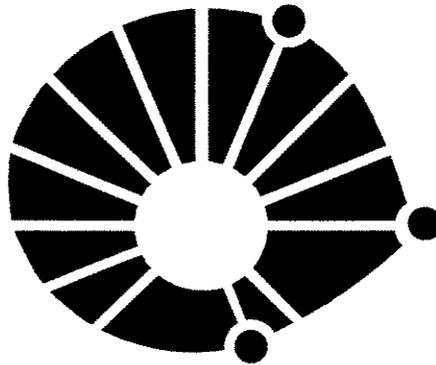


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

ENIARA PIMENTA MOCELLIN

**PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA
EM
LABORATÓRIO DE DNA FORENSE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Legal e Deontologia.

PIRACICABA

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

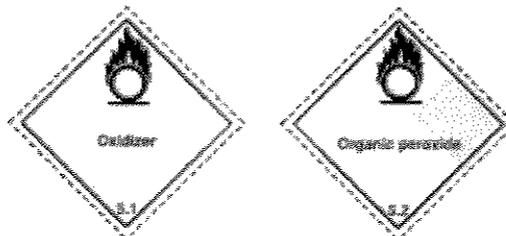
Classe 3 Líquidos Inflamáveis



Classe 4 - Sólidos Inflamáveis Espontaneamente Combustíveis Perigosos Quando Molhados



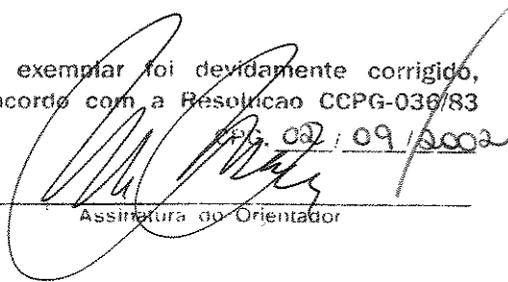
Classe 5 - Agentes Oxidantes-Peróxidos Orgânicos



ENIARA PIMENTA MOCELLIN

**PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA
EM
LABORATÓRIO DE DNA FORENSE**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83


Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Odontologia Legal e Deontologia.

Orientador: Dr. Nelson Massini

Coorientador: Dr. Eduardo Daruge Júnior

Banca Examinadora:

Dr. Nelson Massini

Dr. Eduardo Daruge

Dr. Luiz Francesquini Júnior

Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano

PIRACICABA

2002

UNIDADE BO
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M714p
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51140
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 01/10/02
Nº CPD _____

CM00174630-6

BIBID 260351

Ficha Catalográfica

M714p Mocellin, Eniara Pimenta.
Procedimentos de biossegurança em laboratório de DNA forense / Eniara Pimenta Mocellin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xxii, 248p. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Nelson Massini, Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Medicina legal. 2. Segurança no trabalho. 3. Perícia médica. 4. Prevenção de acidentes. 5. Riscos ocupacionais. 6. Laboratórios – N. I. Massini, Nelson. II. Daruge Júnior, Eduardo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2002, considerou a candidata ENIARA PIMENTA MOCELLIM BERNARDI aprovada.

1. Prof. Dr. NELSON MASSINI

2. Prof. Dr. LUIZ FRANCESQUINI JUNIOR

3. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

DEDICATÓRIAS

O Senhor é meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor ao seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale das sombras e da morte, não temeria por mal algum, porque tu estás comigo; tua vara e teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença de meus inimigos, unges minha cabeça com óleo, meu cálice transborda.

Que a bondade e a misericórdia me sigam por todos os dias de minha vida e que a morada do senhor seja minha casa pelo todo sempre.

Salmo 23

Ao meu pai, Enio e a Ivone. Sem apoio e incentivo de vocês certamente não chegaria com tanto êxito ao fim desta jornada.

A minha mãe, Sara, que tanto me auxiliou nas ausências do lar.

Aos meus filhos Júlio e Marcel pela compreensão das horas ausentes.

Ao meu irmão Marcelo, *in memoriam*.

Aos amigos do curso de pós-graduação, que participaram diretamente, ou indiretamente na elaboração deste trabalho. Meu muito obrigado pelas conversas e pelo apoio. Em especial a Andréia, Augusto, Célio, Cristiane, Helisson, Febe, Isa, José Carlos, Jorge, Gilberto, Luis Renato, Radicchi, Romildo, Presa, Queiroz, Sérgio , Simone e Vinicius.

Aos mestres, com carinho, meu muito obrigado. Em especial aos
professores Dr. Eduardo Daruge e Dr. Nelson Massini

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela oportunidade, profissionalismo e espírito científico com as quais nos formaram.

A todos os Professores do Departamento de Odontologia Social pelo carinho e atenção.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia. Em especial meu sincero agradecimento ao Dr. Luis Franchesquini pela orientação compreensão e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS.....	4
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 NOÇÕES BÁSICAS DE DNA.....	13
2.1.1 <i>Análise do DNA mitocondrial</i>	15
2.1.2 <i>Procedimentos de análise</i>	17
2.1.3 <i>Genes alelos</i>	19
2.1.4 <i>Processo de tradução</i>	20
2.1.5 <i>Processo de transcrição</i>	21
2.1.6 <i>Principais técnicas utilizadas em Laboratório de DNA forense</i>	23
2.1.6.1 <i>Fingerprinter DNA (impressão de DNA)</i>	25
2.1.6.2 <i>Sondas</i>	26
2.1.6.3 <i>Southern Blot</i>	26
2.1.6.4 <i>Reação de hibridização</i>	28
2.1.6.5 <i>VNTRs</i>	30
2.1.6.5.1 <i>Dificuldades técnicas</i>	32
2.1.6.6 <i>Técnica de RFLP</i>	33
2.1.6.7 <i>Reação em cadeia da polimerase-PCR</i>	38
2.1.6.8 <i>RT-PCR</i>	40
2.1.6.9 <i>Nested-PCR</i>	41
2.1.6.10 <i>PCR Multiplex</i>	41
2.1.6.11 <i>Extração de ácidos nucléicos</i>	42
2.1.6.11.1 <i>Funções de cada reagente na extração</i>	43
2.2 O LABORATÓRIO DE PESQUISA EM DNA FORENSE	44
2.2.1 <i>Aspectos físicos</i>	45
2.2.1.1 <i>Arquitetura</i>	45
2.2.1.2 <i>Requisitos físicos: Níveis de biossegurança (NB)</i>	49
2.2.1.3 <i>Sinalização</i>	63
2.2.1.4 <i>Proteção contra incêndio</i>	64
2.2.1.4.1 <i>Extintores</i>	67
2.2.1.4.2 <i>Substâncias Inflamáveis e solventes em geral</i>	70
2.2.1.4.3 <i>Cuidados no Manuseio de Inflamáveis</i>	70
2.2.1.4.4 <i>Cuidados na estocagem e transporte</i>	71
2.2.1.4.5 <i>Descarte de Inflamáveis</i>	72
2.2.1.4.6 <i>Incêndios</i>	72

2.2.1.5	Mapa de risco	72
2.2.2	<i>Roteiro de elaboração</i>	73
2.3	EQUIPE DE TRABALHO	75
2.3.1	<i>Padronização de procedimentos</i>	76
2.3.2	<i>Treinamento de pessoal</i>	78
2.3.3	<i>Gestão da qualidade e biossegurança</i>	79
2.4	RISCOS QUÍMICOS	80
2.4.1	<i>Contaminantes do ar</i>	81
2.4.2	<i>Substâncias tóxicas e altamente tóxicas</i>	81
2.4.3	<i>Substâncias explosivas</i>	82
2.4.4	<i>Substâncias irritantes e nocivas</i>	82
2.4.5	<i>Substâncias Oxidantes</i>	83
2.4.6	<i>Substâncias corrosivas</i>	83
2.4.7	<i>Líquidos e substâncias voláteis</i>	83
2.4.8	<i>Substâncias inflamáveis</i>	84
2.4.9	<i>Classificação dos agentes químicos</i>	84
2.4.10	<i>Segurança no preparo de soluções</i>	85
2.4.11	<i>Noções de toxicologia - Riscologia química</i>	86
2.4.11.1	<i>Inalação</i>	86
2.4.11.2	<i>Absorção</i>	87
2.4.11.3	<i>Ingestão</i>	87
2.4.12	<i>Peróxidos</i>	88
2.4.12.1	<i>Compostos Formadores de Peróxidos</i>	88
2.4.12.2	<i>Cuidados no manuseio de peróxidos</i>	89
2.4.12.3	<i>Descarte de Peróxidos</i>	89
2.4.12.3.1	<i>Pequenas Quantidades</i>	89
2.4.12.3.2	<i>Grandes Quantidades</i>	90
2.4.13	<i>Produtos Corrosivos</i>	90
2.4.13.1	<i>Cuidados no Manuseio de Produtos Corrosivos</i>	91
2.4.14	<i>Substâncias químicas de uso em biotecnologia</i>	91
2.4.14.1	<i>Acrilamida</i>	92
2.4.14.2	<i>Aldeído Fórmico</i>	92
2.4.14.3	<i>Brometo de etídeo (BET)</i>	93
2.4.14.4	<i>Cloreto de lítio</i>	94
2.4.14.5	<i>Clorofórmio</i>	94
2.4.14.6	<i>Fenol</i>	95
2.4.14.7	<i>Formamida</i>	95
2.4.15	<i>Desinfecção e disposição</i>	95
2.4.15.1	<i>Desinfetantes químicos</i>	96
2.4.15.2	<i>Desinfetantes comumente usados no laboratório</i>	96
2.4.15.2.1	<i>Iodoform</i>	97
2.4.15.2.2	<i>Hipocloritos</i>	98
2.4.15.2.3	<i>Álcoois (etílico, isopropílico)</i>	101
2.4.15.2.4	<i>Glutaraldeído</i>	103
2.4.15.2.5	<i>Clorexidina</i>	104
2.4.15.2.6	<i>Formaldeído</i>	104
2.4.15.2.7	<i>Fenóis</i>	106

