasitivorax</i>	Coelho	Pelo e corpo	Forma ovalada e tamanho 350 μm de largura por 500 μm de comprimento. Coelho infectado com <i>Cheyletiella</i> apresentam descamações aderidas ao pelos.
<i>Demodex aurati</i>	Hamster	Folículos e sistema pilossebáceo	Ácaro encontrado em colônias convencionais.
<i>Psorergates simplex</i>	Camundongo	Folículos e glândulas sebáceas	Os ácaros e seus detritos acumulam-se nas invaginações foliculares e aparecem pequenos nódulos brancos sobre a pele das regiões da cabeça e do pescoço. Mede de 90 a 150 μm . De ocorrência rara.
<i>Myobia musculi</i>	Camundongo	Pelagem	É um ácaro cujas fêmeas medem aproximadamente entre 400 a 500 μm e os machos, de 285 a 320 μm de comprimento. O primeiro par de patas é curto e modificado para a aderência aos pelos. Os ovos são ovais, com 200 μm de comprimento, e ficam aderidos aos pelos. <i>M. musculus</i> localiza-se preferencialmente na região da cabeça, do pescoço e da nuca. A transmissão se dá por transferência direta.
<i>Mycoptes musculinus</i>	Camundongo	Pelo	É o ectoparasita mais comum em camundongo de laboratório. A fêmea apresenta o corpo oval-alongado, medindo cerca de 300 μm de comprimento por 130 μm de largura e o macho tem o corpo menor e menos ovalado. O terceiro par de patas do macho e o terceiro e quarto pares de patas da fêmea estão modificados para aderência aos pelos. Todos os estágios ocorrem na pelagem e o ciclo completo de vida é de aproximadamente 14 dias.
<i>Psoroptes cuniculi</i>	Coelho	Conduto auditivo externo	É um ácaro que provoca um acúmulo de secreção serosa e de crostas marrons no pavilhão auricular. A fêmea é arredondada, mede entre 400 a 750 μm e os machos entre 370 a 550 μm . Seu ciclo de vida é de 21 dias.
<i>Notoedres muris</i>	Rato	Orelha, focinho, cauda, genitália externa e membros posteriores	É o ácaro de mais difícil ocorrência, responsável pela sarna auricular em ratos (gênero <i>Rattus</i>). A transmissão é por contato direto.
<i>Radfordia ensifera</i>	Rato	Pelagem	Infesta os ratos do gênero <i>Rattus</i> . Apresenta dois ganchos tarsais, presentes no segundo par de patas.
<i>Haemodipsus ventricosus</i>	Coelho	Corpo	Apresenta coloração castanha, comprimento entre 1,2 a 2,5 mm e abdome ovalado. Ciclo é de trinta dias. É um vetor para a transmissão da <i>Francisella tularensis</i> ao homem.
<i>Gliricola porcelli</i>	Cobaia	Corpo	Sua forma é delgada, com cabeça estreita, e mede aproximadamente 1,0 a 1,5 mm de comprimento. Em infestações maciças, pode causar prurido, feridas e alopecia.
<i>Gyropus ovalis</i>	Cobaia	Corpo	Piolho de ocorrência rara. Apresenta coloração clara, cabeça mais larga e abdome ovalado, medindo entre 1,0 e 1,2 mm.

<i>Espécies</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Habitat</i>	<i>Características</i>
<i>Polyplax serrata</i>	Camundongo	Pescoço e dorso	Piolho sugador com ciclo de vida de 13 dias. Tamanho varia de 600 a 1.500 μm . Transmite o agente da eperitrozoose murina.
<i>Polyplax spinulosa</i>	Rato	Corpo	Piolho cujos ovos maturam após seis dias. Possui ciclo de vida de 13 dias e pode servir como vetor para hemobartelose murina e <i>Brucella brucei</i> . A transmissão dos piolhos é por contato direto.

Necropsia

A necropsia tem por definição a abertura e inspeção criteriosa de todos os órgãos e tecidos de um animal morto com o objetivo de determinar a causa de sua morte. Por esta técnica é possível descrever alterações macroscópicas em diferentes circunstâncias, como processos patológicos desencadeados por agentes infecciosos, parasitários, químicos, físicos e fisiológicos, assim como processos neoplásicos e anomalias congênitas. Por esse motivo, amostras oriundas de uma necropsia podem fornecer material para diversos exames complementares, como histopatológico, parasitológico, bacteriológico e até mesmo para biologia molecular. A necropsia deve ser realizada em sala própria, devidamente iluminada e ventilada, preferencialmente em uma cabine de segurança biológica. Antes de iniciar o procedimento, é necessário observar o histórico do animal, isto é, dados como espécie, linhagem, peso, idade, procedência, sintomatologia ou estado clínico. Essas informações são de suma importância, já que auxiliam o diagnóstico conclusivo (*causa mortis*).

O animal é colocado em decúbito dorsal e a necropsia iniciada com um exame minucioso da superfície corporal, avaliando-se o estado geral do cadáver e levando-se em conta seu estado nutricional, a presença de sinais externos e as alterações cadavéricas. No exame externo, são inspecionados: pele, pelos, unhas, mama, bolsa escrotal, cavidades naturais e mucosas da boca, pavilhão auricular, narinas, olhos, ânus e genitais. A abertura do cadáver é realizada por uma incisão longitudinal sobre a linha alba, partindo da região junto à mandíbula até a região anal. A pele é então rebatida, expondo dessa

forma as musculaturas torácica e abdominal. A cavidade torácica é aberta e os órgãos são expostos. É primordial que sejam observados posição, tamanho, coloração e presença de estruturas estranhas ou anormais. Esta percepção deve existir durante toda a necropsia. Na cavidade abdominal, os órgãos são deslocados e seccionados. Com o cadáver do animal em decúbito ventral, é inspecionado o sistema nervoso central. Todas as alterações encontradas devem ser registradas.

Os órgãos e tecidos que apresentem alguma alteração, assim como nódulos e massas encontrados, são coletados. Pequenos fragmentos (0,5 cm²) da lesão, juntamente a região aparentemente saudável, são suficientes para a análise histopatológica. A fixação desse material deve ser imediatamente após a coleta e acondicionada em frasco devidamente identificado. Há várias soluções fixadoras, sendo a formalina tamponada à 10% a mais comumente usada, na proporção de dez partes de solução para cada parte de tecido a ser fixado.

Controle genético

Atualmente, milhares de linhagens isogênicas de camundongos, com multiplicidade de finalidade, estão disponíveis em biotérios do mundo todo. O laboratório de controle genético animal tem como principal função aplicar metodologias que permitam verificar e assegurar a integridade genética das colônias. A integridade genética consiste em manter a continuidade da espécie ou das linhagens e, no caso de camundongos e ratos isogênicos, garantir a pureza da linhagem e a homogeneidade destes animais. O monitoramento genético auxilia na manutenção das linhagens isogênicas, as quais possuem características essenciais para a reprodutibilidade de dados experimentais dos pesquisadores. Na maioria dos casos, a contaminação genética é acidental, tendo como fonte principal de falha o erro humano, podendo ocorrer devido a cruzamentos inadvertidos ou à troca de identificação das linhagens.

O monitoramento genético pode ser realizado por várias metodologias, como a identificação dos genes de pigmentação (visualização da coloração da pelagem na prole), polimorfismo bioquímico (identificação das isoenzimas), análise osteométrica (analisa o desenvolvimento da mandíbula), análise de histocompatibilidade (testado pelo transplante de pele), observação de comportamento (modificação do comportamento), avaliação da prole (número de filhotes nascidos), ocorrência de patologias (comuns a linhagem) e identificação de mutações espontâneas ou induzidas e possíveis contaminações genéticas (marcadores moleculares).

Referências bibliográficas

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. *Biossegurança de A a Z*. Rio de Janeiro: Papel e Virtual, 2003.

KELLY, S. T.; HALL, A. S. Housing. In: BENNET, B. T.; ABEE, C. R.; HENRICKSON, R. (Eds.). *Nonhuman Primates in Biomedical Research: biology and management*. San Diego: Academic Press, 1995.

NRC. National Research Council. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. *Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório*. Edição em português pela AAALAC e Cobe. Goiânia: National Academy Press, 2003.

TEIXEIRA, P; VALLE, S. *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1996.

Bibliografia consultada

AMA. American Medical Association. *Statement on the Use of Animals in Biomedical Research: the challenge and response* (revised). Chicago: American Medical Association, 1992.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

BARROS, K. C. *Métodos Alternativos para a Substituição dos Modelos Animais na Experimentação*, 2007. Monografia de Curso Técnico em Biotecnologia, Rio de Janeiro: EPSJV/Fiocruz.

BENAVIDES, F. J.; GUÉNET, J-L. *Manual de Genética de Roedores de Laboratório: Princípios básicos y aplicaciones*. Madrid: Universidad de Alcalá, 2004.

- BINSFELD, P. C. *Biossegurança em Biotecnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.
- CARDOSO, T. A. O.; NAVARRO M. B. M. A. *A Ciência entre Bichos e Grilos: reflexões e ações da biossegurança na pesquisa com animais*. São Paulo, Rio de Janeiro: Hucitec, Faperj, 2007.
- CPNEMB. *Capacitação de pessoal de níveis elementar e médio em biotérios: manual para técnicos em animais de laboratório*. Departamento de Biotérios/Biomanguinhos. Rio de Janeiro: 1994.
- DE LUCA, R. R. *et al. Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, 1996.
- DINIZ, L. S. M. *Primatas em Cativeiro: manejo e problemas veterinários*. Enfoque para espécies neotropicais. São Paulo: Ícone, 1997.
- FEIJÓ, A. G. S. *Utilização de Animais na Investigação e Docência: uma reflexão ética necessária*. Porto Alegre: Edipicurs, 2005.
- FELASA. Federation of Laboratory Animal Science Associations. FELASA guidelines for education of specialists in laboratory animal science (Category D). *Laboratory Animals*, v. 33, p. 1-15, 1999.
- _____. FELASA recommendations on the education and training of persons working with laboratory animals: Category A and C. *Laboratory Animals*, v. 29, p. 121-131, 1995.
- _____. FELASA recommendations on the education and training of persons carrying out experiments (Category B). *Laboratory Animals*, v. 34, p. 229-235, 2000.
- FLECHTMANN, C. H. W. *et al.* Sobre três ácaros parasitos de animais de laboratório. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 4, n. 1, p. 29-34, 1974.
- FLYNN, R. *Parasites of Laboratory Animals*. Ames: Iowa State University Press, 1973.
- GILIOLI, R. *et al.* Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animals houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 1, p. 33-37, 2000.
- GORDON, J. E. *Profilaxia das doenças transmissíveis*. Relatório Oficial da Associação Americana de Saúde Pública. Preparado pela Comissão de Profilaxia de Doenças Transmissíveis. 10. ed. 1965.
- GUIMARÃES, M. A.; MÁZARO, R. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. Disponível em: <<http://www.aaalac.org/resources/links.cfm#alternatives>>. Acesso em: 9 set. 2007.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993.

- HOFFMANN, R. P. *Diagnóstico de Parasitismo Veterinário*. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MAJEROWICZ, J. Biossegurança em Biotérios: Alergia um Risco Sempre Presente. *Revista de Biotecnologia, Ciência e Saúde*, n. 30, p. 105-108, 2003.
- _____. *Procedimentos de Biossegurança para as Novas Instalações do Laboratório de Experimentação Animal (Laean) de Bio-Manguinhos*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, 2005.
- _____. *Boas Práticas em Biotérios e Biossegurança*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. *Animais de Laboratório: cuidados na iniciação experimental*. Florianópolis: UFSC, 2004.
- MOLINARO, E. M.; MAJEROWICZ, J.; VALLE, S. *Biossegurança em Biotérios*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 9. ed. São Paulo, Rio de Janeiro: Atheneu, 1997.
- PAIXÃO, R. L. *Experimentação Animal: razões e emoções para uma ética*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2001.
- PODOLSKY, M. L.; LUKAS, V. S. *The Care and Feeding of an IACUC*. Florida: CRC Press, 1999.
- REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e África*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Capítulo 5

Fundamentos em química experimental

Mônica Mendes Caminha Murito
Virginia de Lourdes Mendes Finete

1. Química: uma ciência essencialmente experimental

A Química é a ciência que estuda as substâncias presentes na natureza, do que elas são feitas, como se transformam e as diversas aplicações destas substâncias em nosso dia-a-dia. Embora o estudo da Química seja constituído de múltiplos conceitos teóricos, associados ao conhecimento de uma simbologia própria, a essência desta ciência é experimental.



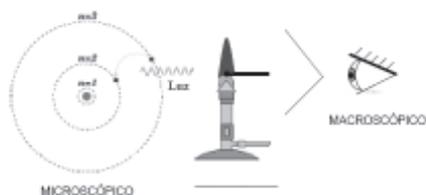
Química: do egípcio 'kēme', que significa 'terra'

Ramos da química:

- Química inorgânica
- Química orgânica
- Físico-química
- Química analítica

2. Introdução ao laboratório de Química

O laboratório é o local mais importante para o desenvolvimento da Química e ambiente de atuação dos profissionais da saúde e de outras áreas afins. É no laboratório que se estabelecem relações entre o que é observado no campo macroscópico, com os conceitos, teorias e modelos formulados em nível microscópico.



Niels Bohr, cientista dinamarquês, criou seu modelo atômico em 1913, propondo que os elétrons estão dispostos no átomo em órbitas circulares, ao redor do núcleo, como os planetas em torno do sol. A cor no teste de chama é a energia que os elétrons do elemento emitem em forma de luz, ao retornarem ao seu estado fundamental.