2.4.15.2.8	Compostos de amônio.....	107
2.4.16	<i>Produtos Químicos Incompatíveis</i>	108
2.4.17	<i>Produtos perigosos</i>	110
2.4.17.1	Classificação.....	110
2.4.18	<i>Rotulagem</i>	111
2.4.19	<i>Gases comprimidos</i>	112
2.4.19.1	Cuidados no Manuseio de Gases.....	112
2.4.19.2	Armazenamento de cilindros de gás.....	113
2.4.19.3	Cores nos cilindros de gases.....	114
2.4.20	<i>Conceito e Classificação dos Gases e Vapores Tóxicos</i>	114
2.4.20.1	Irritantes.....	115
2.4.20.1.1	Irritantes Primários.....	115
2.4.20.1.2	Irritantes Secundários.....	117
2.4.20.2	Asfixiantes.....	117
2.4.20.2.1	Asfixiantes Simples.....	118
2.4.20.2.2	Asfixiantes Químicos.....	118
2.4.20.3	Anestésicos.....	119
2.4.21	<i>Armazenagem</i>	120
2.4.21.1	Armazenamento e transporte de produtos químicos e biológicos.....	120
2.4.22	<i>Transporte de produtos químicos</i>	123
2.5	Riscos Físicos.....	124
2.5.1	<i>Radiações não ionizantes</i>	124
2.5.1.1	Radiações ultravioleta.....	124
2.5.1.2	Radiação infravermelho.....	126
2.5.2	<i>Equipamentos</i>	127
2.5.2.1	Equipamentos de vidro.....	127
2.5.2.2	Equipamentos que geram calor ou chama.....	129
2.5.2.3	Equipamentos de baixa temperatura.....	130
2.5.2.4	Equipamentos de engrenagens e sistemas de trituração.....	130
2.5.2.5	Equipamentos e instrumentos perfurantes.....	131
2.5.2.6	Equipamentos de rotação.....	131
2.5.2.7	Outros equipamentos específicos para pesquisa em DNA.....	132
2.5.3	<i>Umidade e temperaturas extremas</i>	132
2.5.4	<i>Ruídos e vibrações</i>	133
2.6	RISCOS BIOLÓGICOS.....	133
2.6.1	<i>Fatores que interferem na eficácia da desinfecção e esterilização</i>	134
2.6.2	<i>Concentração do agente químico e tempo de exposição</i>	135
2.6.3	<i>Fatores que interferem na eficácia da desinfecção e esterilização</i>	136
2.6.4	<i>Classificação dos microrganismos por classe de risco</i>	137
2.7	PROTEÇÃO INDIVIDUAL.....	138
2.7.1	<i>Equipamento de proteção individual</i>	139
2.7.1.1	Protetores para a cabeça.....	139
2.7.1.2	Protetores para o tronco.....	141
2.7.1.3	Proteção dos membros superiores.....	141
2.7.1.4	Proteção dos membros inferiores.....	142
2.7.2	<i>Equipamento de proteção individual básico</i>	143
2.7.3	<i>Equipamento de proteção coletiva</i>	144

2.8	EQUIPAMENTOS DE CONTENÇÃO	144
2.8.1	<i>Cabines de segurança</i>	144
2.8.2	<i>Fluxo laminar</i>	149
2.9	DOENÇAS OCUPACIONAIS	150
2.10	ORGANIZAÇÃO DAS ATIVIDADES NO LABORATÓRIO.....	151
2.11	RESÍDUOS DE LABORATÓRIO	154
2.11.1	<i>Descarte de produtos químicos</i>	155
2.11.2	<i>Gases</i>	157
2.11.3	<i>Sólidos</i>	157
2.11.4	<i>Líquidos</i>	158
2.11.5	<i>Descarte de sangue e fluídos corporais</i>	159
2.11.6	<i>Reagentes com prazos de validade vencidos</i>	159
2.11.7	<i>Frascos de reagentes</i>	160
2.11.8	<i>Contaminação por brometo de etídeo</i>	160
2.11.9	<i>Contaminação por material biológico</i>	161
2.11.10	<i>Solventes orgânicos</i>	161
2.11.11	<i>Ponteiras e tubos de microcentrífuga</i>	162
2.11.12	<i>Material pontiagudo ou cortante</i>	162
2.11.13	<i>Classificação</i>	163
2.11.13.1	<i>Resíduo que possa servir como fonte de ignição</i>	163
2.11.13.2	<i>Resíduos corrosivos</i>	163
2.11.13.3	<i>Resíduos reativos</i>	164
2.11.13.4	<i>Resíduo tóxico</i>	164
2.11.14	<i>Classificações específicas de resíduos</i>	165
2.11.15	<i>Eliminação de resíduos de laboratório</i>	167
2.11.16	<i>Classificação dos recipientes</i>	167
2.11.17	<i>Recolhimento e desativação de resíduos de laboratório</i>	168
2.11.18	<i>Descarte de material biológico</i>	174
2.12	PROCEDIMENTOS DE EMERGÊNCIA	176
2.12.1	<i>Quebra de Frasco e Derrame de Líquido</i>	176
2.12.2	<i>Quebra de Grande Quantidade de Frascos e Derrame de Grande Volume de Líquido</i>	176
2.12.3	<i>Regras Específicas para Derramamentos</i>	177
2.12.3.1	<i>Derramamento de sangue humano</i>	177
2.12.3.2	<i>Derramamento de material em NB-1</i>	177
2.12.3.3	<i>Derramamento de material em NB-2</i>	178
2.12.3.4	<i>Derramamento de um material em NB-3</i>	178
2.12.3.5	<i>Derramamento em cabine de segurança biológica</i>	179
2.12.3.6	<i>Derramamento de material radioativo biológico</i>	180
2.13	SEGURANÇA EM AMBIENTES DE LABORATÓRIOS	180
2.14	BIOSSEGURANÇA ESPECÍFICA EM LABORATÓRIOS DE DNA.....	188
2.15	BOAS PRÁTICAS DE BIOSSEGURANÇA	191
3	PROPOSIÇÃO	201
4	DISCUSSÃO	203

5 CONCLUSÃO.....	205
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	207
GLOSSÁRIO DE TERMOS BIOLÓGICOS	217
GLOSSÁRIO DE TERMOS GENÉTICOS.....	219
GLOSSÁRIO DE TERMOS QUÍMICOS	227
ANEXOS.....	235
ANEXO I - SINALIZAÇÃO	235
ANEXO II - TOXICOLOGIA	239
ANEXO III - CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE RISCO TÓXICO	243

LISTA DE ABREVIATURAS

ABO: Sistema sangüíneo

CIBio : Comissão interna de biossegurança*

CTNBio: Comissão nacional de biossegurança*

CONAMA: Conselho nacional do meio ambiente

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenoaminotetracético

EPI: Equipamento de proteção individual

EPC: Equipamento de proteção coletiva

FBI: (*Federal Bureau of Investigation*) Agência Federal de Investigação

HEPA: (*High Efficiency Particulated Air*) Filtro de ar para partículas de alta eficiência

HLA: antígenos leucocitários humanos

HVR: regiões hipervariáveis

MtDNA: DNA mitocondrial

NB: Nível de biossegurança

NFPA (*National Fire Protection Association*) Associação Nacional de proteção a incêndios

Pb: pares de bases

PCR: (*polymerase chain reaction*) reação em cadeia da polimerase

RFLP: polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição

RNA: ácido ribonucléico

OGM: organismo geneticamente modificado

STRs: pequenas repetições consecutivas

VNTR: repetições consecutivas de número variado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUTURA DO DNA.....	15
FIGURA 2 TIPOS DE DNA.....	19
FIGURA 3 PROCESSO DE TRADUÇÃO.....	21
FIGURA 4 PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO.....	23
FIGURA 5 IMPRESSÃO DE DNA.....	28
FIGURA 6 PADRÕES DE VNTRs.....	31
FIGURA 8 MAPA DE RISCO - CORES.....	74
FIGURA 9 ACONDICIONAMENTO DE AMOSTRAS.....	121
FIGURA 10 CABINE CLASSE II B 1.....	146
FIGURA 11 CLASSE II TIPO B 2.....	147
FIGURA 12 CABINE CLASSE II B3.....	147
FIGURA 13 CABINE CLASSE III.....	149
FIGURA 14 FLUXO LAMINAR.....	150
FIGURA 15 – RISCO CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA.....	154

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 PERCENTUAL DE OXIGÊNIO NA COMBUSTÃO.....	68
TABELA 2 CLASSES DE INCÊNDIOS.....	70
TABELA 3 INCOMPATIBILIDADE ENTRE PRODUTOS QUÍMICOS.....	109
TABELA 4 CLASSIFICAÇÃO DOS PRODUTOS PERIGOSOS.....	110

RESUMO

No presente trabalho realizou-se uma revisão das normas e cuidados técnicos referentes a biossegurança em laboratórios de pesquisa de DNA forense. O laboratório de extração, análise e digestão de DNA, é um local de constante aprendizado e constantes riscos para a equipe que atuam nestes. Conhecer tais riscos e a maneira mais eficiente de evitá-los, é uma necessidade. Buscou-se ainda reunir o maior número possível de informações que visam minimizar tais riscos. Estes se dividem em riscos físicos, biológicos, químicos, ergonômicos e riscos de acidentes. Os riscos físicos podem estar relacionados com a umidade, calor, ruídos, radiações (ionizantes e não ionizantes) presentes nos equipamentos de manuseio constante do laboratório forense. Os riscos biológicos são decorrentes da exposição a produtos e subprodutos de animais, vegetais e microorganismos. Entre os agentes de risco biológico, podemos citar os mais importantes: bactérias, fungos, leveduras, vírus, protozoários e metazoários. Esses agentes podem estar presentes no ambiente laboratorial veiculados sob diversas formas que oferecem risco biológico, tais como: aerossóis, poeira, alimentos, instrumentos de laboratório, água, culturas, amostras biológicas, sangue, urina, escarro, secreções, entre outros. Para os riscos químicos podemos citar produtos químicos em geral tais como: álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro, fenóis sintéticos, iodóforos, além de gases e poeiras. Conclui-se que existe necessidade do estabelecimento de normas de conduta mais abrangentes dentro dos laboratórios forenses, principalmente no que

tange à coleta, manuseio e guarda de amostras e tratamento e descarte de resíduos; há a necessidade de um correto entrosamento entre o coordenador do laboratório e o corpo de auxiliares; há a necessidade da elaboração de um correto mapa de riscos, elaborado de forma clara, concisa e evidente; e principalmente há a necessidade do estabelecimento de tarefas ao corpo de auxiliares, onde cada um deverá efetuar uma única tarefa, porém deverão deter o conhecimento global do serviço a ser realizado, cabendo ao coordenador do laboratório a inspeção de execução de cada tarefa ou fase.

Palavras chave:

Biossegurança; DNA, procedimentos.

ABSTRACT

A review of the norms and technical precautions referring to the bio-safety in forensic DNA research laboratories was made in the present study. The laboratory for extracting, analyzing and digesting the DNA is a place of constant learning and risks for the teams who work there. Knowing such risks is the most efficient way to avoid them and that is a necessity. It was tried to gather as much information as possible aiming to minimize such risks. Those are divided in physical, biological and chemical risks. The physical risks can be related to humidity, heat, noise, radiations (ionizing and non-ionizing) found in the equipment constantly used in the Forensic Laboratory. The biological risks are due to the exposure to animal products and byproducts, vegetable and microorganisms. Among the agents of biological risks, we can cite the most important ones: bacteria, fungus, leaven, viruses, protozoan and metazoan. These agents can be present in the laboratory environment carried under several forms that offer biological risk such as aerosols, dust, food, laboratory instruments, water, cultures, biological samples, blood, urine, mucus, secretion among others. For the chemical risks we can cite alcohol, formaldehyde, glutaraldehyde, composites releasing chloride, synthetic phenol, iodous and others. We conclude that there is the need to establish more comprising norms of conduct inside forensic laboratories, mainly concerning the collection, handling and keeping of samples; the need of a correct understanding between the laboratory coordinator and his staff; the need to develop a correct map of risks, made in a clear, concise and evident way; and mainly the need to assign tasks to the staff, and each one will perform one task only, however they must have a general knowledge of the services to be done. It will be the responsibility of the laboratory coordinator to inspect the performance of each phase or task.