A realização de qualquer atividade no laboratório requer o uso da vestimenta adequada: calça comprida, jaleco fechado de manga comprida, sapato fechado em couro e óculos de proteção, os quais oferecem uma barreira de proteção mínima contra eventuais respingos ou derramamentos de substâncias químicas. Também é imprescindível reconhecer os diversos materiais, equipamentos, substâncias, fontes de consulta bibliográfica, símbolos de segurança e apresentar uma postura adequada.

3. Soluções

3.1. Propriedades das soluções

As substâncias químicas presentes na natureza e utilizadas em nosso cotidiano encontram-se, geralmente, em forma de soluções. As soluções podem ser líquidas, sólidas ou gasosas.

SOLUÇÃO	SOLUTO	SOLVENTE
Soro fisiológico	Cloreto de sódio	Água
Aço	Carbono	Ferro
Ar atmosférico	Oxigênio, gás carbônico e outros gases	Nitrogênio

Soluções: são misturas homogêneas constituídas por um ou mais solutos dissolvidos em um solvente.

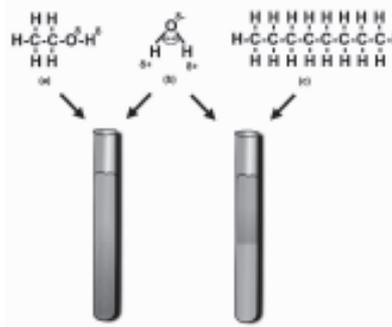
Solubilidade: é a capacidade de uma substância (solute) ser dissolvida por um determinado solvente, a uma dada temperatura.



Fatores que influenciam a solubilidade

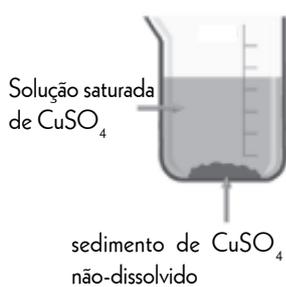
TEMPERATURA
PRESSÃO
FORÇAS INTERMOLECULARES

As 'forças intermoleculares' dependem das ligações químicas presentes: substâncias formadas por ligações covalentes podem ser POLARES ou APOLARES. A água (b), por ser uma substância polar, é um bom solvente para o álcool (a), que também é polar; porém, a água é um solvente ruim para a gasolina (c), que é apolar, formando assim uma mistura heterogênea.



3.2. Concentração das soluções

Concentração é a quantidade de soluto contida em um volume ou em uma massa de solvente.



A solução é 'saturada' quando contém a máxima quantidade possível de soluto dissolvido e é 'insaturada' antes de atingir esse ponto. Também é possível obter uma solução 'supersaturada' aquecendo uma solução saturada, que tenha parte do soluto não dissolvido, até que todo ele se dissolva. Deve-se manter a solução em repouso e deixar que ela atinja a temperatura ambiente lentamente.

3.2.1. Concentração em quantidade de matéria

A quantidade de matéria é uma unidade fundamental do Sistema Internacional de Unidades (SI) que expressa a quantidade em mol de uma substância. Concentração em quantidade de matéria é a quantidade em mol do soluto por litro de solução:

$$\text{Concentração em quantidade de matéria} = \frac{\text{mol do soluto}}{\text{L de solução}} = \text{mol L}^{-1}$$

Um exemplo da expressão da concentração em quantidade de matéria é a quantidade de sal, NaCl , na água do mar: cada 1 L contém 27 g de sal. É possível converter a massa de sal em quantidade de matéria: A massa molar do NaCl é a soma das massas do Na e do Cl: $23 + 35,5 = 58,5$ g/mol. Então se 1 mol de NaCl pesa 58,5 g, quantos mol correspondem a 27 g? Basta fazer a seguinte regra de três:

$$\begin{array}{l} 58,5 \text{ g NaCl} \text{ ————— } 1 \text{ mol} \\ 27 \text{ g NaCl} \text{ ————— } x \quad \rightarrow \quad x = 0,46 \text{ mol} \end{array}$$

Assim, a concentração em quantidade de matéria do sal NaCl na água do mar é $0,46 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2.2. Concentração em massa por volume $C_{(m/v)}$

A concentração em massa por volume expressa a massa do soluto em gramas, por litro de solução.

$$C_{(m/v)} = \frac{\text{massa de soluto (g)}}{\text{L}} = \text{g L}^{-1}$$

A solução fisiológica constitui-se de 9,0 gramas de cloreto de sódio, NaCl em um litro de água. A concentração desta solução é igual a $9,0 \text{ g L}^{-1}$. Em geral, essa concentração é expressa nos rótulos em termos percentuais. Para isso, deve-se calcular a massa de NaCl contida em 100 ml de solução:

$$1 \text{ L} = 1.000 \text{ mL}$$

$$9,0 \text{ g NaCl} \text{ ————— } 1.000 \text{ mL de solução}$$

$$\times \text{ ————— } 100 \text{ mL de solução} \rightarrow 0,9 \text{ g} / 100 \text{ mL} = 0,9 \% (m/v)$$

3.2.3. Concentração em massa por massa $C_{(m/m)}$ e volume por volume $C_{(v/v)}$

Esse tipo de concentração é comumente expresso em forma de composição percentual:

Composição percentual (%): é a porcentagem em massa ou volume de um soluto por massa ou volume de solução.

$$\% (m/m) = \frac{\text{massa de soluto (g)}}{\text{massa de solução (g)}} \cdot 100$$

$$\% (v/v) = \frac{\text{volume de soluto (L)}}{\text{volume de solução (L)}} \cdot 100$$

É possível observar essa expressão da concentração em rótulos de muitos produtos utilizados no cotidiano. O vinagre, por exemplo, é uma solução de ácido acético em água a 3,0 %. Isso significa que uma garrafa de 750 g de vinagre contém 22,5 g de ácido acético:

$$\text{Ácido acético no vinagre \% (m/m)} = \frac{22,5 \text{ g}}{750 \text{ g}} \cdot 100 = 3,0 \%$$

3.3. Preparo de soluções

Preparar soluções é uma das tarefas principais dentro de um laboratório. Uma solução mal preparada ocasiona erros em formulações e análises. Para o preparo de uma solução, devem ser seguidos os seguintes passos:

- Primeiro passo – Qualidade da água

A maioria das soluções utilizadas em laboratório são líquidas e têm a água como solvente. É importante que a água apresente um nível de qualidade satisfatório e atenda às especificações preconizadas pelas farmacopeias.¹

Especificações USP para águas purificadas

ANÁLISES/ DETERMINAÇÕES	ESPECIFICAÇÃO
pH (25°C)	5,0 - 7,0
Condutividade (25°C)	</= 1,3 uS/cm
Cloretos	</= 1,0 ppm ²
Amônio	</= 0,3 ppm
Ferro	Passa teste

¹ Farmacopeias: códigos onde se estabelecem, dentre outras coisas, os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos na área da saúde. A Farmacopeia Brasileira é o código oficial farmacêutico do país.

² ppm e ppb: partes por milhão e partes por bilhão – indicam a concentração em mg/L ou µg/L, respectivamente.

Cálcio	passa Teste
TOC (carbono orgânico total)	< 500 ppb
Nitratos	</= 0,2 ppm
Nitritos	</= 0,2 ppm
Formol	ausente
Cloro total	< 5,0 ppm
Cloro livre	< 5,0 ppm

Fonte: USP 30, NF 25, 2007.

• Segundo passo – Qualidade dos reagentes

Existem diferentes graus de pureza para um reagente químico, de acordo com o fim a que se destina. Quanto maior for o grau de pureza, maior será o custo do reagente.

Grau de pureza (p) é o quociente entre a massa de substância pura e a massa total da amostra.

Classificação dos reagentes de acordo com o grau de pureza

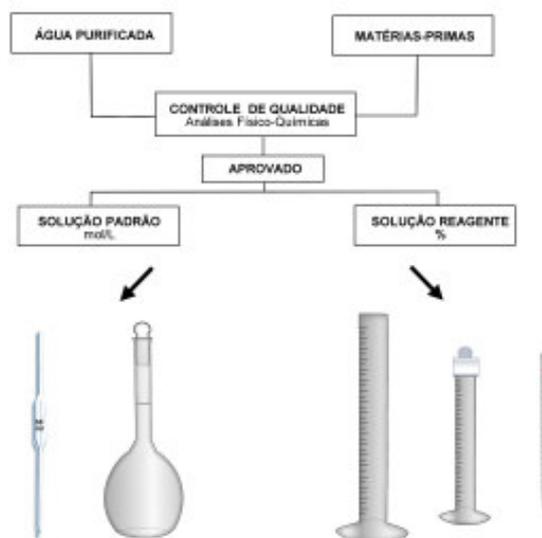
Grau de pureza	Classificação do reagente
Técnico ou comercial	Destinados a fins industriais, não requerem grau de pureza elevado.
Para análise (PA)	Substâncias de grau de pureza analítico, destinadas a análises físico-químicas, com baixos teores de contaminantes.
Substâncias Químicas de Referência (SQR)	Materiais de referência certificados utilizados na avaliação da conformidade dos insumos farmacêuticos e dos medicamentos, como referência de controle de qualidade.

Grau de pureza	Classificação do reagente
Ultrapuro	Substâncias de alto grau de pureza, destinadas a processos analíticos altamente sensíveis, como análises cromatográficas, espectroscópicas, etc.

As monografias de matérias-primas (insumos), constantes nas farmacopeias, contêm os ensaios de pureza e dosagens requeridos para os reagentes químicos.

- Terceiro passo – Qualidade da vidraria

As vidrarias corretas devem ser selecionadas: para o preparo de soluções padrão ou de concentração em quantidade de matéria, devem ser escolhidas vidrarias de precisão, como a pipeta e o balão volumétricos. Já para soluções expressas em composição percentual não há a necessidade de vidrarias tão precisas. Podem ser utilizadas, então, provetas, cilindros graduados e pipetas graduadas.



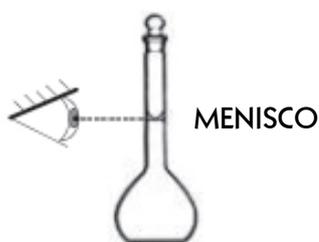
• Quarto passo – Qualidade na técnica de preparo da solução

1. Para soluções de soluto sólido, deve-se pesar o soluto em balança analítica, verificando antes de tudo se a mesma encontra-se calibrada e nivelada. O recipiente para pesagem pode ser um bécher, erlenmeyer, vidro de relógio ou naveta, e deve estar limpo e seco. Já para solutos líquidos, deve-se utilizar a pipeta.

2. Antes de abrir o frasco do reagente, ler o rótulo e verificar a presença de símbolos de risco, obedecendo às normas de biossegurança. Deve-se utilizar uma espátula para retirar a porção a ser pesada ou, no caso de substâncias líquidas, transferir pequena porção para outro recipiente e só então pipetar o líquido. Nunca devemos introduzir outro tipo de objeto no frasco de reagente, evitando contaminações. Também é importante não manipular diretamente com os dedos o recipiente de pesagem a fim de evitar que a gordura dos dedos influencie na leitura.

3. Após a pesagem, o soluto deverá ser transferido quantitativamente, ou seja, totalmente, para a vidraria escolhida: um balão volumétrico ou cilindro graduado. É adequado utilizar um funil e um bastão de vidro para auxiliar nessa transferência.

4. Em seguida, deve-se avolumar a solução, adicionando um volume de solvente até o traço de aferição da vidraria. É muito importante elevar ao nível dos olhos, observando a posição do menisco, evitando assim o erro de paralaxe.

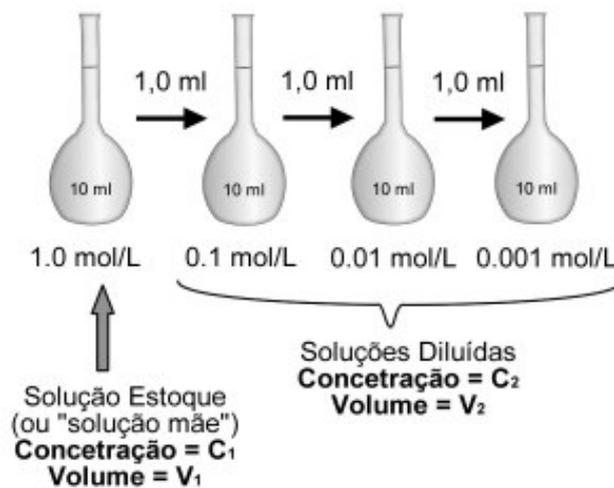


Obs: A sigla 'q.s.p.' aparece com frequência em soluções e formulações de produtos e significa 'quantidade suficiente para', ou seja, para completar o volume final.

A homogeneização da solução deve ser feita apoiando o fundo da vidraria com a palma de uma das mãos e segurando firmemente a tampa com a outra.

3.3.1. Diluição de soluções

Diluição é uma técnica em que se acrescenta solvente à solução. A quantidade de soluto permanece constante.

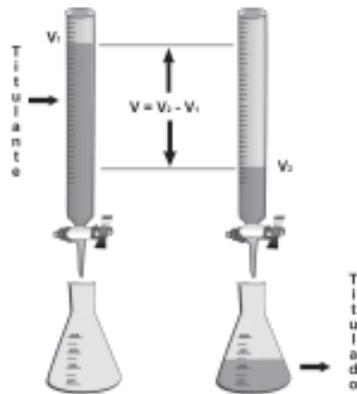


A equação geral para diluição a partir de uma solução concentrada (solução estoque) é:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

3.3.2. Titulação

A 'titulação' é uma técnica utilizada em análises volumétricas (ver item 4.1.5.1.3.), para a verificação da concentração das soluções preparadas em laboratório.



Para realizar uma titulação, emprega-se a bureta, que é uma vidraria de precisão, e utiliza-se uma solução padrão, de concentração conhecida (titulante). A substância para o preparo da solução padrão deve ser quimicamente estável, ter alto grau de pureza e ser adequada para reagir com a solução que se deseja analisar (titulado).