Key words:

Bisafety; DNA, procedures

1 INTRODUÇÃO

“Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino e desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, riscos que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou a qualidade dos trabalhos desenvolvidos” (Comissão de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz)

No panorama mundial as primeiras diretrizes em termos de biossegurança são de 1976 do NIH (*National Institute of Health*). O governo federal norte americano passou a estabelecer que os projetos que contassem com verbas federais deveriam seguir normas de segurança laboratoriais específicas. (TEIXEIRA, 1996)

A partir deste momento, outros países passaram a estabelecer procedimentos semelhantes e começou a surgir a necessidade de harmonização destes procedimentos a nível mundial.

No Brasil a biossegurança surgiu com força a partir da Lei 8974 de 1995 e com o Decreto 1752 de 1995 que regulamentou esta Lei. Esta legislação criou a comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), com o objetivo de propor e estabelecer toda a política nacional de biossegurança para o país. (SOUZA, 1998)

Esta legislação despertou nas diversas instituições programas de implementação de normas de biossegurança adequadas ao cenário mundial.

A área de biotecnologia, em especial a área de pesquisa de DNA forense, envolve profissionais das mais diversas áreas de formação: biólogos, bioquímicos, médicos, farmacêuticos e dentistas. Neste cenário multiprofissional, torna-se muito importante a questão da biossegurança, já que muitos cursos de formação profissional o tema não é abordado e muitas vezes, sem o conhecimento adequado e o treinamento técnico necessário, estes profissionais passam a atuar na área.

Talvez o passo mais importante para o controle de riscos presentes no laboratório forense seja a identificação destes mesmos riscos. Não basta seguir as normas estabelecidas, mas garantir que estas se apliquem de forma estrita e que o significado dos símbolos seja corretamente depreendido pelos usuários. Em laboratórios de ensino e/ou pesquisa de universidades alguns usuários não dominam, de forma adequada para responder em casos emergenciais, a linguagem simbólica e escrita de biossegurança. É fundamental que as normas de biossegurança definam procedimentos adequados para estes usuários.

O objetivo do presente trabalho é delinear os principais pontos de risco da atividade laboratorial forense, em especial no laboratório de DNA forense; normas a serem seguidas na rotina laboratorial; procedimentos emergência e de segurança básicos à prática forense.

A experiência internacional e o conhecimento científico adquiridos pela comunidade científica são importantes de serem estudados, pois já foram reavaliados, seu conhecimento serve para acelerar etapas, evitando erros cometidos. Porém é necessária uma adaptação a realidade econômica local, os recursos alocados para área científica ainda são exíguos quando comparados a países de biotecnologia de ponta.

Normas de segurança biológicas seguras e aplicáveis são um pré-requisito para investimentos privados na área forense.

A informação a respeito desta área é bastante dispersa e o tema não foi adequadamente absorvido pela área forense. Os conhecimentos de biossegurança devem ser adaptados à prática no laboratório forense. Neste local a preocupação com biossegurança envolve preocupações com riscos químicos, físicos, biológicos e ergonômicos.

Todo laboratório que atue na área forense deve ter estabelecido um conjunto de procedimentos e normas estabelecidos quanto a questões de segurança, procedimentos de emergência e tratamento de dejetos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Noções Básicas de DNA

Os usos das técnicas de manipulação de DNA são relativamente recentes, assim como os conceitos necessários ao entendimento das mesmas. Para uma compreensão dos diversos procedimentos executados em um laboratório de análise forense de DNA, há necessidade de incursionar e rever conceitos básicos com os quais lidaremos durante o curso da exposição. Tais premissas são necessárias para dar uma idéia da ótica como o tema será abordado e também para fixar elementos sem os quais não se poderá adequadamente compreender a direção das proposições de biossegurança aqui sustentadas, seguindo a linha de conduta majoritária observada na revisão de literatura.

O DNA (Ácido Desoxirribonucléico) é a estrutura química que forma os cromossomos, é composto por uma longa e espiralada molécula localizada no núcleo da célula, usualmente na forma de cromossomos, ou livremente espiralado na célula bacteriana, que não tem núcleo. Em cada célula humana encontramos 46 cromossomos. Um pedaço de um cromossomo que dita uma característica particular é chamado gene.

O DNA é uma macromolécula filamentar muito longa (cerca de 1,5 m) feita de um grande número de desoxirribonucleotídeos, cada um composto de uma base nitrogenada, uma ose e um fosfato. As bases das moléculas de Dna

levam a informação genética, enquanto seus grupamentos ose e fosfato têm papel estrutural. A base nitrogenada é um derivado de purina ou pirimidina.

Em 1953, James Watson e Francis Crick deduziram a estrutura tridimensional do DNA, seu mecanismo de replicação e estabeleceram suas principais características: (WATSON, 1994)

Estruturalmente o DNA é uma hélice dupla: duas cadeias de material genético se espiralaram uma ao redor da outra. As cadeias correm em sentidos opostos. Cada cadeia contém uma sucessão de bases (também chamadas de nucleotídeos). A base pode ser uma das quatro substâncias químicas: adenina, guanina, citosina e timina (SUZUKI, 1992).

As bases purínicas e pirimídicas estão do lado de dentro da hélice, enquanto as unidades de fosfato e desoxirribose estão do lado de fora. As duas cadeias são mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases. As duas cadeias de DNA estão conectadas a cada base. Cada base se unirá com uma outra base, como segue: Adenina (A) só unirá com timina (T), e guanina (G) só unirá com citosina (C).

Uma cadeia de DNA tem polaridade. Uma ponta da cadeia tem o agrupamento 5'-OH e a outra 3'-OH, nenhum deles está ligado a outro nucleotídeo. A seqüência da bases é escrita no sentido 5'→ 3'. A seqüência de aminoácidos em uma proteína é escrita no sentido amina → carboxila. (STRYER, 1996)

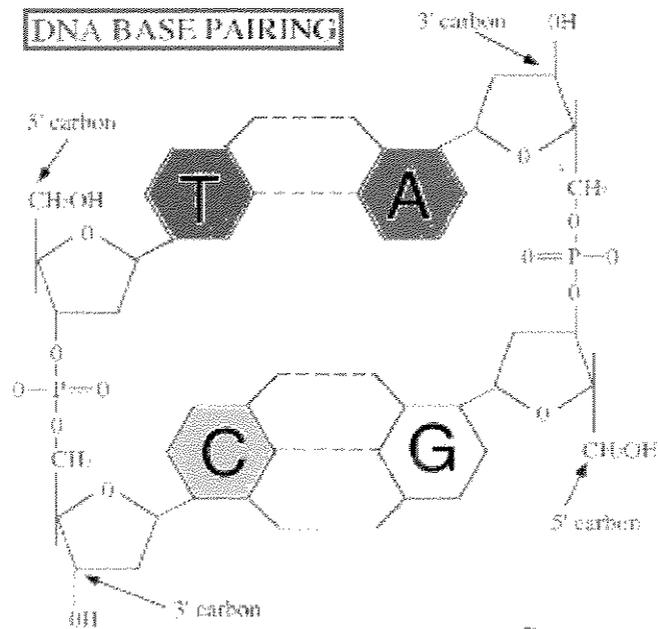


Figura 1 Estrutura do DNA

2.1.1 Análise do DNA mitocondrial

O mtDNA (DNA mitocondrial) difere do DNA nuclear na sua localização, seqüência, quantidade na célula e seu modo de transmissão. O núcleo da célula contém dois conjuntos de 23 cromossomos, um materno e outro paterno. No

entanto as células podem conter centenas a milhares de mitocôndrias e cada uma contém várias cópias de mtDNA.

O DNA nuclear tem mais bases que o mtDNA, no entanto o mtDNA pode ser encontrado em muitas mais cópias que o DNA nuclear. Esta característica do mtDNA é interessante quando a quantidade de DNA na amostra é limitado.

O mtDNA é herdado apenas da mãe o que torna possível o uso de qualquer amostra de parentes da linha materna. Sua limitação é em relação ao a impossibilidade em discriminar entre indivíduos pertencentes à mesma linha materna. Por exemplo, fazer a diferenciação entre irmãos.

O genoma de mtDNA humano tem aproximadamente 16.569 bases de comprimento e tem duas regiões diferenciadas: Uma região codificadora e outra região de controle.

A região de controle é responsável pela regulação da molécula de mtDNA. A região de codificação é responsável pela produção de várias moléculas biológicas envolvidas no processo de produção de energia na célula. Duas regiões de mtDNA dentro da região de controle têm sido escolhidas por possuírem um alto grau de polimorfismo, ou variedade dentro da população humana. Estas duas regiões têm sido denominadas *Hypervariable region I* (HV1), que tem aproximadamente 342 pares de bases (bp) e a *Hypervariable region II* (HV2), que tem aproximadamente comprimento de 268 bp. Exames forenses utilizando

mtDNA usam estas duas regiões devido ao alto grau de variabilidade encontrado entre indivíduos. (FBI..., 1999)

Aproximadamente 610 pb de mtDNA são comumente seqüenciados em uma análise de mtDNA. A gravação e comparação das seqüências de mtDNA poderiam ser dificultadas talvez causar confusão se todas as bases fossem usadas. Deste modo, as informações da seqüência de mtDNA são gravadas por registros apenas das diferenças com respeito a referente seqüência de DNA. Por convenção, as seqüências de mtDNA são descritas usando a primeira seqüência completa publicada de mtDNA como referência por Anderson em 1981. Esta seqüência é comumente descrita como seqüência Anderson, também chamada seqüência Cambridge ou Oxford. Cada bp é denominado por um número. Desvios desta seqüência de referência são registrados como número da posição demonstrando a diferente e designação da letra da diferente base. Por exemplo, a translação de A para G na posição 263 poderia ser registrada como 263 G. Se deleções ou inserções das bases estão presentes no mtDNA, estas diferenças são denotadas da melhor forma.

2.1.2 Procedimentos de análise

A análise forense do mtDNA é um trabalho rigoroso e intensivo. Várias técnicas de biologia molecular são combinadas para obter uma seqüência de mtDNA como amostra. Os passos de processo de análise do mtDNA incluem uma

análise visual primária, preparação da amostra, extração do DNA, *polymerase chain reaction* (PCR) amplificação, pós-amplificação, quantificação do DNA, seqüenciação automática do DNA e análise dos dados.

Passo 1. Análise visual: Permite a comparação entre a amostra e o padrão encontrado. Por exemplo, examinar microscopicamente um fio de cabelo para ver se sua estrutura é compatível com as características de fio de cabelo humano, exame do osso e dente para identificá-los como sendo material humano.