Fator de correção: Multiplicando a concentração pelo fator de conversão, f , obteremos a concentração real da solução. Caso o fator de correção seja maior que $1 \pm 10\%$, deve-se fazer uma diluição e, através de nova titulação, determinar a concentração.

$$f = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração desejada}}$$

3.3.3. Armazenagem de soluções

Nome: _____
 Concentração: _____ Fator: _____
 Data de validade: ____/____/____
 Instruções Específicas de Armazenagem
 Técnico Responsável

As soluções alcalinas, como a de hidróxido de sódio (NaOH), não devem ser guardadas em frascos de vidro, pois os hidróxidos 'atacam' o mesmo e dissolvem a sílica com formação de silicatos solúveis. O ácido

'atacam' o mesmo e dissolvem a sílica com formação de silicatos solúveis. O ácido

fluorídrico, HF, também reage com o vidro formando SiF_4 . Estas soluções devem ser conservadas em frascos de polietileno. Soluções que sofrem decomposição pela exposição à luz, como a de nitrato de prata, AgNO_3 , devem ser estocadas em frasco âmbar. As demais soluções podem ser armazenadas em frascos de vidro, bem fechados e rotulados.

4. Química analítica

A Química Analítica é o ramo da química que estuda a identificação e quantificação das substâncias que compõem uma amostra. Através das determinações analíticas é possível saber do que a amostra é feita e quanto de cada substância está presente.

O controle de qualidade das diversas matérias-primas e dos produtos industrializados que utilizamos, os resíduos gerados nesses processos produtivos, as reações químicas que acontecem na natureza e as pesquisas envolvendo a transformação de substâncias em novos produtos são áreas onde a química analítica está presente.

É importante destacar que as metodologias em Química analítica encontram-se disponíveis nas farmacopeias.

A seguir, temos a descrição das etapas de uma determinação analítica:

1. Planejamento e organização da análise
2. Estudo das propriedades da substância de interesse (analito)
3. Amostragem
4. Preparo da amostra para análise no laboratório (amostra laboratorial)
5. Seleção do método de análise – clássico ou instrumental?
6. Tratamento de dados / validação

4.1. Etapas de uma determinação analítica

4.1.1. Planejamento e organização da análise

O planejamento é a etapa mais importante de qualquer atividade laboratorial. Através dele é possível evitar a falta de insumos e materiais que comprometeriam o resultado de uma análise. É possível, também, organizar melhor a execução do trabalho, evitando situações de risco para os operadores e danos aos equipamentos, materiais e instalações

É sempre importante considerar que:

- Cada material tem o seu lugar específico.
- A bancada de trabalho deve estar livre de qualquer material que não faça parte da tarefa.
- A roupa de trabalho deve ser compatível com o tipo de atividade que está sendo executada.
- É preciso estar atento aos ruídos a sua volta.
- Ao terminar a atividade, deve ser feita a limpeza das bancadas.



4.1.2. Estudo das propriedades da substância de interesse (analito)

Ao analisar uma amostra, é importante reconhecer suas propriedades físico-químicas.

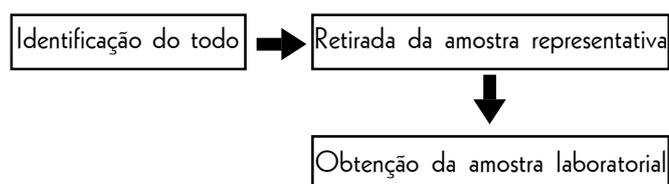
Uma propriedade físico-química é uma propriedade mensurável que descreve qualquer característica qualitativa ou quantitativa do analito.

Dependendo da complexidade e do tipo de amostra, podem ser preconizadas medidas de uma ou mais propriedades do analito para análise.

Propriedades qualitativas	Propriedades quantitativas
Identidade química	pH
Cor	Viscosidade
Sabor	Densidade
Odor	Condutividade
Textura	Ponto de fusão e ebulição
	Absorção e emissão de radiação

4.1.3. Amostragem

A amostragem de uma determinada substância para análise no laboratório deve ser efetuada de maneira a retirar uma porção homogênea do todo, chamada 'amostra representativa'. Para proceder uma amostragem correta, é necessário seguir três passos fundamentais:



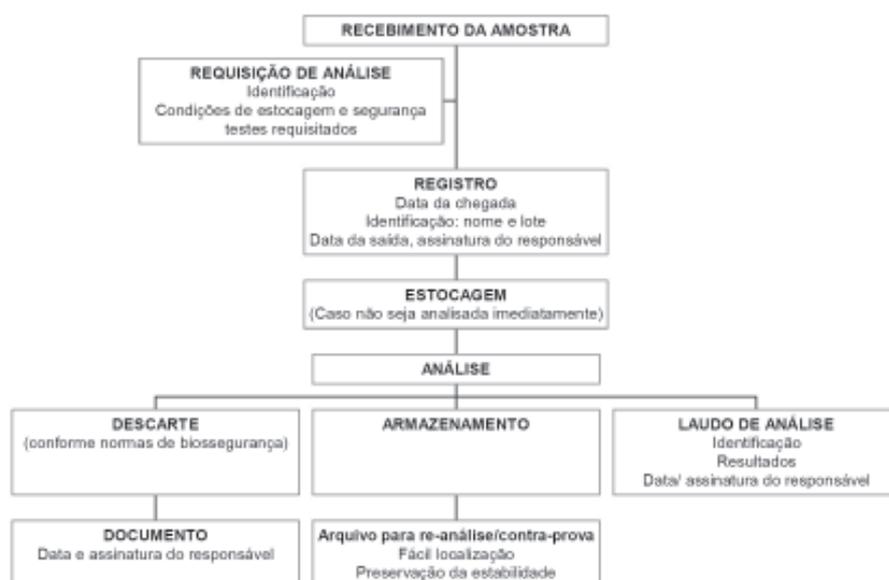
Para a obtenção de uma amostra representativa a partir de um material heterogêneo, é necessário dividir esse material, visualmente, em partes. Retirando-se porções de cada parte, aleatoriamente, temos a coleta de uma 'amostra aleatória'. A combinação da amostra aleatória constrói a amostra representativa.

Transporte da amostra

○ transporte da amostra representativa deve ser feito em recipientes apropriados, devidamente fechados e à temperatura adequada de forma a preservar a integridade da amostra durante o seu fluxo.

Deve haver Procedimentos Operacionais Padrão (POP) relativos à amostragem e que especifiquem as pessoas designadas a coletar amostras.

Fluxo da amostra no laboratório



4.1.4. Preparo da amostra para análise no laboratório (amostra laboratorial)

Algumas amostras necessitam de preparo antes de sua análise. Isso dependerá da complexidade da matriz a ser analisada.

As técnicas para obtenção da amostra laboratorial incluem:

- Trituração e dissolução
- Decomposição

- Extração (ver item 5.1.)
- Separação de misturas

Trituração e dissolução

Quando uma amostra é sólida, é necessário triturá-la e misturá-la para que a mesma se reduza a um pó fino e homogêneo. Para a trituração de amostras, usam-se gral (ou almofariz) e pistilo, feitos em porcelana ou ágata.

Após a trituração, o sólido geralmente passa por um processo de dissolução. O solvente utilizado dependerá da natureza química do sólido a ser dissolvido: para sólidos iônicos, a água e os alcoóis são os solventes mais utilizados. Para outros sólidos inorgânicos, geralmente são empregados ácidos (Tabela 1).

Tabela 1: Ácidos utilizados para dissolução de amostras

ÁCIDO	COMPOSIÇÃO (% em massa e densidade)	CARACTERÍSTICAS
HCl	37% 1,19g mL ⁻¹	Não oxidante. Dissolução de metais, carbonatos, óxidos, fosfatos e sulfetos. A composição constante em ebulição a 109°C é 20% de HCl. Forma cloretos voláteis com As, Sb, Ge e Pb.
HBr	48-65% 1,49g mL ⁻¹	Semelhante ao HCl na propriedade de solvente. A composição constante em ebulição a 124°C é de 48% de HBr.
H ₂ SO ₄	95-98% 1,84g mL ⁻¹	Bom solvente em sua temperatura de ebulição a 338°C. Ataca metais. Desidrata e oxida compostos orgânicos.

H_3PO_4	85% 1,70g mL ⁻¹	Dissolução a quente de óxidos refratários, insolúveis em outros ácidos. Torna-se anidro acima de 150°C. Desidrata a ácido pirofosfórico, $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-O-PO}_3\text{H}_2$, acima de 200°C e desidrata ainda a ácido metafosfórico, $[\text{HPO}_3]_n$, acima de 300°C.
HF	50% 1,16g mL ⁻¹	Dissolução de silicatos, pela formação de SiF_4 volátil. O excesso de produto é removido pela adição de HClO_4 ou H_2SO_4 , com aquecimento. Forma fluoretos voláteis com As, B, Ge, Se, Ta, Nb, Ti e Te. Forma precipitados com Ca. A composição constante em ebulição a 112°C é de 38% de HF.
HClO_4	60-72% 1,54-1,67g mL ⁻¹	Oxidante poderoso e explosivo, a quente e concentrado. Dissolução de matéria orgânica que já tenha sido parcialmente oxidada por HNO_3 a quente e levada próximo da secura, algumas vezes. A composição constante em ebulição a 203°C é de 72% de HClO_4 .
HNO_3	68% 1,51g mL ⁻¹	Oxidante. Dissolução de metais alcalinos, óxidos básicos e carbonatos, formando sais, como o nitrato de amônio. Reage explosivamente com cianetos, carbetos e pós-metálicos.

Fonte: Adaptado de Harris, 2001.

Também são comumente utilizadas misturas de ácidos para a dissolução de amostras. Uma das mais utilizadas é a chamada 'Água Régia', uma mistura de 'ácido nítrico' e 'ácido clorídrico' concentrados (proporção 1 para 3). É um líquido altamente 'corrosivo', de coloração amarela, e um dos poucos solventes que tem a capacidade de dissolver o 'ouro' e a 'platina', daí vem o

nome dessa mistura de ácidos: devido à propriedade de dissolver os 'metais nobres', 'régios'. A mistura é instável e perde seu poder de solvente rapidamente. Assim, seu uso deve ser imediato após o preparo.

É importante considerar os riscos de acidentes ao se manipular ácidos concentrados, os quais têm alto poder corrosivo. O uso de luvas adequadas, óculos de proteção e capela de segurança é essencial para o trabalho com ácidos.

Decomposição

A decomposição aplica-se a amostras de matéria orgânica e é efetuada, geralmente, na presença de solventes líquidos, como os ácidos nítrico e sulfúrico, ou água oxigenada, utilizando-se a ação das microondas ou digestão, como no caso da determinação de nitrogênio por Kjeldahl (ver item 4.1.5.1.4.).

Separação de misturas

As misturas são formadas pela união de duas ou mais substâncias, as quais não sofrem transformação, ou seja, ao serem separadas permanecem quimicamente inalteradas.

Ao contrário da substância pura, que possui temperaturas ou pontos de fusão e ebulição constantes e bem definidos, não é possível determinar experimentalmente estas propriedades físicas em uma mistura, com exceção das 'misturas azeotrópicas', que apresentam ponto de ebulição constante, e das 'misturas eutéicas', onde o ponto de fusão é constante.

As misturas são classificadas como 'homogêneas', as quais apresentam um só aspecto ou fase, e 'heterogêneas', onde é possível identificar duas ou mais fases.

Para a separação de misturas 'heterogêneas', têm-se principalmente os seguintes métodos:

Filtração: Processo que utiliza um filtro para efetuar a separação. Podemos proceder a filtração simples, adaptando o filtro de papel dobrado e ajustado conforme a figura (a) ao funil ou a filtração a vácuo (b), utilizada para misturas viscosas.

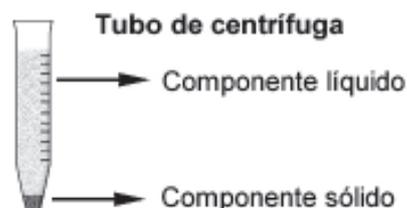


(a) Filtração simples



(b) Filtração a vácuo

Centrifugação: Processo que utiliza uma centrífuga que, por rotação em alta velocidade, separa misturas sólido-líquido, onde o componente sólido se deposita no fundo do recipiente. Muito utilizada para o preparo de amostras de sangue – separa o soro (parte líquida) do plasma (parte sólida).





Decantação: Utiliza um funil próprio, o funil de decantação, para a separação de misturas onde um dos componentes possui maior densidade, depositando-se no fundo do recipiente.

Para separação de misturas 'homogêneas', os métodos mais utilizados são: cristalização, destilação simples ou fracionada. Estes métodos serão estudados em 'Química orgânica' (item 5.1.).

4.1.5. Seleção do método de análise: clássico ou instrumental?

Os métodos em Química analítica são divididos em clássicos e instrumentais. A seleção do método de análise não depende somente da natureza química da amostra. É preciso levar em conta fatores como custo, equipamentos existentes no laboratório, quantidade de amostra disponível, demanda de análises e pessoal técnico envolvido.

Número de replicatas da amostra: Depende da quantidade de amostra disponível e da técnica analítica empregada. É importante trabalhar com replicatas, de forma a obter um resultado final confiável, pela média das determinações.