Passo 2. Preparação da amostra: Limpeza das amostras para evitar que material exógeno seja examinado. Ossos e dentes devem ser lavados e areados para remover qualquer material exógeno aderido na superfície. Um pequeno pedaço da amostra é então removido e transformado em pó fino. Da mesma forma o dente deve ser também pulverizado. Se a polpa for fresca pode fornecer material suficiente para a análise. O osso ou dente pulverizados deve ser colocado em uma solução para liberar o DNA do interior das células.

Passo 3. Extração do DNA: para extrair o DNA, o homogêneo celular obtido na preparação da amostra é exposto a uma mistura de químicos orgânicos que separam o DNA de outras moléculas biológicas como, por exemplo, proteínas. A mistura é centrifugada e o DNA permanece solúvel na superfície da camada de água. Os restos dos componentes celulares ficam solúveis no fundo da camada orgânica ou na interface entre as duas camadas. A camada superficial é filtrada e concentrada. A amostra de DNA é purificada e está pronta para o processo de amplificação pelo PCR.

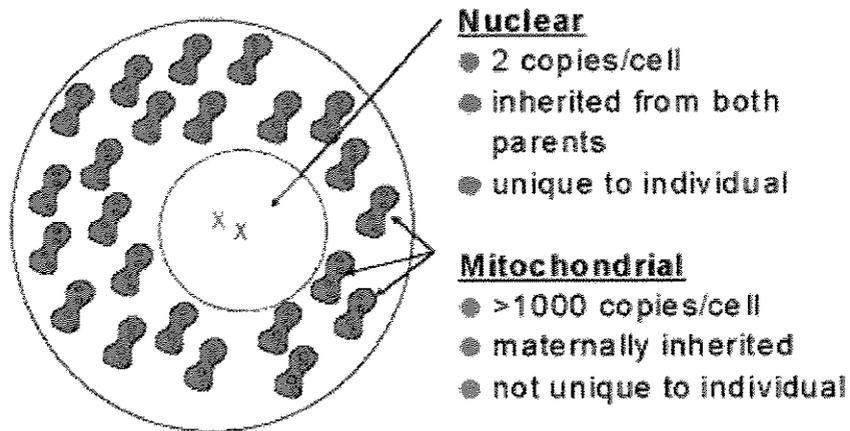


Figura 2 Tipos de DNA

2.1.3 Genes alelos

As diferenças físicas entre os diversos indivíduos são determinadas pelos alelos que cada indivíduo possui. Alelos são as diferentes formas com que um gene pode se apresentar. Assim como existem variações para uma mesma cor, existem variações para um mesmo gene. Sendo assim, cada um de nós possui um grupo de alelos e o que faz sermos quem somos é a soma da

combinação de todos os nossos alelos (genótipos) com as influências recebidas do meio ambiente (fenótipo). (WASHINGTON... 2001)¹

2.1.4 Processo de tradução

O Processo de tradução de uma molécula de RNA mensageiro ocorre no citoplasma (mais especificamente nos ribossomos), após o RNA ter sido transcrito a partir de uma fita molde de DNA. Uma vez transcrita a molécula de RNA mensageiro, a mesma se desloca para o citoplasma, onde ocorre a tradução. O processo de tradução consiste na síntese de uma proteína a partir das informações contidas na molécula de RNA mensageiro. A chave de todo o processo são os códons, trincas de bases nitrogenadas específicas para cada aminoácido. O inverso, no entanto não é verdadeiro, pois um único aminoácido pode ser codificado por mais de um códon. Por exemplo, a fenilalanina pode ser codificada tanto por TTT como por TTC. No entanto TTT será sempre um dos códons de reconhecimento da fenilalanina.

Os aminoácidos constituintes da proteína nascente são capturados no meio através dos RNA transportadores, que possuem os anti-códons, que são trincas de bases nitrogenadas que se pareiam com os códons presentes na

¹WASHINGTON UNIVERSITY Disponível em :
<<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>>.

molécula de RNA mensageiro. Uma vez incorporado o aminoácido na nova proteína, o RNA transportador se separa do mecanismo de síntese protéica.

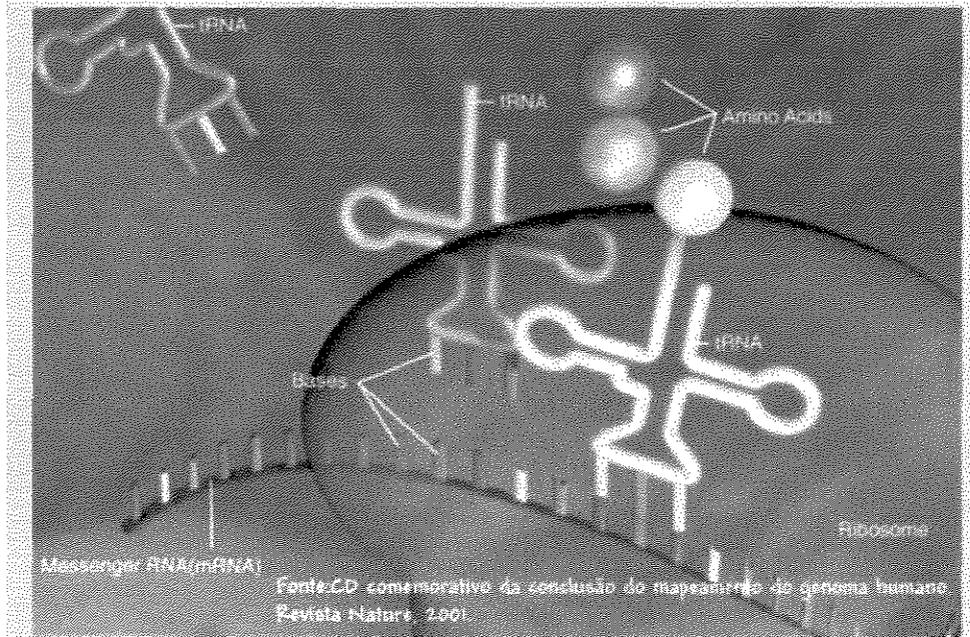


Figura 3 Processo de Tradução

2.1.5 Processo de transcrição

Toda a informação sobre a constituição de um ser vivo seja uma bactéria ou um mamífero, estão contidas no seu DNA.

Entretanto, o código genético de determinada espécie não se expressa diretamente na forma de uma proteína. Para tanto, essa mensagem deve ser inicialmente transcrita do DNA para o RNA mensageiro.

Para que ocorra o processo de transcrição é necessária a presença de uma enzima, a RNA polimerase. Esta enzima reconhece o sítio de iniciação do gene, identifica a cadeia do DNA em que está contido e inicia a transcrição. Durante este processo, o pareamento dos nucleotídeos de RNA na cadeia de DNA, segue um padrão determinado. A adenina se pareia com uracil (uma vez que a molécula de RNA apresenta esta base no lugar de timina), a timina do DNA se pareia com adenina, citosina com guanina e guanina com citosina. (ROSNAY, 1992).

Os nucleotídeos de RNA se unem pelo fosfato e pela ribose. À medida que a molécula de RNA vai sendo construída e se afasta da cadeia ativa do DNA que serviu de molde, a molécula de DNA se reconstitui.

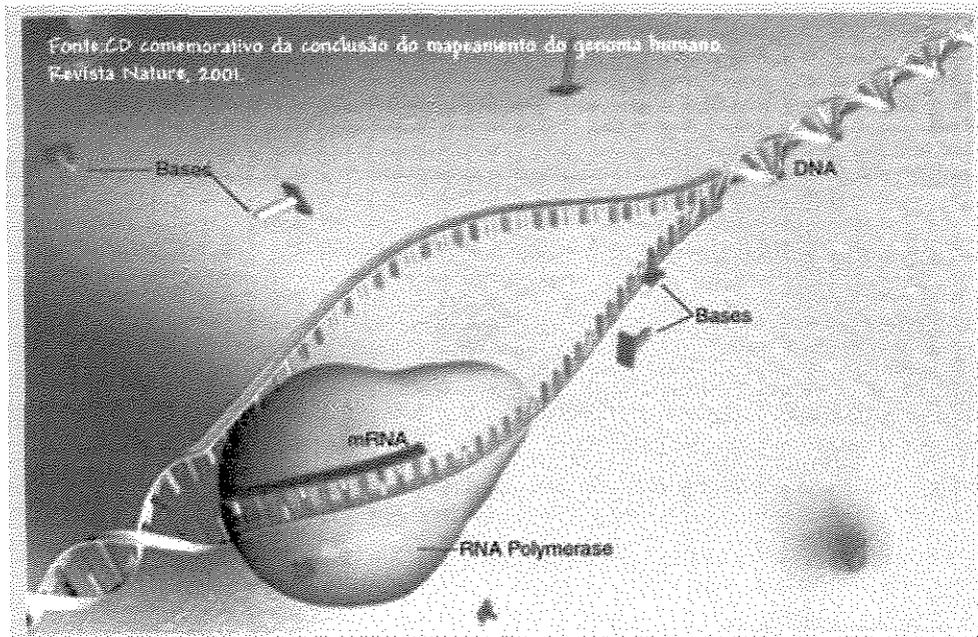


Figura 4 Processo de Transcrição

2.1.6 Principais técnicas utilizadas em Laboratório de DNA forense.

Os métodos de hibridização estão entre os primeiros métodos desenvolvidos para análise do DNA. Inicialmente, segmentos de DNA, gerados a partir de amplificação ou por digestão com enzimas de restrição, são separados por eletroforese em gel de agarose. O material é então transferido para um filtro de nitrocelulose ou nylon e submetido à hibridização com sondas de DNA marcadas com isótopos radiativos ou com radicais que permitem sua revelação por métodos cromogênicos ou luminíferos. A análise do padrão de bandas geradas permite a identificação de lesões gênicas grosseiras como deleções ou inserções ou ainda a identificação de mutações de ponto. Os métodos de hibridização podem ser realizados a partir de material amplificado por PCR e fixado em filtro sem separação por eletroforese. Estas diversas técnicas podem

ser utilizadas em exames de paternidade com finalidades forenses. Os exames mais comuns empregados em investigação de paternidade são os: STRs - *Short Tandem Repeats* (ou Locus e Microssatélites) e Sondas Unilocais (ou Locus e Minissatélites).

Existem outras metodologias que podem ser empregadas para a avaliação da paternidade duvidosa. Os mais utilizados são os que estudam as variações do DNA ao nível de regiões de seqüências repetitivas (minissatélites), por intermédio da técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), assim como os microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs), pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A avaliação dos sistemas HLA (*Human Leucocyte Antigens*) permite também a investigação de paternidade. Atualmente, realizamos a tipagem do HLA pelo método do DNA alelo-específico, utilizando-se a PCR.

A probabilidade de que um indivíduo seja pai de uma criança é proporcional ao polimorfismo do sistema genético estudado, alcançando 99,99% para a soma de vários testes de DNA de locos de mini e/ou microssatélites e 86-99% para o HLA.

A probabilidade de exclusão de um homem falsamente acusado chega próximo de 100% com os testes de DNA e de 94% para o HLA. Internacionalmente, aceita-se como provável paternidade probabilidades entre 90-94,9%, como fortíssimo indício de paternidade entre 95-99% e paternidade certa acima de 99%. (DNAREFERENCE, 2001)

2.1.6.1 *Fingerprinter DNA (impressão de DNA)*

A estrutura química de todo o DNA é a mesma. A única diferença entre pessoas (ou qualquer animal) é a ordem dos pares de bases. Há tantos milhões de pares de bases no DNA de cada pessoa que cada pessoa tem uma seqüência diferente.

Porém, estes padrões não dão uma impressão digital individual, mas eles podem determinar se duas amostras de DNA são da mesma pessoa, pessoas relacionadas, ou pertencente a pessoas não relacionadas. O estudo das seqüências polimórficas de DNA tem se mostrado mais efetivo em última análise para diferenciar os indivíduos. Há inúmeros métodos de diferenciação. Dois se destacam pela sua aplicação forense. As análises de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) pelo método de sondas, e a técnica de ampliação de lócus gênicos utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (OLIVEIRA, 2001). Existem no cromossomo Y importantes lócus genéticos de STRs úteis a caracterização da herança paterna. Estes lócus costumam ser transmitidos de geração em geração nos indivíduos masculinos de uma mesma família. Assim pode-se analisar a paternidade de um indivíduo masculino comparando-se os lócus de seu tio, primo ou bisavô. Toda linhagem masculina deve ter idênticos marcadores no cromossomo Y. (JOBIM,1998)

2.1.6.2 Sondas

As sondas de DNA são seqüências de fita única de DNA que hibridizam, pareiam, com a seqüência de interesse, destacando-as do restante da biblioteca. Estas sondas podem ser marcadas com um isótopo radioativo, um anticorpo, uma substância fluorescente ou outro método de detecção. A utilização em conjunto das sondas e de enzimas de restrição permitiu o desenvolvimento de técnicas de detecção de DNA muito precisas, como o *Southern Blot*, onde um determinado gene pode ser identificado entre milhões de fragmentos por separação eletroforética em gel com posterior identificação dos fragmentos através de sondas específicas. Variações deste método permitem hoje a identificação de fragmentos de RNA, *Northern Blot*, e de proteínas, *Western Blot*, este último utilizando um anticorpo no lugar da sonda.

2.1.6.3 Southern Blot

Southern Blot é um modo utilizado para analisar os padrões genéticos que normalmente aparecem no DNA de uma pessoa. O processo de *Southern Blot* envolve:

1. Isolar o DNA em questão do resto do material celular no núcleo. Isto pode ser feito utilizando-se usando um detergente qualquer para lavar o material

extra, ou mecanicamente pela aplicação de uma certa quantia de pressão que faz com que o DNA seja forçado para fora do núcleo.

2. Corta-se o DNA em vários pedaços de tamanhos diferentes. Isto pode ser feito utilizando-se de uma ou mais enzimas de restrição.

3. Ordena-se os pedaços de DNA pelo tamanho. O processo pelo qual se faz a separação pelo tamanho é chamado de eletroforese em gel. O DNA é vertido em um gel, como a agarose, e uma carga elétrica é aplicada ao gel, com a carga positiva embaixo e a carga negativa encima (topo). O DNA tem uma carga ligeiramente negativa, desta forma, os pedaços de DNA serão atraídos para o fundo do gel; porém, os pedaços menores podem se mover mais rapidamente e chegar mais próximos da parte inferior do gel que os pedaços maiores. Os pedaços de diferentes tamanhos de DNA serão separados então através de tamanho, com os pedaços menores mais próximos ao o fundo e os pedaços maiores mais próximos ao o topo.

4. Desnatura-se o DNA, de forma que todo o DNA é transformado em cadeia única. Isto ou pode ser feito pelo aquecimento ou tratando quimicamente o DNA no gel.

5. Revela-se o DNA. O gel com o DNA fracionado em diversos tamanhos é aplicado a uma folha de papel de nitrocelulose, ficando o DNA permanentemente preso à folha. O *Southern Blot* está pronto ser analisado.

Para analisar o resultado do processo *Southern Blot*, uma sonda genética radioativa é utilizada na reação de hibridização do DNA. Se uma radiografia é tirada depois da união uma sonda radioativa com o DNA desnaturado, no papel somente as áreas onde houve a união (em vermelho) irão aparecer no filme. Isto permite aos investigadores identificar, no DNA de uma pessoa particular, a ocorrência e frequência do padrão genético particular contido na sonda.

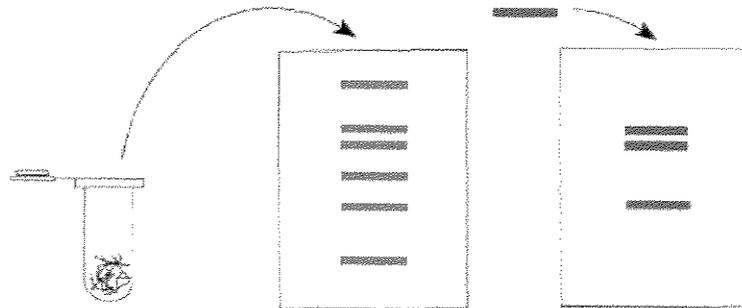
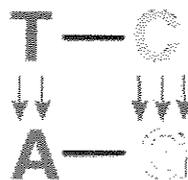


Figura 5 Impressão de DNA

2.1.6.4 Reação de hibridização

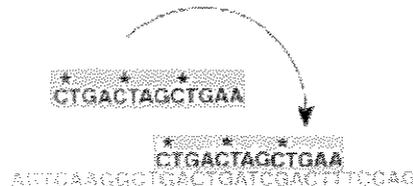
1. Hibridação é união de duas seqüências genéticas. A ligação acontece por causa ponte de hidrogênio (rosa) entre pares de base. Entre a Adenina e uma base de Timina, há duas pontes de hidrogênio; entre uma base de Citosina e a Guanina, há três pontes de hidrogênio.



2. Quando se utiliza hibridização no laboratório, o DNA deve ser desnaturado primeiro, normalmente utilizando-se de calor ou substâncias químicas. Desnaturação é o processo pelo qual as pontes de hidrogênio da dupla hélice original são quebradas, deixando uma hélice simples de DNA cujas bases passam a ficar disponíveis para novas uniões através de pontes de hidrogênio.

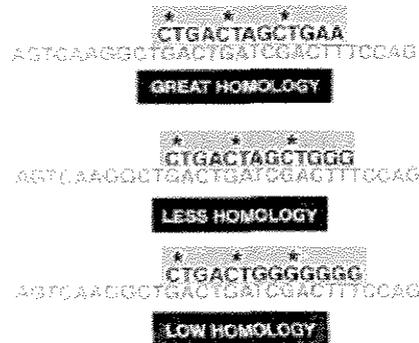
TCAGTTCCGACTGACTAGCTCAAGCT
AGTCAAGGCTGACTGATCGACTTCCAG

3. Uma vez que o DNA tenha sido desnaturado, uma sonda radioativa de uma única hélice (azul claro) pode ser utilizada para visualizar se o DNA desnaturado contém uma seqüência similar a que a da sonda.



4. O ajuste da sonda com o DNA não tem que ser exato. Seqüências de homologia variadas podem se unir ao DNA mesmo se o ajuste for pequeno; quanto menor o ajuste, menor a quantidade de ligações através de pontes de hidrogênio entre a sonda e o DNA desnaturado. A habilidade de seqüências de baixa homologia em realizar as uniões pode

podem variar pela manipulação a temperatura do ambiente de reação de hibridação, ou pela variação da quantidade de sal na mistura andando na lama.



2.1.6.5 VNTRs

Toda hélice de DNA tem pedaços que contêm informação genética que informa o desenvolvimento de um organismo (exons) e pedaços que, aparentemente, não retêm nenhuma informação genética relevante, isto é não codificam qualquer proteína (introns). Estima-se que 30% do DNA seja constituído por estas repetições. Embora os íntrons possam parecer inúteis, foi descoberto que eles contêm seqüências repetidas de pares de bases. Estas seqüências, (*Variable Number Tandem Repeats-VNTRs*), podem conter em qualquer lugar de vinte a cem pares de base.

O polimorfismo ao nível de DNA pode ser causado então pela variação de um número variável de repetições em *tandem* (VNTR). São pequenas seqüências de nucleotídeos que se repetem sucessivamente, variando o número de cópias de cada seqüência do genoma.

Todo ser humano tem algum VNTRs, para determinar se uma pessoa tem um VNTR particular, um *Southern Blot* é executado, e então o *Southern Blot* é sondado, por uma reação de hibridação, com uma versão radioativa do VNTR em questão. O padrão que é o resultado deste processo é o que está freqüentemente chamado uma impressão digital de DNA. O VNTRs de uma determinada pessoa possui toda a informação genética doada pelo pai ou pela mãe, ou uma combinação de ambos, mas nunca um VNTR que não estiver presente no pai ou na mãe ou em ambos. A figura 6 mostra os padrões de VNTR para mãe (azul), pai (amarelo), e as quatro crianças deles/delas: D1 (filha biológica), D2 (filha de uma outra união anterior da mãe e o marido anterior dela (vermelho), S1 (o filho biológico), e S2 (o filho adotado, não biologicamente relacionado (os pais dele são verde claro e escuro).

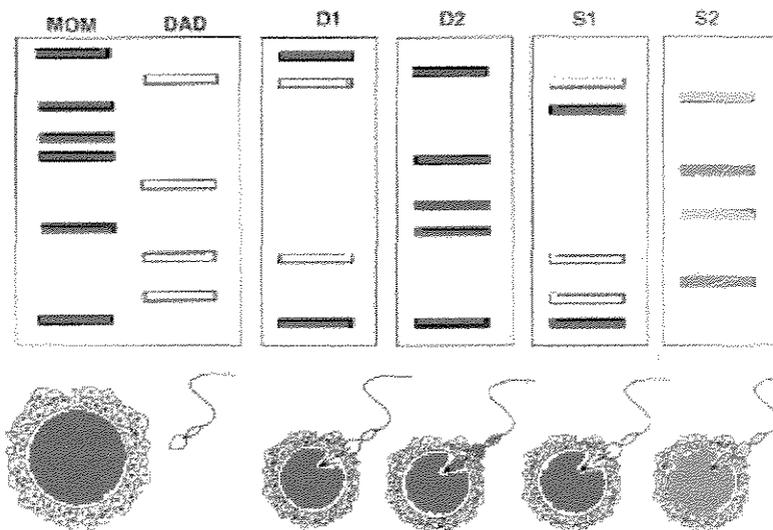


Figura 6 Padrões de VNTRs

Devido aos padrões de VNTR ao herdados geneticamente, o padrão de VNTR de uma determinada pessoa é único. Quanto mais sondas forem utilizadas para analisar o padrão VNTR de uma pessoa, mais distinto e individualizado será aquele padrão.

A probabilidade de uma impressão digital de DNA que pertence a uma pessoa específica necessita ser razoavelmente alto, especialmente em casos criminais onde ajuda a estabelecer a associação entre a culpa de um suspeito ou sua inocência.