4.1.5.1. Métodos clássicos: gravimetria e volumetria

4.1.5.1.1. Gravimetria

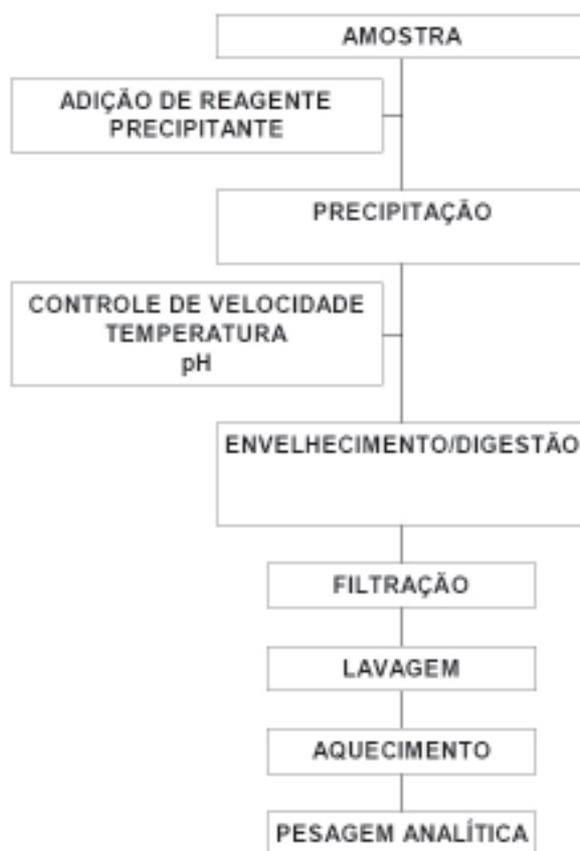
O princípio da análise gravimétrica ou gravimetria é a determinação da concentração de um ou mais analitos, de composição química definida, em uma amostra, através da pesagem. Antes de ser pesada, a substância a ser

analisada deve ser separada da amostra e, para isso, podem ser aplicadas reações de precipitação ou combustão.

Gravimetria por precipitação

Nesta análise, é adicionado um reagente à amostra, capaz de formar com o analito de interesse um composto insolúvel que se deposita (precipita) no fundo do recipiente. Esse reagente deve ser seletivo, ou seja, específico para o elemento ou substância que se deseja separar.

Étapas da análise gravimétrica por precipitação



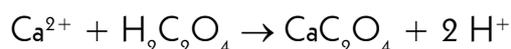
Exemplos de alguns metais determinados por gravimetria

Metal	Reagente precipitante	Precipitado formado*	Temperatura de aquecimento (°C)	Precipitado final para pesagem	Interferentes mais comuns
Ag	HCl/HNO ₃	AgCl	400	AgCl	Hg
Al	NH ₄ Cl/NH ₃	Al(OH) ₃	1.200	Al ₂ O ₃	Cr, Fe, Ni
Ca	H ₂ C ₂ O ₄	CaC ₂ O ₄	1.000	CaO	Metais(exceção alcalinos) e Mg
Fe	NH ₄ Cl/NH ₃	Fe(OH) ₃	850	Fe ₂ O ₃	Metais tetravalentes e Al, Ti, Cr
Ni	DMG (dimetil-glioxima)/NH ₃	Ni(DMG) ₂	120	Ni(DMG) ₂	Pd

* O precipitado formado deve ter as seguintes características:

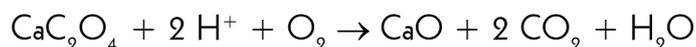
- Composição química definida (não sofrer contaminações).
- Não ser volátil, higroscópico ou solúvel.
- Ter aspecto e quantidade adequados para pesagem na balança analítica.
- Ser formado lentamente, com controle de parâmetros da reação de precipitação como: velocidade, temperatura e pH, de forma a obter um sólido com boas condições para filtração simples ou a vácuo.
- Passar por um processo de envelhecimento ou digestão, que consiste em uma série de modificações estruturais, visando ao seu aperfeiçoamento.
- Ser aquecido a altas temperaturas (geralmente em mufla) para obtenção do produto final estável a ser pesado.

Um exemplo da aplicação da gravimetria por precipitação é a 'determinação de cálcio em águas minerais'. O cálcio é precipitado como oxalato, CaC_2O_4 , pela adição de ácido oxálico:



Um cadinho deve ser tarado, até peso constante. O procedimento consiste em levar o cadinho à mufla, à temperatura de 1.000°C , por uma hora. Retira-se o cadinho, com o auxílio de luvas e uma pinça, e resfria-se em dessecador. Pesa-se. Esse procedimento deverá ser repetido até que a massa não apresente variação maior que 1%.

O precipitado de CaC_2O_4 , insolúvel, é coletado em papel de filtro, seco, transferido para o cadinho previamente tarado, e aquecido ao rubro à temperatura de 1.000°C , sendo convertido em óxido de cálcio, CaO , pela ação do oxigênio do ar:



Após a calcinação, resfria-se o precipitado, em dessecador, e pesa-se, até peso constante. Sempre se deve trabalhar com pelo menos uma duplicata da amostra.

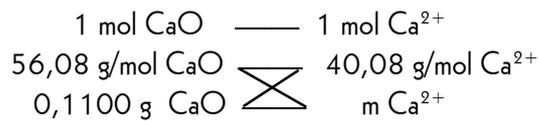
Simulando a análise de uma amostra de 200 mL de água, e considerando que a massa do cadinho tarado, até peso constante, é de 25,0000 g, o cálculo da concentração de cálcio na amostra seria:

Cálculo da massa de CaO :

$$(\text{massa do cadinho} + \text{massa do precipitado}) - \text{massa do cadinho} = \text{massa de CaO}$$

$$25,1100 - 25,0000 = 0,1100 \text{ g}$$

Cálculo da massa de Ca^{2+} na amostra após aquecimento ao rubro (calcinação):



$$\boxed{m \text{ Ca}^{2+} = 0,0786 \text{ g}} \rightarrow \text{Massa de cálcio em 200 mL de amostra de água}$$

Para expressão do resultado em termos percentuais, basta calcular a massa de Ca^{2+} para 100 mL de água:

$$m \text{ Ca}^{2+} / 100 \text{ mL} = 0,03931 \text{ g} \rightarrow \mathbf{0,03931\%}$$

4.1.5.1.2. Determinação do teor de cinzas

As cinzas constituem a fração mineral de amostras e contêm, em geral, cálcio, magnésio, ferro, fósforo, chumbo, sódio e outros componentes. O perfil das cinzas é comumente considerado como parâmetro geral de qualidade e frequentemente utilizado como critério na especificação de amostras diversas.

Para determinar o teor de cinzas, utilizam-se cadinhos previamente incinerados e tarados, como descrito no exemplo da determinação de cálcio. Pesa-se 3 g da amostra, sempre trabalhando no mínimo em duplicata. Leva-se à mufla, à temperatura de 600°C , até a eliminação completa do carvão. As cinzas deverão ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas, caso contrário, esfriar, adicionar 0,5 mL de água, secar e incinerar novamente. Deixa-se esfriar em estufa por vinte minutos, transferindo-se para um dessecador por mais vinte minutos. Finalmente, os cadinhos contendo as cinzas devem ser pesados, até a obtenção de peso constante. O cálculo do teor de cinzas é feito pela equação:

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \frac{mC}{mA} \cdot 100$$

Onde:

mC = massa das cinzas (g)

mA = massa da amostra (g)

Cinzas carbonatadas e sulfatadas

Algumas amostras contendo sais de metais alcalinos, que retêm proporções variáveis de dióxido de carbono nas condições da incineração, deverão ser tratadas, inicialmente, com solução de carbonato de amônio (cinzas carbonatadas) ou ácido sulfúrico diluído (cinzas sulfatadas) e, após secagem do excesso do reagente, incineradas e pesadas. A determinação de cinzas insolúveis em ácido, geralmente utilizando ácido clorídrico diluído a 10% (m/m), oferece uma avaliação do teor de sílica existente na amostra.

Cuidados com o uso da balança analítica nas análises gravimétricas

O coração da gravimetria é a utilização da balança analítica para a pesagem de amostras. Qualquer erro nesse procedimento acarretará em um resultado incorreto.

As balanças analíticas modernas trabalham com o emprego de circuitos eletrônicos que permitem medições precisas e, mesmo que seu aperfeiçoamento já não exija o uso de uma sala especial, é preciso levar em consideração as interações do equipamento com o ambiente.

A primeira coisa a se observar é a localização da balança analítica: ela deve estar sobre uma bancada fixa, à prova de impactos ou vibrações, e em sala fechada onde não existam intensas correntes de ar.

O nivelamento da balança deve ser checado pela observação da bolha de nível: caso não esteja centralizada, fazê-lo pela regulagem dos pés ajustáveis.

As janelas de vidro da balança devem permanecer fechadas durante a leitura da massa para evitar variações devido à entrada de correntes de ar.

Nunca se devem pesar amostras fora da temperatura ambiente: amostras aquecidas devem ser resfriadas no interior do dessecador e, no caso de amostras resfriadas, deve-se esperar até que a mesma atinja o equilíbrio térmico com o ambiente, evitando assim erros pela convecção de ar.

Ao manipular o recipiente usado para a pesagem, tomar o cuidado de não tocá-lo diretamente com as mãos, sempre usando uma toalha de papel ou uma gaze. A gordura e as impressões digitais influenciam na leitura da massa.

A calibração da balança deve estar dentro do prazo de validade estabelecido pelo fabricante. As balanças eletrônicas modernas possuem a opção de autocalibração, pela presença de pesos internos padrões de calibração. Caso a balança necessite de calibração, pelo uso de padrões de peso externos, é essencial que isso seja feito no próprio local onde a balança está instalada, evitando variações de condições ambientais, principalmente da aceleração gravitacional.

Antes de anotar o resultado da leitura da massa, deve-se aguardar a estabilização do valor que aparece no mostrador digital. Flutuações constantes e tendenciosas do valor podem demonstrar a ocorrência de algum problema na pesagem.

Finalmente, é valioso proceder a limpeza da balança após o seu uso, mantendo-a livre de substâncias contaminantes que possam danificá-la, usando um pincel limpo e macio e, se necessário, aplicando um pano limpo embebido em acetona, sem no entanto fazer movimentos bruscos que possam deslocar o prato da balança.

4.1.5.1.3. Volumetria

O princípio da análise volumétrica ou volumetria é a determinação da concentração de um ou mais analitos em uma amostra, através da medição do volume, utilizando a técnica de titulação.

Existem diferentes classificações para a titulação, de acordo com o tipo de reação química envolvida:

- Titulação ácido-base (a mais utilizada em laboratório)
- Titulação de oxirredução (ou redox)
- Titulação complexométrica
- Titulação de precipitação

Titulação ácido-base: o exemplo do preparo e titulação da solução padrão de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

O ácido clorídrico, HCl, P.A. não é uma substância padrão. Sua concentração é função da massa específica, igual a $1,19 \text{ g mL}^{-1}$, e sofre variações com o tempo. A solução de HCl na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ é muito utilizada no laboratório para reações químicas diversas e preparo de outras soluções.

O preparo da solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ se dá pela diluição do HCl concentrado. Para preparar, por exemplo, 1 L, deve ser feita a seguinte sequência de cálculos:

Dados: Concentração do HCl: 37% (m/m); Massa específica: $1,19 \text{ g mL}^{-1}$; Massa molar: $36,5 \text{ g/mol}$

1 – Cálculo da massa de HCl em $0,1 \text{ mol}$:

$$0,1 \text{ mol HCl} = \text{massa HCl} / \text{Massa molar HCl}$$

$$\text{massa HCl} = 0,1 \cdot 36,5 = 3,65 \text{ g}$$

2 – Correção da massa pela concentração do HCl:

$$\begin{array}{l} 37 \text{ g HCl} \text{ — } 100 \text{ g solução} \\ 3,65 \text{ g HCl} \text{ — } m \qquad \qquad \qquad m = 9,86 \text{ g} \end{array}$$

3 – Conversão da massa em volume:

$$\begin{array}{l} 1,19 \text{ g HCl} \text{ — } 1 \text{ mL} \\ 9,86 \text{ g HCl} \text{ — } v \qquad \qquad \qquad v = 8,29 \text{ mL} \end{array}$$

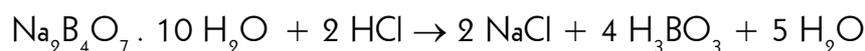
Deve-se transferir 8,29 mL de HCl concentrado para balão volumétrico com capacidade de 1.000 mL, contendo 500 mL de água (completar o volume até o traço de aferição). Homogeneizar.

Nunca derramar a água sobre o ácido, sempre o ácido sobre a água!

Para a titulação da solução preparada, utiliza-se bórax, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, como padrão primário. Transferir de 0,4 a 0,5 g de bórax, pesados exatamente, para *erlenmeyer* (trabalhar em triplicata), dissolvendo o padrão em 50 mL de água destilada. Adicionar algumas gotas do indicador metilorange.

A bureta deve ser rinsada pelo menos duas vezes com a solução de HCl a ser titulada, antes de ser preenchida totalmente e zerada.

A solução de HCl é adicionada ao padrão contido no *erlenmeyer*, até que ocorra a viragem de cor do indicador (do amarelo ao laranja). O volume gasto deve ser anotado, com precisão de 0,02 mL, e os valores deverão ser concordantes, caso contrário, repetir a titulação com mais alíquotas.



O 'erro de titulação' deve ser calculado pela realização do ensaio em branco, calculando-se o volume real de titulante gasto: $V_{\text{real de titulante}} = V_{\text{gasto de titulante}} - V_{\text{ensaio em branco}}$

Cálculo Final:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{massa do bórax}}{V \text{ de HCl (mL)} \cdot 0,1907}$$

Obs.: A partir da concentração obtida, calcular o fator de correção (conforme item 3.3.2.).

4.1.5.1.4. Determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl

O método desenvolvido por Kjeldahl, em 1883, vem sendo, desde então, adotado por laboratórios em todo o mundo como referência para a determinação de nitrogênio em amostras diversas.