2.1.6.5.1 Dificuldades técnicas

Erros na hibridação e no processo de sondagem também devem considerados na probabilidade, e freqüentemente a idéia de erro simplesmente não é aceitável. Quando a amostra de DNA disponível é pequena, este é um fator importante, porque não há margem para erro, especialmente se a análise da amostra de DNA envolve amplificação da amostra (criando uma amostra muito maior de DNA geneticamente idêntico de que pequeno material está disponível). Se o DNA errado é ampliado (por exemplo, uma célula da pele do técnico que executou a amplificação), as conseqüências podem ser profundamente prejudiciais. Até pouco tempo atrás, os padrões usados para determinar as combinações impressões de DNA, para segurança dos procedimentos laboratoriais e precisão que minimizariam os eventuais erros, eram limitados nem

universalmente codificados, fato que conduziu a atual normatização quanto a padrões rígidos de biossegurança e controle de qualidade.

2.1.6.6 Técnica de RFLP

Posteriormente descobriu-se que as variações do DNA que eram responsáveis pelo alto grau de polimorfismo do DNA eram muito variáveis na população, produzindo o polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (*restriction fragments length polymorphism-RFLP*) (JEFFREYS,1985). A técnica de RFLP baseia-se no método de *Southern Blot*. Este método inclui 6 etapas principais.

- Extração de DNA
- Digestão do DNA por enzimas de restrição
- Separação dos fragmentos de DNA em eletroforese de gel de agarose
- Transferência do DNA contido no gel para membrana
- Hibridização do DNA contido na membrana com uma sonda marcada
- Exposição da membrana à um filme de raio X

O método de *Southern Blot* necessita de grande quantidade de DNA e de alto peso molecular (íntegro). A melhor fonte de DNA nesses casos é o sangue, onde o DNA pode ser extraído a partir de células brancas (linfócitos). Existe hoje no mercado uma variedade de kits comerciais utilizados para este fim. O processo de extração é bastante simples, barato e rápido (cerca de 30 minutos) e geralmente envolve etapas de lise celular, tratamento por detergentes e isolamento do DNA.

1. Digestão de DNA por enzimas de restrição

Enzimas de restrição são proteínas que cortam o DNA em fragmentos menores. Essas enzimas são isoladas de bactérias e nomeadas de acordo com o organismo de origem. Por exemplo, EcoRI é uma enzima de restrição isolada da *E. coli*. A função destas enzimas, descobertas nos anos 60 é destruir vírus que invadem as bactérias. Cortando o DNA destes vírus as bactérias tornam os mesmos inofensivos.

Uma enzima de restrição reconhece uma seqüência de nucleotídeos específica, como AGCT, cortando o DNA sempre que esta seqüência estiver presente na molécula invasora. A digestão de DNA por enzimas de restrição é um processo simples. Basta colocar o DNA em contato com a enzima a uma temperatura ideal e a mesma inicia o processo de digestão imediatamente, cortando o DNA em diversos pedaços. O número de pedaços produzido é estabelecido pelo número de sítios de restrição reconhecidos pela enzima

utilizada. A enzima EcoRI, por exemplo, corta o DNA toda vez que encontra a seqüência G/AATTC enquanto a enzima HINDIII corta na seqüência A/AGCTT.

Deste modo o DNA extraído a partir dos linfócitos é exposto à determinada enzima de restrição com o intuito de se cortar todo o genoma em pedaços menores. O resultado que se observa em eletroforese de gel de agarose é um rastro de DNA que representa uma infinidade de fragmentos de DNA de pedaços variados que se sobrepõem.

2. Separação dos fragmentos de DNA em eletroforese de gel de agarose

Eletroforese é a técnica pela qual fragmentos de DNA de diferentes tamanhos são separados. O DNA é carregado em um gel de agarose (que tem aspecto de gelatina) e este é submetido a um campo elétrico. O DNA irá se mover na direção do pólo positivo uma vez que a molécula de DNA é negativa devido à presença de grupamentos de fosfato.

Durante a corrida eletroforética os fragmentos de menor tamanho correm mais rapidamente que os fragmentos maiores e deste modo a posição relativa dos fragmentos no gel depende dos tamanhos dos mesmos. A corrida eletroforética dura horas (em torno de 8 horas, dependendo da voltagem aplicada).

Para que o rastro de DNA possa ser visualizado o gel deve ser tratado com um corante específico que intercala com as moléculas de DNA permitindo a visualização do mesmo quando exposto a luz ultravioleta.

3. Transferência de DNA para membrana

A próxima etapa consiste em transferir o DNA contido no gel para uma membrana. Antes do processo de transferência iniciar o DNA deve ser desnaturado. Isso significa que o DNA que ainda está no gel sob a forma de fita dupla deve ser aberto para que fique sob a forma de fita simples. Isso é fundamental para a próxima etapa, onde uma sonda, também de fita simples, irá hibridizar com seqüências específicas. A desnaturação do DNA é obtida tratando-se o DNA com uma solução alcalina, cujo alto pH irá quebrar as pontes de hidrogênio que ligam as duas fitas da molécula.

A membrana utilizada na transferência é carregada eletrostaticamente de modo que o DNA, uma vez em contato com a mesma grude na membrana. O DNA é então transferido para a membrana por capilaridade. A membrana (agora contendo o DNA) é colocada num forno a uma temperatura elevada de modo que o DNA lá presente seja fixado na membrana.

4. Hibridização do DNA contido na membrana com uma sonda marcada radioativamente

A etapa seguinte consiste em hibridizar uma região de interesse do DNA com uma sonda marcada radioativamente. A sonda nada mais é do que um pequeno pedaço de DNA do tipo fita simples contendo uma seqüência de nucleotídeos complementar àquela região do DNA que se pretende analisar. Esta sonda é marcada radioativamente o que consiste na introdução de um grupo fosfato radioativo (P32) em um dos carbonos da molécula. Deste modo esta sonda

poderá ser visualizada se colocada em contato com um filme de raio X. Esta sonda, à qual se ligam apenas os fragmentos de DNA de interesse que possuem uma seqüência complementar à mesma, é incubada com a membrana usada na transferência. A especificidade da ligação da sonda ao alvo varia de acordo com o que se define como estringência da reação. O que define a estringência é principalmente a combinação entre temperatura e concentração de sal. Quanto maior a temperatura mais estrigente, ou seja, mais específica é a reação. Por outro lado, quanto maior a concentração de sal, menor a estringência da reação e mesmo fragmentos de DNA que não sejam 100% complementares à seqüência da sonda serão capturados pela mesma.

5. Exposição da membrana radioativa à um filme de raio X

O processo de hibridização geralmente leva 8 horas ou mais. Quando este processo finaliza, a membrana, agora radioativa, passa por um processo de lavagem com soluções específicas de modo que o excesso de material radioativo grudado na membrana seja eliminado ficando apenas os fragmentos de sonda grudados nos locais determinados pela estringência da reação. Após lavagem a membrana é então envolvida num plástico e colocada num cassete contendo um filme de raio X. Este processo de exposição pode levar desde horas até dias. A última etapa consiste na revelação do filme de raio X onde se observa os fragmentos de DNA que foram capturados pela sonda.

2.1.6.7 Reação em cadeia da polimerase-PCR

A técnica de PCR é um advento relativamente recente na história da biologia molecular tendo sido desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis. Em 1994, Mullis recebeu o prêmio Nobel por sua descoberta. Este método, mais recente, de isolamento e amplificação de um segmento de DNA, envolve a produção *in vitro* de milhões de cópias do segmento em estudo. O processo exige a utilização de *primers* que isolam o segmento a ser amplificado, da enzima DNA polimerase, e ocorre em 3 etapas: A desnaturação da dupla fita do DNA, em alta temperatura, 90° copareamento dos *primers*, a baixa temperatura, 37° C. A duplicação do segmento isolado através da reação da DNA polimerase. O processo é cíclico e pode ser repetido "n" vezes, dependendo do grau de amplificação que se deseja. O *primer* pode ser sintetizado quimicamente, desde que se conheça a seqüência a ser amplificada e a partir desta, e é sempre adicionado em excesso ao meio de reação. Se o segmento de DNA a ser amplificado não é conhecido, ele pode ser clonado a um vetor cuja seqüência de DNA adjacente ao recombinante seja conhecida. A DNA polimerase utilizada é termoestável, e isolada do microorganismo *Termus aquaticus* (Taq Polimerase)

A tecnologia da PCR tem aplicação principalmente com amostras de DNA forense que muitas vezes a quantia de material é muito pequena e inviabilizaria o uso de outras técnicas.

Através desta técnica uma seqüência particular de interesse pode ser amplificada tornando-se majoritária na amostra de DNA. Deste modo, dois

pequenos fragmentos de DNA, normalmente de 20 pares de bases (*primers*) são sintetizados *in vitro*. Estes *primers* são complementares as extremidades da região de DNA que se pretende amplificar.

Dois pequenos fragmentos de DNA, tipicamente de 20 pares de bases, chamados de *primers*, são sintetizados através de uma outra técnica. Esses *primers* são pequenos fragmentos de DNA que são complementares a cada uma das extremidades da seqüência de DNA de interesse. Num tubo de reação são adicionados os *primers*, nucleotídeos livres (adenina, guanina, timina e citosina), o DNA e uma enzima especial resistente ao calor chamada Taq polimerase, que promove a síntese de DNA. A mistura é aquecida à 95°C, provocando a separação das duas fitas de DNA. Em seguida a mistura é esfriada até 55°C, temperatura na qual os *primers* se ligarão às regiões complementares das moléculas de DNA que estão separadas. Neste momento, dentro do tubo de reação, todo DNA está na forma de fita simples, menos as duas pequenas regiões nas quais os *primers* de 20 pares de bases se ligaram nos dois lados da seqüência de DNA. A temperatura é então elevada a 72°C e a Taq polimerase começa a sintetizar um novo DNA, começando pelas regiões em dupla fita, local onde cada um dos *primers* se ligou ao molde da amostra de DNA. A Taq irá promover a síntese de DNA apenas na região em dupla fita. A síntese ocorre a uma taxa de aproximadamente 20 nucleotídeos por segundo e em 1 minuto uma nova cópia do fragmento que se quer analisar é sintetizada. A reação agora é novamente aquecida a 95°C causando novamente a separação de todo DNA em fita simples. Ao final do

primeiro ciclo há duas fitas da molécula original de DNA mais duas cópias da região de interesse. A temperatura é novamente reduzida a 55°C e agora os *primers* irão se ligar aos 4 sítios nas novas duas cópias e também na molécula original de DNA. A temperatura do ciclo é novamente elevada a 72°C e as 4 fitas individuais são multiplicadas. Esses ciclos são repetidos várias vezes, tipicamente 30 vezes, num aparelho chamado termociclador. Ao final de 30 ciclos de amplificação existem, tipicamente, um milhão de cópias do segmento de DNA de interesse para cada molécula molde original da amostra inicial. É assim que podemos selecionar um fragmento específico dentro de todo o DNA. Habitualmente, o método de PCR é empregado em associação a outros métodos, como hibridização em placa, *dot-blot*, seqüenciamento, entre outros. Sua grande sensibilidade permite a amplificação a partir de amostras muito escassas de DNA ou RNA. Por outro lado, essa mesma característica torna o método muito suscetível à possibilidade de contaminação por material nucléico exógeno ou amplificado de outra amostra. Para minimizar esse risco, os modernos laboratórios de biologia molecular contam com uma estrutura física onde o preparo de reagentes, a manipulação das amostras e os métodos de amplificação e detecção são realizados em salas separadas e isoladas umas das outras.