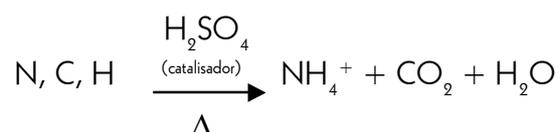
Embora tenham sido desenvolvidos aparatos instrumentais, incorporando avanços para a execução da técnica originalmente praticada com vidrarias adequadas para destilação, seu princípio foi mantido ao longo de mais de um século.



Aparato original

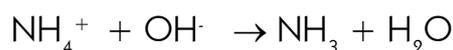
O princípio do método de Kjeldahl consiste em três etapas: digestão da amostra, destilação e titulação.

1. Digestão: O nitrogênio presente em uma amostra encontra-se combinado a outros elementos, como carbono e hidrogênio. A digestão é a conversão de todo o nitrogênio orgânico presente na amostra em íons amônio, NH_4^+ . Isso é possível tratando a amostra em ácido sulfúrico concentrado, a altas temperaturas. O processo de digestão da amostra é acelerado pela adição de pequena quantidade de um catalisador, que contém geralmente selênio, cobre ou titânio em sua composição:



Para proceder a digestão da amostra, deve-se pesar uma quantidade, com precisão, entre 0,1 e 0,5 g, transferindo-a quantitativamente para o balão de Kjeldahl. Adiciona-se 5 ml de H_2SO_4 e pequena quantidade do catalisador. Os balões são colocados no digestor e a temperatura ajustada a 50°C – após uma hora, aumentar lentamente até aproximadamente 300°C . A digestão deve ser feita sempre em duplicata e com a realização do ensaio em branco. ‘Todo o procedimento deve ser executado no interior da capela e com o uso dos EPI’s adequados.’ A digestão termina quando o líquido contendo a amostra ficar límpido.

2. Destilação: Após a obtenção dos íons NH_4^+ é realizada a destilação. Adiciona-se uma base forte, 10 mL de NaOH a 50% (m/v), para a conversão desses íons em gás amônia:



O gás NH_3 liberado e destilado é coletado em frasco contendo 10 mL de solução de ácido bórico, H_3BO_3 , a 2% (m/v) e algumas gotas de indicador misto. Sempre se deve usar o EPI adequado para o procedimento, que será realizado de acordo com o aparato disponível no laboratório.

3. Titulação: O destilado recolhido em ácido bórico deve ser titulado, utilizando solução padrão de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como solução titulante, até a viragem do indicador.

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrogênio Total} = \frac{V \cdot C \cdot f}{m} \cdot 0,014 \cdot 100$$

Onde:

V = volume de solução padrão de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ gasto na titulação (mL)

C = concentração em quantidade de matéria do HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$)

f = fator de correção da solução padrão de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

m = massa da amostra (g)

É possível ainda estimar o valor percentual de proteína na amostra, multiplicando o valor do nitrogênio total obtido por um fator de conversão, igual a 6,25: $\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogênio total} \cdot 6,25$

Vantagens e limitações dos métodos clássicos:

Os métodos clássicos oferecem uma relativa precisão para análise de substâncias em amostras, da ordem de $\mu\text{g mL}^{-1}$, ao mesmo tempo que necessitam de aparato simples para sua execução. Isso traz uma diminuição no custo da análise, já que vidrarias, fornos e balanças são materiais/equipamen-

tos básicos em um laboratório de Química. Porém, são necessários maiores volumes de amostra, o que nem sempre está disponível. Outra desvantagem é o maior tempo de duração das análises.

A presença de substâncias interferentes na amostra é outro ponto crítico. A eliminação destes interferentes implica na introdução de mais etapas na análise, o que aumenta ainda mais o tempo.

Outro problema é a produção de resíduos tóxicos em algumas reações, bem como o manejo e descarte desses resíduos, o que demanda a substituição da técnica por uma outra mais segura.

Erros na manipulação de vidrarias, preparo de soluções e pesagem têm grande impacto no resultado final da análise. É importante seguir os cuidados recomendados ao optar por esses métodos.

Cuidados com a vidraria

Em Química analítica, qualquer perda da amostra em análise é crítica. Vimos os cuidados com a pesagem, quase sempre a etapa inicial de um processo de análise, e a que requer maior precisão. Os cuidados com a limpeza do material utilizado, especialmente a vidraria, também são imprescindíveis para evitar perdas de amostra, por contaminação com outras substâncias.

A limpeza da vidraria deve ser feita inicialmente com água corrente, para retirada dos contaminantes mais solúveis. Após, deve-se mergulhar a vidraria em uma solução de detergente neutro, específico para materiais de laboratório, na concentração e no tempo recomendados pelo fabricante. Com o auxílio de uma escova adequada para cada tipo de vidraria, proceder a limpeza mecânica, enxaguando em

água corrente até a remoção completa do detergente. O enxágue final é sempre feito com água destilada ou deionizada. Vidrarias de maior precisão não podem ser levadas à estufa para secagem, pois a temperatura afeta a calibração das mesmas. Já as demais podem ser secas em estufa, a temperaturas de aproximadamente 60 a 90°C. Sempre se deve guardar as vidrarias limpas e secas.

Calibração de vidrarias de precisão

Para maior exatidão dos resultados em Química analítica, a calibração de vidrarias volumétricas deve ser feita, a fim de corrigir o volume que realmente está sendo medido. Utiliza-se a pesagem de volumes de água, de acordo com o volume de aferição do material. Para tanto, é importante anotar a temperatura, fazendo a correção do valor da massa específica, convertendo massa em volume. Isso é necessário, pois geralmente as vidrarias são calibradas à temperatura de 20°C, bem abaixo de nossa temperatura ambiente. Esse valor, corrigido, deverá ser considerado no cálculo final para a obtenção de resultados de análise.

Um exemplo seria o procedimento de calibração de uma pipeta volumétrica de 10 mL:

- É preciso colocar o recipiente para pesagem, de preferência um pesa-filtro, na balança analítica, e tará-lo (com a tampa).
- A pipeta a ser calibrada deve ser preenchida com água destilada, até um pouco acima do traço de aferição. Seca-se a ponta da pipeta, para remover qualquer excesso de água, e zera-se, respeitando a posição do menisco e evitando o erro de paralaxe.
- Retira-se então a tampa do pesa-filtro, transferindo-se o volume de 10 mL de água para o interior do mesmo, tampando-o em seguida, evitando assim qualquer perda de água por evaporação.

- Anota-se então a massa de água obtida e utiliza-se a equação seguinte para conversão dessa massa em volume (Tabela 2):

Volume real = $m \cdot v$

Onde:

m = massa de água

v = volume de 1 g de água tabelado

Tabela 2: Massa específica da água em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Massa específica da água (g mL ⁻¹)	Volume de 1g de água (mL)
10	0,9997026	1,0014
11	0,9996084	1,0015
12	0,9995004	1,0016
13	0,9993801	1,0017
14	0,9992474	1,0018
15	0,9991026	1,0020
16	0,9989460	1,0021
17	0,9987779	1,0023
18	0,9985986	1,0025
19	0,9984082	1,0027
20	0,9982071	1,0029
21	0,9979955	1,0031

22	0,9977735	1,00333
23	0,9975415	1,0035
24	0,9972995	1,0038
25	0,9970479	1,0040
26	0,9967867	1,0043
27	0,9965162	1,0046
28	0,9962365	1,0048
29	0,9959478	1,0051
30	0,9956502	1,0054

Fonte: Harris, 2001.

4.1.5.2. Métodos instrumentais

A análise instrumental é o estudo dos métodos que utilizam equipamentos para analisar os componentes de uma amostra.

Embora o método instrumental aumente o custo de uma análise pelo uso de equipamentos sofisticados, que demandam aparatos eletrônicos mais complexos, sua utilização vem sendo cada vez mais difundida nos laboratórios, já que estes conferem vantagens diante dos métodos clássicos, como maior precisão às análises bem como a possibilidade de determinar concentrações cada vez menores de analitos, simultaneamente e em menor tempo.

A seguir serão apresentados os métodos instrumentais mais utilizados nas análises químicas realizadas tanto no campo da pesquisa e desenvolvimento, como no controle de qualidade de produtos diversos.

4.1.5.2.1. Potenciometria

A potenciometria utiliza eletrodos (de referência e indicador) para medição de potenciais elétricos de espécies químicas em uma amostra, relacionando-os com a sua concentração. Os potenciais são gerados a partir de reações de oxirredução ou processos de migração seletiva de íons. Em laboratório, a maior aplicação desta técnica é na medição do pH de amostras.

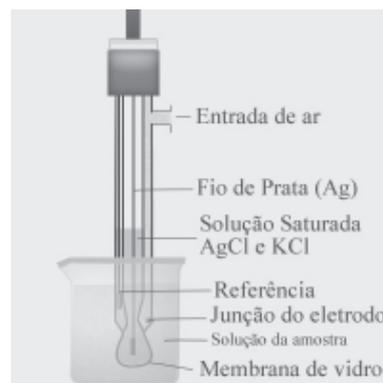
Medição do pH

O pH é expresso como a relação logarítmica da concentração de íons H^+ em uma amostra.

$$pH = - \log [H^+]$$



Utiliza-se para a medição do pH o equipamento chamado potenciômetro, ligado a um eletrodo íon seletivo de vidro (específico para íons H^+). Ele é combinado a um eletrodo de referência, de prata/cloreto de prata. A parte do eletrodo sensível aos íons H^+ é a fina membrana de vidro, em formato de bulbo, na parte inferior do eletrodo (por esse motivo, deve-se manter essa parte do eletrodo sempre hidratada). Na prática, a variação de potencial do eletrodo corresponde à concentração de íons H^+ na amostra. Antes de efetuar a leitura, o equipamen-



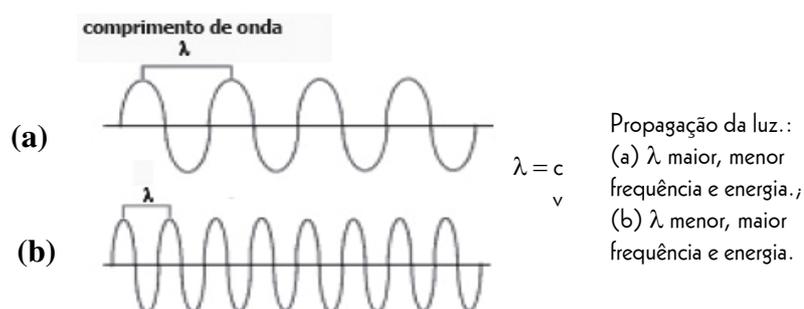
to deve ser calibrado pelo uso de soluções-tampão, de pH conhecido (geralmente nos valores 7,0 e 4,0, consecutivamente). O eletrodo deve ser lavado com água destilada a cada troca de solução e secado delicadamente, com papel de boa qualidade.

4.1.5.2.2. Fundamentos de espectrofotometria

A espectrofotometria é um método instrumental que utiliza a luz para medir as concentrações de substâncias químicas. Para entendermos como isso acontece, é preciso, em primeiro lugar, compreender o que é a luz e como ela se comporta.

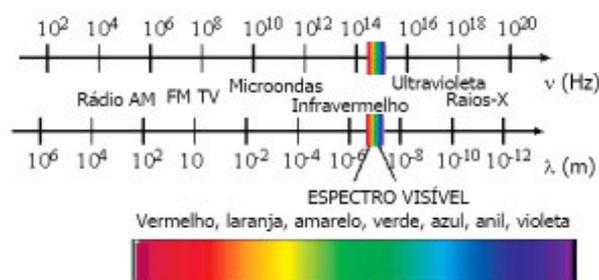
A luz é uma onda eletromagnética, constituída por partículas de energia, chamadas fótons, que se propaga no vácuo a uma velocidade igual a $3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$. A energia da luz é proporcional ao seu comprimento de onda (λ) e à frequência (ν) dessas ondas. O físico Max Planck, um dos fundadores da teoria quântica, determinou essa constante de proporcionalidade, chamada constante de Planck (h):

$$E = h \nu$$



As intensidades de luz, em função dos diferentes comprimentos de onda ou frequências, dão origem ao que chamamos de espectro da luz, ou

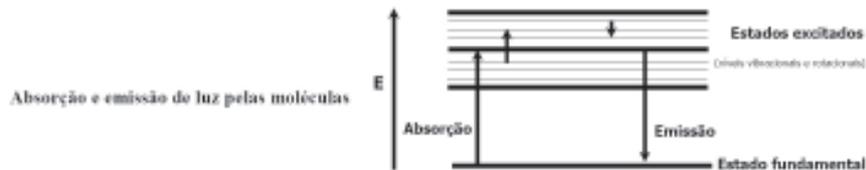
‘espectro eletromagnético’.



Observe que a luz que conseguimos enxergar é apenas uma pequena faixa de comprimentos de onda do espectro eletromagnético. Porém, há outras formas de energia que, embora não possamos ver, estão presentes em nosso dia a dia, como os raios ultravioleta do sol, o calor dos corpos fornecido pelo infravermelho, as microondas que utilizamos para aquecer alimentos, e os raios X, que têm poder de penetração em nossos corpos suficiente para fornecer imagens internas. No laboratório, a radiação ultravioleta é uma das mais aplicadas, já que sua grande energia faz com que ela atue como bactericida, sendo utilizada na esterilização de materiais.