2.1.6.8 RT-PCR

Trata-se de método de amplificação a partir de moléculas de RNA. Após a extração do RNA, sintetiza-se cDNA (DNA complementar) empregando-se

a enzima transcriptase reversa de origem viral. A partir do cDNA, emprega-se o método de PCR para amplificação. Pode ser um método qualitativo ou quantitativo. No caso de determinação quantitativa, o ensaio é realizado com amplificação paralela de amostra com quantificação conhecida, para correção do cálculo final. (FLEURY, 2000)

2.1.6.9 *Nested-PCR*

Nesta técnica, realizam-se dois ensaios consecutivos de PCR. No primeiro, um segmento de DNA é amplificado com um par de *primers*, empregando-se cerca de 15 a 30 ciclos de amplificação. Uma alíquota do amplificado é então submetida à nova amplificação usando-se novo par de *primers*, localizados internamente em relação à posição do par de *primers* inicialmente utilizados. A segunda amplificação com *primers* diferentes, garante a especificidade da reação. Essa técnica apresenta sensibilidade ainda superior à do PCR e é recomendada quando a concentração de material nucléico é extremamente reduzida. Como esperado, os riscos de contaminação são ainda maiores do que os mencionados com a técnica do PCR.

2.1.6.10 *PCR Multiplex*

Nessa abordagem, são amplificados dois ou mais segmentos diferentes de DNA em uma única reação, utilizando-se para isso um conjunto de pares de *primers*. Essa técnica permite a co-amplificação de mais de um segmento do

genoma. Isso garante praticamente 100% de especificidade para a reação, no caso da identificação de microorganismos, eliminando os riscos de falso-positivos. Também, usualmente, são incluídos na reação multiplex, *primers* para controle interno da reação de amplificação. Para essa finalidade, pode-se utilizar, por exemplo, *primers* para amplificação de segmento de gene da globina beta. A inclusão do controle interno de amplificação visa à eliminação dos falso-negativos que ocorrem devido à inibição da reação de amplificação e permite, assim, uma análise de materiais como urina, líquor, líquido amniótico e efusões, onde a presença de inibidores da reação de amplificação tem sido descrita com frequência.

2.1.6.11 *Extração de ácidos nucléicos*

A extração tem por finalidade solubilizar os ácidos nucléicos e, em alguns casos, também lisar as células, núcleos e organelas. Pode ser realizada com a desintegração dos tecidos adicionando-se tampão de extração e procedendo-se uma homogeneização. O extrato é obtido separando-se o material insolúvel por uma série de centrifugações.

2.1.6.11.1 Funções de cada reagente na extração

Tampão: proporcionar o pH ideal para a manutenção da integridade das moléculas de ácidos nucléicos.

Detergentes (*SDS - Sodium Dodecyl Sulfate*): substâncias tensoativas solúveis. Agem principalmente dissociando as proteínas dos ácidos nucléicos e dissolvendo os lipídeos das membranas.

EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetracético): sua principal função é quelar Mg^{+2}

Mg^{+2} : promove agregação dos ácidos nucléicos cofator de desoxirribonucleases

Fenol: age desnaturando as proteínas permitindo o isolamento de DNA e RNA de misturas biológicas complexas. Com a utilização do fenol, após uma centrifugação em baixa rotação, a mistura separa-se em duas fases, uma aquosa (superior) e uma orgânica (inferior), sendo que a maior parte das proteínas permanece na interface. A separação dos ácidos nucléicos entre as fases ocorre de acordo com fatores como: natureza do ácido nucléico (DNA ou RNA), pH, Concentração de sais, presença de clorofórmio e SDS. O fenol deve ser previamente equilibrado (adição de tamponante) levando-se em conta as condições de pH e salinidade.

O fenol puro é um sólido cristalino branco, quando liquefeito constitui-se em um líquido claro e incolor. O aparecimento de cor rósea indica a presença de

produtos da oxidação do fenol (quinonas). Tais contaminantes podem provocar clivagens no DNA e, portanto, devem ser eliminados através de redistilação do fenol. Essa oxidação pode ser atenuada com a adição de 8-hidroxiquinolina, que além de ser antioxidante tem a vantagem de deixar o fenol com cor amarelada, facilitando a sua visualização durante a extração de DNA.

Clorofórmio: devido a sua habilidade de desnaturar proteínas, aumenta a eficiência das extrações de ácidos nucleicos, enquanto sua alta densidade permite melhor separação das fases. Usualmente utiliza-se uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

Álcool Isoamílico: é adicionado ao clorofórmio como antiespumante.

Precipitação: a adição de cátions monovalentes (sal: acetato de sódio) e etanol induz alterações estruturais nas moléculas de ácidos nucleicos provocando a agregação das moléculas e subsequente precipitação. A precipitação com etanol é útil para concentrar os ácidos nucleicos e para remover resíduos de fenol e clorofórmio.

2.2 O Laboratório de Pesquisa em DNA Forense

O laboratório de DNA forense é um lugar *sui generis*. Os procedimentos ali desenvolvidos são mistos. Envolvem operações com produtos químicos, físicos e biológicos. A estrutura física e técnica deve ser adequada para trabalhar com

esta variedade de produtos e possuir equipamentos e materiais de segurança adequados a cada procedimento. Conceitos utilizados em áreas específicas da química, da microbiologia conjuntamente com as regras gerais de conduta em laboratórios de pesquisa, devem ser aplicados no planejamento e construção da área física do laboratório. Um manual de biossegurança específico ao laboratório de pesquisa em DNA na área forense deve ser preparado de acordo com as especificidades das atividades realizadas.

2.2.1 Aspectos físicos

2.2.1.1 Arquitetura

O espaço físico é um importante aspecto que contribui para a confiabilidade dos experimentos realizados como para a proteção da saúde e do meio ambiente. O processo de planejamento deve envolver os pesquisadores e técnicos de forma que sejam cumpridos os padrões e normas que assegurem o cumprimento das condições de segurança espaciais e ambientais necessárias ao espaço físico a ser projetado. (SIMAS, 1996)

O levantamento destas condições de segurança pode ser obtido através da elaboração de um programa arquitetônico que vise estabelecer relações entre o espaço e as atividades a serem desenvolvidas.

Um aspecto importante a ser levado em conta no programa arquitetônico é o dimensionamento, que deve ser feito com uma projeção com prazo de vida útil de 10 a 20 anos. (SIMAS, 1996)

A área bruta total de uma edificação laboratorial não pode já ser determinada nesta fase, mas pode-se prever de 1¼ a 2 vezes a área do espaço líquido. Por espaço líquido entende-se a área computada para atender aos requisitos básicos necessários e não inclui as áreas de suporte de construção, como circulação horizontal, vertical e espaços técnicos.

É importante a elaboração de um fluxograma que irá se preocupar com a movimentação exigida num processo de trabalho. Em especial no laboratório forense o aspecto da circulação é importante para diferenciar as diversas áreas de procedimentos e evitar a contaminação das amostras. Um programa de necessidades, elaborado num primeiro momento através de fichas onde se relatem todos os aspectos ambientais de flexibilidade, os principais equipamentos, características de iluminação, movimentação e pureza do ar, linhas de água, gases, esgotamento sanitário e outros.

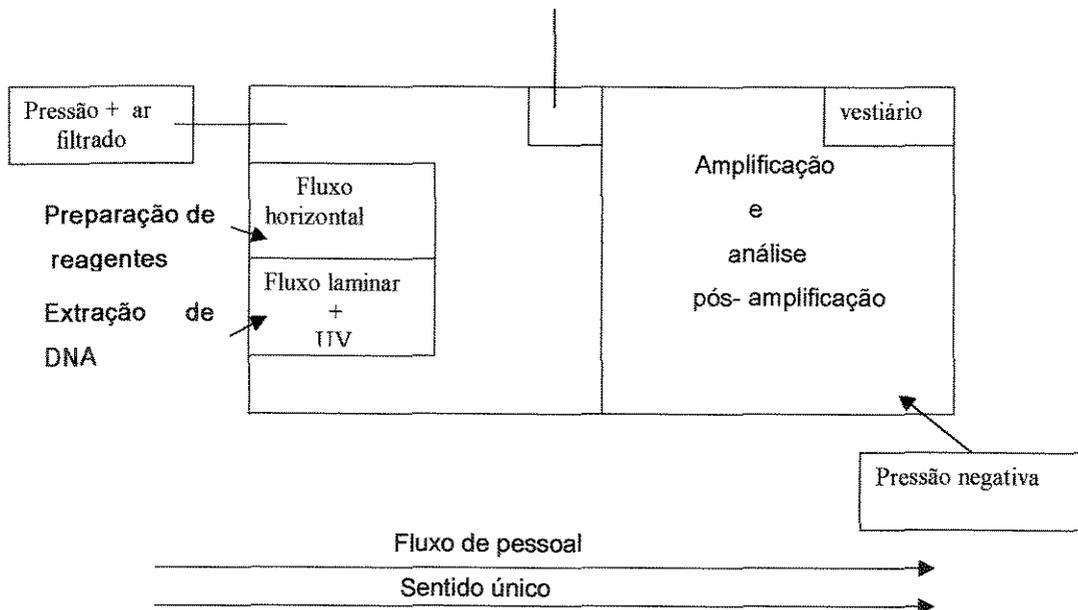
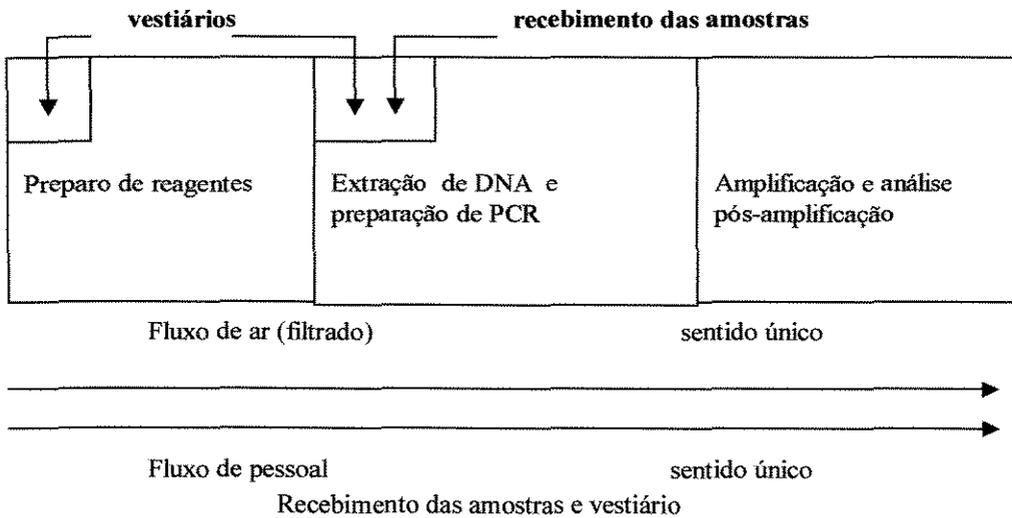
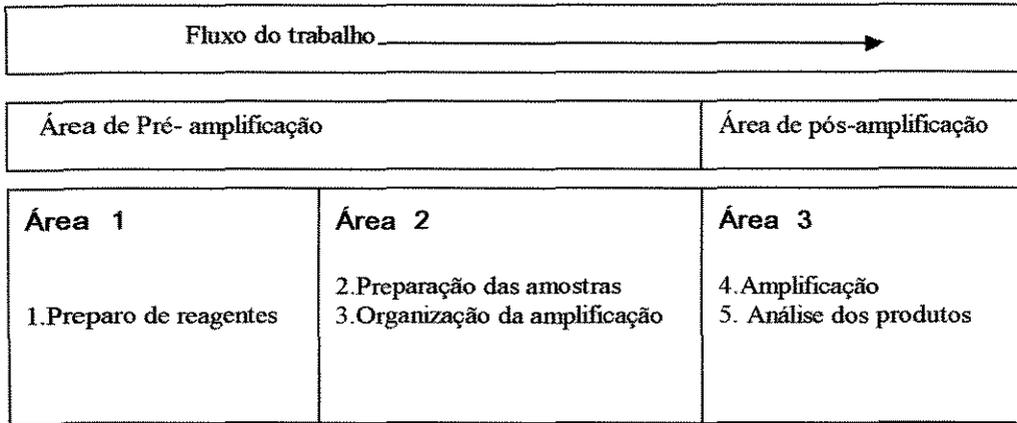
Algumas características básicas não podem ser esquecidas. As paredes e pisos devem ser lisos, de material que facilite a limpeza e seja resistente aos desinfetantes normalmente utilizados. O espaço para armazenamento de materiais deve ser adequado de modo a evitar acúmulo sobre as mesas. As instalações para guarda de roupa e objetos pessoais deve ser fora do laboratório e