Mas, afinal, o que ocorre ao incidirmos luz em uma substância? A energia dessa luz é absorvida pelas moléculas que formam a substância, aumentando a energia das mesmas. O efeito dessa ‘absorção’ dependerá do tipo de radiação incidente:

RADIAÇÃO	EFEITO NAS MOLÉCULAS
Microondas	Rotação
Infravermelho	Vibração
Ultravioleta/Visível	Promoção dos elétrons a níveis mais energéticos
Raios X	Rompimento de ligações/Ionização



Lei de Beer-Lambert

Ao incidirmos luz sobre uma amostra, parte dessa energia é absorvida e a outra é transmitida. É possível medir essa absorção de luz por determinados analitos presentes na amostra e relacioná-la à concentração destes, através de uma lei fundamental em química analítica: a Lei de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon b c$$

Onde:

A = absorvância (adimensional)

ε = absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = caminho óptico (cm)

c = concentração do analito na amostra (mol L^{-1})

Para entendermos como essa lei acontece na prática, precisamos conhecer o caminho percorrido pela luz, desde a fonte da radiação até a passagem pela amostra e detecção:



A fonte de luz dependerá da radiação que se deseja incidir e da técnica instrumental:

Visível – lâmpada halógena de quartzo (como a dos faróis de automóveis) ou de tungstênio.

Ultravioleta – lâmpada de arco deutério.

Infravermelha – *laser*.

Absorção atômica – lâmpada de catodo oco e lâmpada de descarga sem eletrodos.

A luz atinge o monocromador (prisma, filtro ou rede de dispersão), que tem a propriedade de selecionar apenas um valor de comprimento de onda. A radiação torna-se monocromática (uma só cor).

A radiação monocromática (P_0) incide sobre a amostra e é absorvida por determinados constituintes desta ('absorvância'). Ela passa através da amostra, percorrendo o caminho óptico, b .

A radiação não absorvida (P) é transmitida ('transmitância') e medida pelo detector, que tem a capacidade de converter a energia recebida em sinal elétrico. Esse sinal é transformado em um valor de absorvância, que pode ser lido na tela do equipamento.

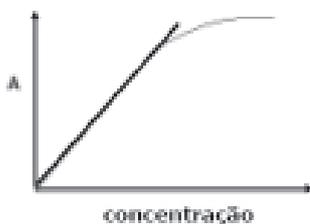
Relação entre absorvância e transmitância

A transmitância é a quantidade de luz não absorvida pela amostra dada pela equação: $T = P / P_0$

○ percentual de transmitância (%T) = 100 T

A absorvância é dada por: $A = \log_{10} P_0 / P$

Relacionando transmitância e absorvância, temos então:



$$A = \log_{10} 1 / T$$

$$A = \log_{10} 100 / \%T$$

$$A = 2 - \log_{10} \%T$$

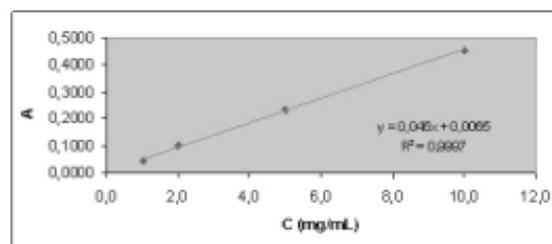
A 'relação linear' entre a concentração e a absorvância é simples e direta. Assim é correto expressar a Lei de Beer-Lambert usando a absorvância, A , como uma medida da absorção da amostra, em vez do %T. É importante destacar que a Lei de Beer-Lambert aplica-se a soluções diluídas. A relação linear entre a concentração e a absorvância é afetada quando a amostra está muito concentrada, pois as moléculas de soluto estão muito próximas e sua absorvidade molar, capacidade de absorver a radiação, é afetada por essa interação.

Espectrofotometria UV/Visível

Utiliza radiação na faixa do UV/Visível para determinação de analitos em uma amostra. Deve-se comparar a amostra a uma referência negativa, ou ensaio em branco, que contém todos os reagentes menos a substância de interesse, e a padrões da substância que se quer analisar, em concentrações conhecidas. Esses padrões devem ser preparados utilizando reagentes de alta pureza.

A curva de calibração, ou curva padrão, consiste num gráfico onde os valores de diferentes concentrações de padrão são colocados, de acordo com os valores de absorvância lidos para cada um deles.

Um exemplo da aplicação desta técnica é a determinação da concentração de proteína em amostras pelo método de biureto: ocorre a formação de um complexo colorido (violeta) pela reação das proteínas com o reagente de biureto – íons cobre (II) em meio básico. A absorvância de amostras e padrões (concentrações em mg/mL) é medida a um $\lambda = 555 \text{ nm}$.



Erros em análises espectrofotométricas UV/Visível: como evitá-los?

As análises espectrofotométricas exigem cuidados que vão desde o preparo das soluções a serem utilizadas até a leitura de absorvância pelo detector. As principais fontes de erros instrumentais em espectrofotometria estão relacionadas à seleção do comprimento de onda pelo monocromador, concentração da solução da amostra e posicionamento do compartimento de amostra. Todos esses fatores causam a dispersão da luz, acarretando erros na detecção e, conseqüentemente, na leitura dos valores de absorvância.

No preparo das soluções do ensaio em branco, padrões e amostras deve-se evitar a presença de partículas estranhas em suspensão, filtrando as soluções caso seja necessário. Essas partículas desviam o feixe de luz, prejudicando as leituras de absorvância.

Uma das principais fontes de erros está na seleção do comprimento de onda de trabalho. É preciso saber o comprimento de onda de absorção máxima para determinada substância presente na amostra, de forma a conseguir a máxima sensibilidade nessa análise, evitando possíveis interferências.

O monocromador deve ter a capacidade de selecionar o valor de comprimento de onda que se quer trabalhar, sem deixar que ele disperse. Porém, a largura da fenda para a saída da radiação selecionada deve ser a maior possível, possibilitando a chegada de luz ao detector. Quando o detector recebe pouca luz, isto resulta em uma menor relação sinal-ruído, reduzindo a precisão da medida da absorvância. Em geral, os equipamentos dispõem de dois monocromadores em série, que funcionam como filtros de comprimentos de onda, impedindo a passagem de radiações não desejadas para a amostra. A eficiência seletiva do monocromador também pode ser checada, através de padrões de calibração com valores de absorvância conhecidos, para determinados comprimentos de onda. Esses padrões são em geral fornecidos pelo próprio fabricante do instrumental.

Uma outra fonte de erros está na faixa de leitura da absorvância. Valores de absorvância não devem ser próximos de zero, tampouco acima de 1,0. A faixa ideal de trabalho, a qual garante a relação linear entre absorvância e concentração, de acordo com a Lei de Beer-Lambert, é de 0,1 a 1,0. Abaixo desta faixa, a absorvância da amostra se aproxima do ensaio em branco. Acima, a quantidade de luz que chega ao detector é muito pequena, já que há um maior número de moléculas da amostra absorvendo a radiação. Em ambas as situações, de amostras muito diluídas ou muito concentradas, há um aumento na incerteza do valor medido, gerando perda de precisão na análise.

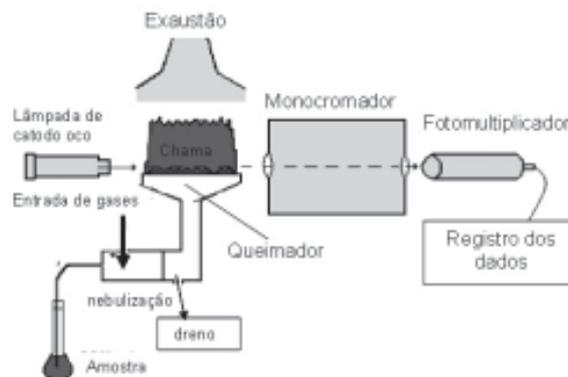
Também se destaca como fonte de erros o posicionamento correto do compartimento da amostra e a colocação e manipulação da cubeta. Deve-se tomar o cuidado de não tocar a superfície da cubeta por onde passa o feixe de luz, manipulando-a com o auxílio de papel de boa qualidade, que não deixe resíduos. Isso evita marcas de impressões digitais, as quais desviam a luz. Pelo mesmo motivo, também se deve observar o possível escorrimento de material pelas paredes externas da cubeta, limpando-as. Ao retirar e recolocar a cubeta, deve-se evitar movimentos bruscos, que possam vir a mover o suporte de alguma forma.

Também é crítico o fechamento do equipamento: caso o compartimento da amostra não esteja bem fechado, pode ocorrer a entrada de luz de fora do equipamento, introduzindo dispersão da luz. O perfeito fechamento deve também ser feito a fim de evitar a entrada de poeira.

Espectrofotometria de absorção atômica de chama

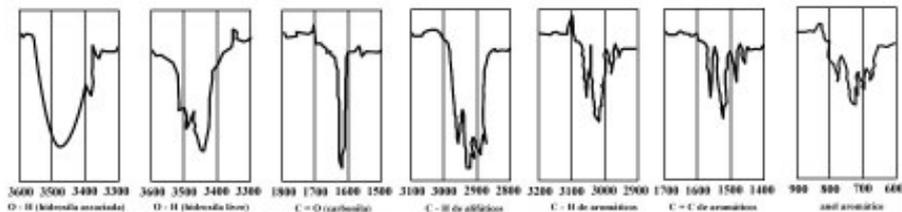
A espectrofotometria de absorção atômica de chama é o método de análise mais utilizado para determinação de metais em amostras. O princípio é a absorção de radiação pelo analito, na forma atômica gasosa, obtida pela introdução da amostra, na forma de aerossol (nebulização), em uma chama de ar/acetileno ou acetileno-óxido nítrico (temperaturas de 2.200 °C e 3.000 °C,

respectivamente). A absorção atômica é uma medida da população de átomos do elemento presente na chama e, portanto, da concentração do mesmo na amostra, segundo a Lei de Beer-Lambert.



Espectrofotometria de infravermelho

Este tipo de espectrofotometria (também chamado espectroscopia de infravermelho) é muito utilizado para a identificação de amostras, especialmente de grupos funcionais orgânicos. A técnica consiste na incidência de radiação infravermelha, que provoca vibrações nas moléculas do analito de interesse. Cada ligação química vibra em uma frequência específica (níveis vibracionais), dependendo dos tipos de átomos ligados e geometria da molécula, gerando um espectro característico da substância. Na figura ao lado, podemos observar as regiões espectrais características de alguns grupos funcionais.



4.1.5.2.3. Fotoluminescência

A fotoluminescência é a radiação eletromagnética emitida quando espécies químicas que foram previamente excitadas por fótons retornam para níveis de menor energia (em geral, o estado fundamental), processo que envolve elétrons de valência (desativação radiativa). No caso das moléculas, a fotoluminescência é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência e as técnicas analíticas que se baseiam respectivamente na medida destes parâmetros são a fluorimetria e a fosforimetria. A intensidade de radiação emitida é medida e relacionada à concentração do analito de interesse na amostra, segundo a Lei de Beer-Lambert. Experimentalmente, a fosforescência pode ser isolada da fluorescência com o uso de dispositivos seletivos: rejeita-se a luminescência de curto tempo de vida (fluorescência) permitindo a detecção da luminescência de longa duração (fosforescência).

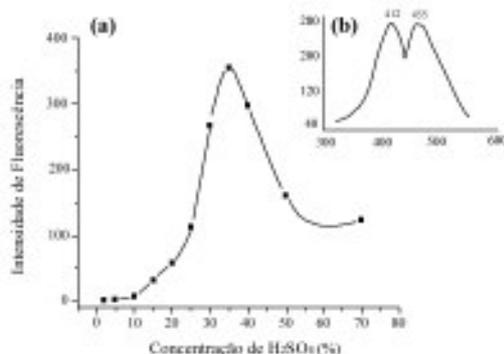
Fatores que afetam a luminescência

Para que ocorra a luminescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa. Embora seja difícil prever teoricamente se uma molécula exibirá luminescência sem o prévio conhecimento da diferença de energia relativa entre os estados excitado e fundamental, é possível, de um modo geral, observar alguns requisitos:

- Moléculas relativamente rígidas e ricas em elétrons π são potencialmente luminescentes.
- A fluorescência é um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência, sendo observável à temperatura ambiente e diretamente em soluções líquidas, caracterizando um procedimento experimental mais simples.
- A fosforescência, que é um processo com tempo de vida mais longo, necessita de condições especiais para ser observada. Estruturas moleculares rígidas naturalmente ou com o uso de algum artifício experimental são

fundamentais. Assim, o uso de meios sólidos ou organizados (micelas, por exemplo) e a ausência do contato com o oxigênio têm sido de grande utilidade para permitir a observação da fosforescência.

- A presença de grupos substituintes na molécula também é fator importante, pois afeta a intensidade e o tipo de luminescência. A presença de grupos hidroxí (-OH), cianeto (-CN) e sulfônico (-SO₃H), por exemplo, têm tendência a amplificar a fluorescência. Já grupos cetônicos (-C=O) carboxílicos (-COOH) e halogênios (-Cl, -F) favorecem a fosforescência.
- Outros fatores, tais como temperatura, pH do meio, solvente e presença de outras espécies, também têm profundo efeito nas características luminescentes, e uma substância, afetando não somente as velocidades dos processos luminescentes e dos processos não radiativos, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia.



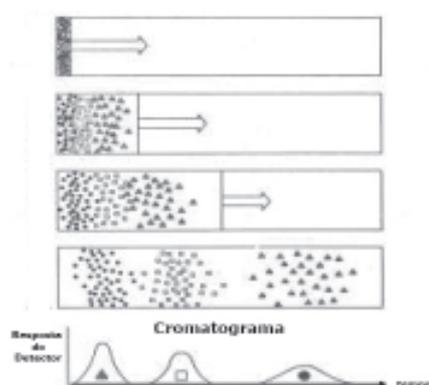
A luminescência pode ser induzida em moléculas naturalmente não luminescentes através de reações de derivação, que modificam a estrutura das moléculas e conseqüentemente suas propriedades físico-químicas, obtendo-se, assim, um derivado luminescente. Essas derivações podem ser feitas com

agentes oxidantes e redutores, derivação com agentes fluorogênicos ou fosfogênicos e após reações ácido-base. Existe também a possibilidade da formação de quelatos com íons de terras raras e derivação da molécula por meio de reações fotoquímicas (radiação UV). A figura ao lado mostra (a) a fluorescência do antibiótico eritromicina, observada em função da concentração

do meio ácido, e (b) o espectro de excitação/emissão do mesmo antibiótico após derivação fotoquímica com irradiação UV e aquecimento.

4.1.5.2.4. Cromatografia

O nome cromatografia vem do grego '*chroma*' = cor, e '*grafein*' = grafia. É uma técnica de separação baseada nas propriedades adsorptivas ou de partição dos componentes de uma amostra em um sistema cromatográfico. Os diferentes componentes são carregados por uma fase móvel através de uma fase estacionária, envolvendo interações (adsorção superficial, solubilidade relativa, carga elétrica, hidrofobicidade) entre um ou mais solutos e as duas fases. Os componentes são detectados, gerando um cromatograma, e quantificados.



Termos importantes em cromatografia:

Fase móvel: é o fluido que se move através da coluna cromatográfica (solvente, no qual a amostra está dissolvida). O solvente e a amostra fluem juntos através da fase estacionária.

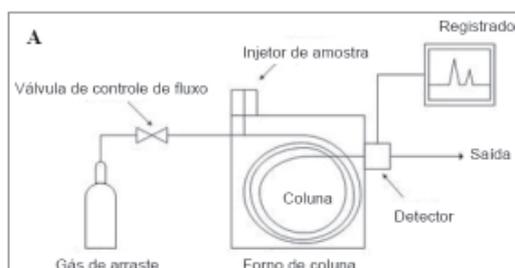
Fase estacionária: é o material adsorvente, sólido ou líquido, que não se move (material pelo qual os componentes da amostra a serem separados apresentam diferentes graus de interação) e está empacotado em uma coluna.

Soluto: é a substância em solução que se deseja separar.

Tipos de cromatografia

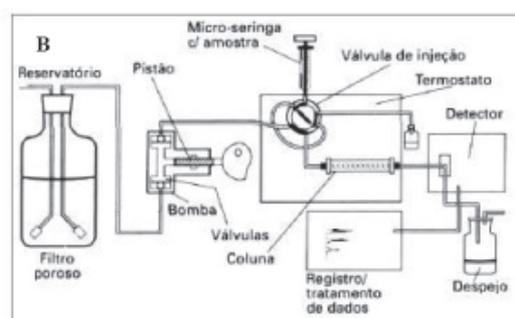
Cromatografia gasosa: a

fase móvel é geralmente um gás inerte (hélio, por exemplo). A fase estacionária é um adsorvente ou líquido distribuído na superfície de um suporte poroso inerte (esquema A).



Cromatografia líquida: a

fase móvel é um líquido de baixa viscosidade que flui através de um leito de fase estacionária. Se este leito for um adsorvente sólido através do qual, a uma alta pres-



são, se faz passar a fase móvel e a amostra, temos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); se a fase estacionária for um sólido iônico, temos a cromatografia de troca iônica (CTI); se a fase estacionária for um sólido poroso fazendo-se a separação em função do tamanho molecular, temos a cromatografia de exclusão por tamanho (CET) – um caso particular deste tipo de cromatografia é a usada, por exemplo, no estudo de polímeros, em que a fase estacionária é um gel, chamando-se por isso cromatografia de permeação de gel ou GPC (esquema B).

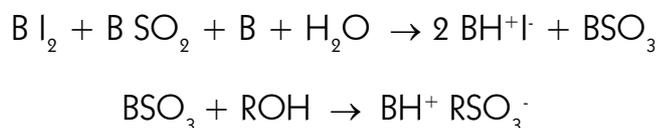
Cromatografia em camada fina: a fase móvel é um líquido de baixa viscosidade que elui através da fase estacionária, por capilaridade – mais vulgarmente ‘de baixo para cima’. A fase estacionária é um sólido (sílica ou alumina) depositado em camada fina e uniforme sobre um suporte sólido inerte.

4.1.5.2.5. Análise de umidade residual pelo método de Karl Fischer – titulação coulométrica

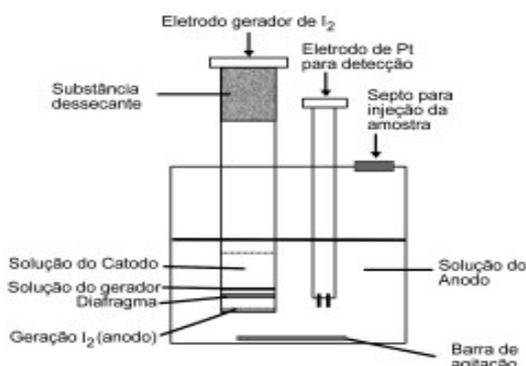
A titulação pelo método de Karl Fischer é a técnica mais utilizada para a determinação da umidade residual e aplica-se à análise de fármacos, alimentos, fluidos biológicos, derivados do petróleo, matérias-primas, amostras ambientais e outros produtos diversos.

Algumas vantagens do método coulométrico são a precisão, com a possibilidade de determinação de quantidades de água da ordem de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a necessidade de um pequeno volume de amostra e a redução no tempo de análise.

O princípio desse método baseia-se na reação entre a água da amostra e o iodo produzido na célula de titulação, na presença da solução de Karl Fischer, que contém dióxido de enxofre, (SO_2), álcool (ROH) e uma base (B) em sua composição:



O equipamento utilizado possui uma célula de titulação com dois eletrodos: um gerador de iodo, I_2 , que é consumido rapidamente pela reação com a água presente na amostra, e um eletrodo de referência de platina, que funciona como detector do ponto final de titulação, de acordo com o esquema a seguir.



A geração de iodo ocorre pela oxidação do I^- presente na solução de Karl Fischer a I_2 ('catodo').

A célula principal contém a solução de Karl Fischer ('anodo'), onde será injetado um volume conhecido da amostra.

A corrente elétrica entre os dois eletrodos é mantida constante pelo equipamento, até que, quando toda a água da amostra reage com o I_2 produzido, há um excesso do mesmo no interior da célula de reação, ocasionando uma queda brusca no potencial elétrico, detectado pelo eletrodo de platina.

4.1.6. Tratamento de dados

Estatística básica

Medidas de tendência central:

Média aritmética – É a mais comum das medidas de tendência central. É calculada somando-se as n observações originais da amostra e dividindo-se por n .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Amplitude (R) – É o valor que representa o afastamento entre o maior e o menor valor de um conjunto de observações.

Medidas de dispersão:

Variância (s^2) – A variância de um conjunto de dados é, por definição, a média dos quadrados das diferenças dos valores em relação à sua média, isto é:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

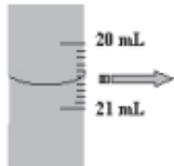
Desvio padrão (s) – O desvio padrão indica a dispersão dos dados dentro da amostra, isto é, o quanto os dados em geral diferem da média. Quanto menor o desvio padrão, mais parecidos são os valores da série estatística.

$$s^2 = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

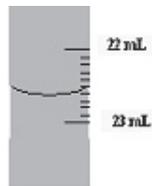
Propagação de incertezas

Em química analítica, estudam-se métodos envolvendo medição de volume, massa e absorvância. Os resultados finais destas medições são obtidos através de cálculos e possuem associadas as incertezas originais consideradas para a realização destes.

Um exemplo seria a leitura de volume em uma proveta, durante uma análise volumétrica:



O volume lido está entre 20,6 e 20,7 mL. Assim, devemos estimar o algarismo após o 6. Poderia ser: 20,61 ou 20,62 ou ainda 20,63. Portanto, escrevemos a primeira medida como: $20,62 \pm 0,01$.



Pelo mesmo raciocínio, o volume final lido seria $22,64 \text{ mL} \pm 0,01$. Qual o volume gasto na titulação?

$$22,64 - 20,62 = 2,02 \text{ mL}$$

Mas qual a incerteza associada a esse resultado final? É a soma das incertezas: $2,02 \text{ mL} \pm 0,02$

4.1.6.1. Validação

A validação de métodos analíticos deve ser feita para demonstrar que estes são adequados para a finalidade a que se destinam: determinação qualitativa ou quantitativa de analitos em uma amostra.

Para metodologias descritas em farmacopeias ou outros documentos oficiais, a metodologia será considerada validada. Em caso contrário, a validação deverá ser realizada através do estudo de parâmetros, segundo a tabela 3 a seguir, e de acordo com a categoria do método analítico (Anvisa, 2003).

Tabela 3 – Recomendação de parâmetros necessários para validação dos métodos analíticos e classificação dos métodos, segundo sua finalidade (USP 30, 2007)

Parâmetro de validação	Categoria	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
	I	Quantitativo	Qualitativo		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa	Sim	Sim	*	*	Não

*Pode ser exigido dependendo da natureza do ensaio específico.

Categoria I – Quantificação de macrocomponentes em substâncias ativas ou ingredientes ativos em produtos farmacêuticos acabados.

Categoria II – Determinação de impurezas em substâncias ativas ou componentes de degradação em produtos farmacêuticos acabados.

Categoria III – Determinação de características físico-químicas em substâncias ativas ou em produtos acabados (ex.: dissolução, tamanho de partículas, liberação da droga).

Categoria IV – Testes de identificação.

Parâmetros para validação de métodos analíticos

Para o estudo dos parâmetros de validação, é importante sempre utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, por outras autorizadas pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, o uso de padrões de trabalho é aceito, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

Descrição dos parâmetros de validação segundo a Resolução Anvisa RE 899 (2003), Inmetro, DOQ-CGCRE-008 (2003) e USP 30 (2007):

I – Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis na literatura. No caso de impurezas, podem ser utilizados dois procedimentos:

- Ensaio de recuperação: ensaio onde o analito de interesse é adicionado à matriz da amostra.
- Avaliação da exatidão sem a matriz: preparam-se pelo menos duas amostras do analito, com precisão quantitativa, e os resultados da % de recuperação são calculados.

II – Precisão

Avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetitividade (precisão intracorrída); precisão intermediária (precisão intercorrídas) e reprodutibilidade (precisão interlaboratórios).

- Repetitividade: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetitividade do método é verificada por pelo menos nove determinações, dentro do intervalo linear do método, que será descrito mais adiante.

- **Precisão intermediária:** concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.
- **Reprodutibilidade:** concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, geralmente feitos através de estudos colaborativos, aplicados à padronização de metodologias analíticas.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação, CV%, de uma série de medidas, que é calculado pela fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \cdot 100$$

Onde:

DPR = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

O valor máximo aceitável para o DPR é de 5%.

III – Especificidade

Capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Testa-se a especificidade de métodos qualitativos comparando a aplicação do método em amostras contendo o analito de interesse com amostras que não o contém, porém possuem substâncias de estrutura química semelhante. O método precisa demonstrar a seletividade para o analito, mesmo em presença destas substâncias.

Para análises quantitativas, pode-se comparar os resultados obtidos para amostras contaminadas com impurezas adicionadas em quantidades determinadas com amostras isentas de contaminantes. O resultado final não deve ser afetado pela presença das substâncias adicionadas.

IV – Limites de detecção e quantificação

Parâmetro de ensaios quantitativos para baixos níveis de compostos em matrizes de amostras. O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e rigor aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

V – Linearidade

A linearidade do procedimento analítico é a sua capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma faixa de concentração. Deve ser construída a curva padrão experimental e devem ser calculados: o coeficiente de correlação, r , que precisa ser no mínimo igual a 0,99; a interseção com o eixo Y ; o coeficiente angular; a soma residual dos mínimos quadrados da regressão linear; e o desvio padrão relativo. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de pelo menos cinco concentrações diferentes, com teor de analito contido entre 80% e 120% da concentração teórica do teste.

VI – Faixa

Intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente, é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método.

O 'protocolo de validação' é um documento completo, que contém todos os parâmetros avaliados para a validação de determinado método.

Modelo de Protocolo de Validação

<p>Considerações gerais:</p> <p>Objetivo</p> <p>Laboratório/Setor responsável</p> <p>Especificações do método</p> <p>Classificação do método em validação</p> <p>Parâmetros de validação aplicáveis ao método</p> <p>Siglas</p> <p>Referências bibliográficas</p> <p>Material/Vidraria/Equipamentos (marca, modelo, data da calibração)</p> <p>Reagentes (marca, fornecedor, data de validade)</p>
<p>Descrição dos parâmetros de validação aplicáveis ao método</p> <p>Testes/Resultados da validação</p>
<p>Estimativa da incerteza dos resultados obtidos através do método</p>
<p>Conclusão</p>
<p>Folha de aprovação</p> <p>Assinaturas dos responsáveis pela validação</p>

A metodologia analítica deverá ser revalidada caso sejam efetuadas mudanças na síntese da substância ativa, na composição do produto acabado ou no procedimento analítico.

5. Fundamentos em química orgânica

A química orgânica é o ramo da química que estuda as substâncias que contêm átomos de carbono em sua composição. O átomo de carbono, por ser tetravalente, se une a outros átomos formando quatro ligações covalentes. Assim, o carbono tem a capacidade de formar longas cadeias, chamadas cadeias carbônicas.

As substâncias orgânicas são classificadas de acordo com o seu grupo funcional característico.

Funções orgânicas mais importantes

Função orgânica	Grupo funcional	Exemplo
Hidrocarboneto	C_xH_y	CH_4 Metano
Ácido carboxílico	R-COOH	CH_3-COOH ácido etanoico (ácido acético)
Aldeído	R-CHO	CH_3-CHO etanal
Amida	R-CONH ₂	CH_3-CONH_2 etanamida
Amina	R-NH ₂	$CH_3-CH_2NH_2$ etanamina
Álcool	R-OH	CH_3-CH_2OH Etanol (álcool etílico)
Cetona	R ₁ -CO-R ₂	$CH_3-CO-CH_3$ propanona (acetona)
Éster	R ₁ -COOR ₂	$HCOO-C_6H_5$ metanoato de fenila
Éter	R ₁ -O-R ₂	$CH_3CH_2-O-CH_2CH_3$ Etoxietano (éter etílico)
Fenol		 o-hidroximetil benzeno (o-cresol ou creolina)

A química orgânica experimental envolve reações de síntese e purificação, caracterização de grupos funcionais, separação, purificação e estudo das propriedades das substâncias orgânicas.

5.1. Técnicas de separação e purificação

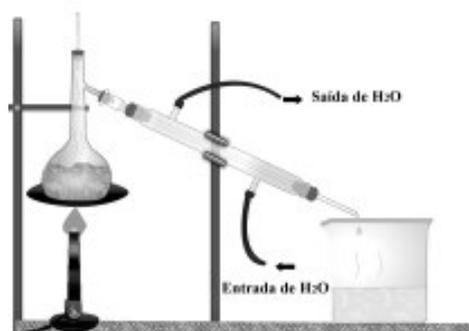
5.1.1. Extração

A extração é um método onde se utiliza um solvente, que dissolve o analito de interesse em uma amostra seletivamente, separando-o da mesma. A extração pode ser em fase líquida ou sólida, as quais apresentam as seguintes características principais, descritas no quadro abaixo:

Extração líquida	Extração sólida
Solventes orgânicos (ex.: acetona, hexano, acetato de butila, dióxido de carbono)	Fase sólida (ex.: sílica-C18, resinas de troca iônica)
Microondas ou aparato próprio para extração	Coluna cromatográfica ou seringa
Aquecimento	Não necessita aquecimento
Remoção do solvente aumenta o custo da análise	Reduz o uso de solventes orgânicos

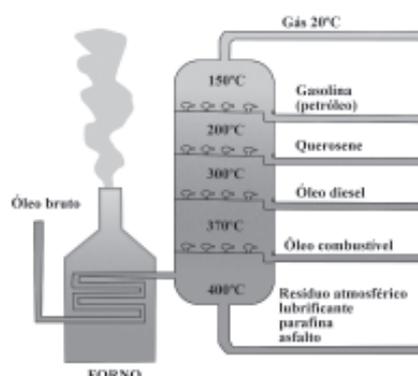
5.1.2. Destilação simples

É um processo de separação de misturas homogêneas sólido-líquido ou líquido-líquido (desde que a diferença das temperaturas de ebulição entre os componentes seja alta), onde ocorre a vaporização e condensação do componente mais volátil. A técnica da destilação simples é utilizada para obtenção de solventes puros e muito empregada na produção de bebidas destiladas.



5.1.3. Destilação fracionada

É uma técnica utilizada para separar misturas homogêneas líquidas, pela vaporização e condensação dos componentes da mistura, baseando-se na diferença de ponto de ebulição entre esses componentes. As aplicações da destilação fracionada são principalmente relacionadas à separação dos componentes (frações) do petróleo.



5.1.4. Cristalização

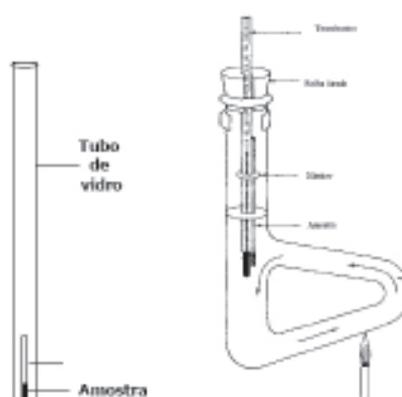
A cristalização é um método de separação e purificação de soluções líquidas, ou sólido-líquidas, onde são obtidos cristais puros de um dos componentes, o soluto, sendo o método mais adequado para a purificação de substâncias sólidas. As etapas principais do processo são:

- Nucleação – A partir do preparo de uma solução supersaturada, as moléculas do soluto se unem, formando alguns núcleos microscópicos. Ao atingirem a estabilidade e determinado tamanho, estes núcleos se organizam em uma estrutura cristalina. Essa organização dependerá de fatores como a temperatura e a concentração da solução supersaturada.
- Crescimento dos cristais – A partir dos núcleos ocorre o crescimento dos cristais, a uma velocidade relacionada à supersaturação da solução. Os cristais têm formas e tamanhos diferentes, dependendo das condições em que se efetua sua obtenção, o que se torna um grande desafio quando se trata de processos industriais de cristalização.

5.1.5. Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão é a temperatura constante na qual uma substância muda do estado físico sólido para o líquido. A determinação desta propriedade é fundamental para a caracterização de substâncias puras. A técnica pelo 'método do tubo de Thiele' consiste em colocar pequena quantidade da substância sólida, previamente pulverizada, no interior de um tubo capilar, fechado em uma das extremidades.

A introdução da substância deve ser feita empurrando a extremidade aberta contra o sólido, com o auxílio de uma espátula. Para a compactação da substância no fundo do capilar, deve-se soltá-lo no interior de um tubo de vidro. O capilar deve ser preso a um termômetro, o mais próximo possível do bulbo. O ponto de fusão é a temperatura na qual aparece a primeira gota de líquido e desaparece o restante da parte sólida da substância em análise.



Fonte: Constantino, 2009

Resumo do capítulo

A química é uma ciência essencialmente experimental, que se divide em quatro ramos principais: química inorgânica, orgânica, analítica e físico-química. O laboratório é o local mais importante para o desenvolvimento desta ciência. Para a realização de atividades laboratoriais, é imprescindível reconhecer os diversos materiais, equipamentos, substâncias, fontes de consulta bibliográfica, símbolos e normas de segurança, e apresentar uma postura adequada.

O preparo de soluções é uma das tarefas principais dentro de um laboratório e engloba: qualidade da água, dos reagentes, da vidraria e da técnica de preparo, bem como o conhecimento das unidades de concentração (quantidade de matéria, massa por volume, massa por massa e volume por volume), cálculos de diluição e procedimentos de armazenagem.

O ramo da química que estuda a identificação e quantificação das substâncias que compõem uma amostra é a química analítica. As principais etapas de uma determinação analítica são: planejamento e organização da análise; estudo das propriedades do analito; amostragem; preparo da amostra laboratorial; seleção do método de análise – clássicos (gravimetria e volumetria) ou instrumentais (potenciometria, espectrofotometria UV/Visível, absorção atômica, infravermelho, fotoluminescência e cromatografia) – e tratamento de dados/validação. O controle de qualidade das diversas matérias-primas e dos produtos industrializados, os resíduos gerados nesses processos produtivos, as reações químicas na natureza e as pesquisas envolvendo a transformação de substâncias em novos produtos são áreas onde a química analítica está presente. Os requisitos de qualidade para diversos produtos na área da saúde são estabelecidos pelas farmacopeias. A Farmacopeia Brasileira é o código oficial farmacêutico do país.

A química orgânica é o ramo da química que estuda as substâncias que contêm átomos de carbono em sua composição, as quais são classificadas de acordo com o seu grupo funcional característico. A química orgânica experi-

mental envolve reações de síntese e purificação, caracterização de grupos funcionais, separação, purificação e estudo das propriedades físico-químicas.

Questões para reflexão

1) Um técnico de laboratório preparou uma solução aquosa de sulfato de cobre, armazenando-a em um recipiente de vidro, na geladeira. Algum tempo depois, ele observou a presença de um precipitado de sulfato de cobre no fundo do recipiente. O técnico decidiu, então, aquecer a solução, sob agitação, até que o precipitado dissolvesse completamente. Logo após, deixou a solução em repouso sobre a bancada até que a mesma atingisse a temperatura ambiente. O técnico observou que a solução permaneceu homogênea. Explique o que aconteceu antes e depois do aquecimento da solução.

2) Descreva, com as suas palavras, a sequência correta a ser seguida para o preparo de um litro de uma solução salina (ou soro caseiro) na concentração de 0,9% (m/v). Liste os materiais, reagentes, equipamentos, procedimento (técnica de preparo e armazenagem) e cálculos necessários. Reflita sobre os cuidados gerais a serem adotados quando do preparo de soluções.

3) Um técnico recebeu uma amostra de água deionizada para análise no laboratório. Descreva o procedimento a ser seguido, desde o recebimento dessa amostra até o seu descarte, incluindo as etapas para a realização das determinações analíticas, preconizadas pela farmacopeia, para esse tipo de amostra.

Bibliografia Consultada

ALVES, L. *Equipe Brasil Escola*. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/quimica/producao-etanol.htm>>. Acesso em: 25 maio 2009.

ANVISA. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução RE 899, 2003.

_____. *Critérios para a Habilitação de Laboratórios Segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL)*. Procedimento GGLAS 02/BPL. Revisão 00. Brasília, 2001.

AQUINO, F. R. N.; NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

BUYS, B. Inovação: parceria gera tecnologia para otimizar produção em refinarias. *Un Kemp*, v.3, n. 3, 2007.

CARVALHO, P. R. *Boas Práticas Químicas em Biossegurança*. Rio de Janeiro: Interciência, 1999.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. *Statistics for Analytical Chemists*. New York: Chapman and Hall, 1983.

CHAVES, M. H. *et al. Apostila de Química Orgânica Experimental I*. UFPI. Centro de Ciências da Natureza-Departamento de Química, 2003.

CIOLLA, R. *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho: HPLC*. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

COLLINS, H. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7. ed. Campinas: Unicamp, 1997.

CONSTANTINO, L. *Técnicas de Laboratório*. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL). Disponível em: <<http://www.ff.ul.pt/paginas/constant/tl/tecnicas/pfusao.html>>. Acesso em: 5 jun. 2009.

ESTATÍSTICA PARA VALIDAÇÃO DE ENSAIOS. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2002.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Parte III. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FDA. *Guidance for Industry – analytical procedures and methods validation, chemistry, manufacturing and controls documentation*. USA, 2000.

FINETE, V. L. M. *Desenvolvimento de Métodos Espectrofluorimétricos para a Determinação de Eritromicina e Canamicina e Aplicabilidade na Vacina contra a Febre Amarela*, 2005. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica.

FINETE, V. L. M.; AUCÉLIO, R. Q.; ARISSAWA, M. Fluorimetric method for the determination of erythromycin using a photochemical derivatization approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 7, p. 1.418-1.422, 2008.

- HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- HARTWIG, D. R.; SOUZA E. de; MOTA, R. M. *Química Orgânica*. São Paulo: Scipione, 2000.
- INMETRO. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. DOQ-CGCRE-008, 2003a.
- _____. *Critérios para o Credenciamento de Laboratório de Ensaio – BPL – Aplicação a estudos de campos*. NIT-DICLA-034. Revisão 00, 2003b.
- MALDANER, O. A. *Química 1: construção de conceitos fundamentais*. 2. ed. Ijuí: Unijuí, 1997.
- MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes*. São Paulo: Edgard Blücher, 1995.
- RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.
- ROMANELLI, L. I.; JUSTI, R. S. *Aprendendo Química*. Ijuí: Unijuí, 1998.
- SARDELLA. *Química. Sério novo Ensino Médio*. Volume único. São Paulo: Ática, 2000.
- SCHULMAN, S. G. *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: physicochemical principles and practice*. New York: Pergamon Press, 1977.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- SKOOG, D. *Princípios de Análise Instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: 2002
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, B. C. *Química Orgânica*. V. 1 e 2. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001.
- TITO, M. R.; CANTO, E. L. do. *Química*. Coleção base. Volume único. 3. ed. São Paulo: Moderna, 2003.
- USP30-NF25. American Pharmacopeia, 2007.
- VOGEL, A. *Análise Orgânica Qualitativa*. Química orgânica. V. 1, 2 e 3. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico e Científico, 1980.

Anexos

Anexo 1

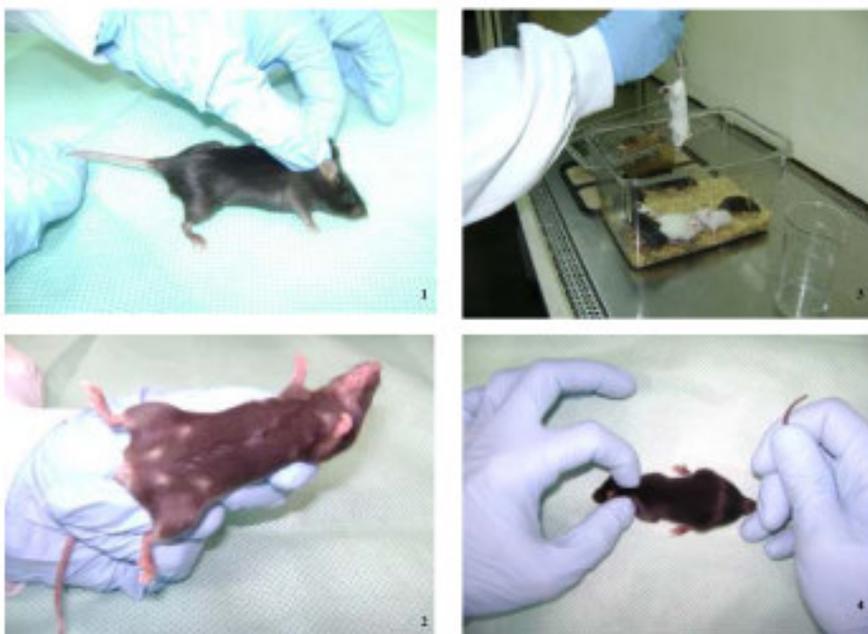


Figura 1 – Contenção manual de camundongo. Imobilização pela dobra dorsal da pele e cauda.

Figura 2 – Contenção com uma das mãos.

Figura 3 – Contenção com auxílio de pinça de dissecação.

Figura 4 – Eutanásia. Contenção pela cauda e fixação digital da cabeça.