adequadas ao número de pessoas que trabalhem no laboratório. Deve haver uma pia para lavagem de mão, de preferência com acionamento automático e perto da porta. A ventilação deve ser mecânica sem recirculação do ar. (SOUZA,1998) O ar deve ser equilibrado, fluindo das áreas de menos risco para as de maior risco. As linhas de serviço (gás, oxigênio, nitrogênio, ar comprimido) devem utilizar cores para facilitar a identificação das canalizações. (SIMAS,1996) A localização dos cilindros de gases e líquidos especiais deve ser em uma área externa, bem ventilada, longe das portas de saída onde o acesso seja restrito a pessoas autorizadas.

Deve estar previsto a existência de chuveiros de emergência e lava-olhos em todos os laboratórios, especialmente os químicos.

Em especial o laboratório de pesquisa de DNA, deve ser projetado de forma que a área de recebimento e preparo de amostras esteja separada da área de ampliação esteja separada da área de pós-ampliação, de forma a promover um fluxo de trabalho linear. Há uma tendência de mudança de paradigma quando se analisa o aspecto biossegurança no sentido de proteger os procedimentos de biotecnologia do público, mais do que proteger o público dos seus efeitos adversos (TEXEIRA,1996).

Modelos de plantas de laboratório para pesquisa de DNA.



2.2.1.2 *Requisitos físicos: Níveis de biossegurança (NB)*

Os níveis de biossegurança podem ser classificados em quatro níveis : NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4, crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção e requisitos de segurança. O nível de biossegurança de um experimento será determinado baseado em fatores tais como o nível de patogenicidade do organismo, modo de transmissão maior classe de risco envolvido no experimento.

Nível de biossegurança 1 - NB-1: É adequado ao trabalho que envolva agente com o menor grau de risco para o pessoal do laboratório e para o meio ambiente. O laboratório, neste caso, não está separado das demais dependências do edifício. O trabalho é conduzido, em geral, em bancada. Os equipamentos de contenção específicos não são exigidos. O pessoal de laboratório deverá ter treinamento específico nos procedimentos realizados no laboratório e deverão ser supervisionados por profissional com treinamento específico na área.

Práticas microbiológicas exigidas para o NB-1

O acesso ao laboratório deve ser limitado ou restrito de acordo com a definição do pesquisador principal, quando estiver sendo realizado experimento.

As superfícies de trabalho devem ser descontaminadas uma vez ao dia ou sempre que ocorrer derramamento de material viável. Todo resíduo líquido ou sólido contaminado deve ser descontaminado antes de ser descartado.

Deve-se utilizar dispositivo mecânico para pipetagem, pois é impróprio e arriscado pipetar com a boca. É proibido comer, beber, fumar e aplicar cosméticos nas áreas de trabalho. Alimentos devem ser guardados em áreas específicas para este fim, fora do laboratório.

Antes de deixar o laboratório, deve-se lavar as mãos. Objetivando a prática de higiene pessoal, pias para lavagem das mãos e roupas para proteção (uniformes e jalecos) devem ser utilizados.

Práticas laboratoriais especiais para o NB-1: Materiais contaminados só podem ser retirados do laboratório em recipientes rígidos e à prova de vazamentos. Deve ser providenciado um programa rotineiro de controle de insetos e roedores.

Equipamentos de contenção exigidos para o NB-1: Em geral para o NB-1 não são exigidos equipamentos de contenção de agentes classificados no Grupo de Risco I.

Instalações laboratoriais para o NB-1: O laboratório deve ser desenhado de modo a permitir fácil limpeza e descontaminação. Deve haver uma autoclave dentro do prédio que abriga o laboratório. É recomendável que a superfície das bancadas seja impermeável à água e resistente a ácidos, álcalis,

solventes orgânicos e a calor moderado. Os espaços entre as bancadas, cabines e equipamentos devem ser suficientes de modo a permitir acesso fácil para limpeza. Cada laboratório deve possuir uma pia para lavagem das mãos, além de um serviço de pronto-socorro, equipamento em fácil acesso.

Nível de biossegurança 2 - NB-2: É semelhante ao NB-1 e é adequado ao trabalho que envolva agentes de risco moderado para as pessoas e para o meio ambiente.

Difere do NB-1 nos seguintes aspectos: O pessoal de laboratório deve ter treinamento técnico específico no manejo de agentes patogênicos e devem ser supervisionados por cientistas competentes. O acesso ao laboratório deve ser limitado durante os procedimentos operacionais. Determinados procedimentos nos quais exista possibilidade de formação de aerossóis infecciosos (por exemplo, corte de estruturas ósseas durante o preparo da amostra) devem ser conduzidos em cabines de segurança biológica ou outro equipamento de contenção física.

Práticas microbiológicas exigidas para o NB-2: As práticas microbiológicas exigidas para o NB-2 são as mesmas já descritas para o NB-1.

Práticas especiais para o NB-2: Além das práticas especiais descritas para o NB-1 devem ser incluídas para o NB 2 as práticas a seguir discriminadas:

O pesquisador principal tem a responsabilidade de limitar o acesso ao laboratório. Cabe ao pesquisador principal a responsabilidade de avaliar cada situação e autorizar quem poderá entrar ou trabalhar no laboratório.

O pesquisador principal deve estabelecer políticas e procedimentos com ampla informação a todos que trabalhem no laboratório sobre o potencial de risco relacionado ao trabalho, bem como sobre os requisitos específicos para entrada em laboratório.

No interior do laboratório, os freqüentadores devem utilizar roupas apropriadas tais como jalecos, gorros, máscaras etc. Antes de sair do laboratório para áreas externas (biblioteca, cantina, escritório administrativo), a roupa protetora deve ser retirada e deixada no laboratório. Deve ser colocado um aviso sinalizando o risco, identificando o agente e o nome do pesquisador principal, endereço completo e diferentes possibilidades de sua localização ou outra pessoa responsável. Todos os requisitos necessários para a entrada no laboratório devem estar assinalados na porta de entrada.

É proibida a admissão de animais que não estejam relacionados ao trabalho em execução no laboratório. Todo lixo de laboratório deve ser adequadamente descontaminado antes de ser descartado.

Agulhas e seringas hipodérmicas devem ser usadas somente para inoculação parenteral e para aspiração de fluidos de animais de laboratório e de garrafas de diafragmas. Devem ser usadas somente seringas com agulha fixa ou agulha e seringa em uma unidade única nas atividades de injeção ou aspiração de fluidos.

Extrema precaução deve ser tomada quando forem manuseadas agulhas e seringas de modo a evitar a auto-inoculação e a produção de aerossóis

durante o uso e o descarte. As agulhas não devem ser entortadas, quebradas, recapeadas ou removidas da seringa após o uso. Agulha e seringa devem ser imediatamente colocadas em recipiente resistente a prova de perfurações e descontaminados, preferencialmente autoclavados antes do descarte. Desaconselha-se a reutilização de seringas.

Derramamentos ou acidentes que resultem em exposição a organismo contendo moléculas de DNA/RNA recombinante devem ser imediatamente notificados à CIBio e à CTNBio, com providências de avaliação médica, vigilância e tratamento, sendo mantido registro dos acidentes e das providências adotadas.

Um Manual de Biossegurança deve ser preparado de acordo com as especificidades das atividades realizadas.

Todo o pessoal deve ser orientado sobre os possíveis riscos e para a necessidade de seguir as especificações de cada rotina de trabalho, procedimentos de biossegurança e práticas estabelecidas no manual.

Equipamentos de contenção para O NB-2: Devem ser utilizadas cabines de segurança biológica (Classe I ou II), ou outro dispositivo de contenção pessoal ou dispositivos de contenção física sempre que:

Sejam realizados procedimentos com elevado potencial de criação de aerossóis, como centrifugação, trituração, homogeneização, agitação vigorosa, abertura de recipientes contendo material onde a pressão interna possa ser

diferente da pressão ambiental, inoculação intranasal em animais e em cultura de tecidos infectados;

O material das amostras só poderá ser centrifugado fora de cabines de segurança se forem utilizadas centrifugas de segurança e frascos lacrados. Estes só deverão ser abertos no interior da cabine de segurança biológica.

Instalações laboratoriais para o NB-2: As instalações laboratoriais exigidas para o NB-2 devem atender as especificações estabelecidas para o NB-1 acrescidas da seguinte exigência:

Uma autoclave deve estar disponível para descontaminação no interior ou próximo ao laboratório de modo a permitir a descontaminação de todo material previamente ao seu descarte.

Nível de biossegurança 3-NB-3: É aplicável aos locais onde forem desenvolvidos trabalhos com OGM resultantes de agentes infecciosos Classe 3, que possam causar doenças sérias e potencialmente letais, como resultado de exposição por inalação.

O pessoal do laboratório deve ter treinamento específico no manejo de agentes patogênicos e potencialmente letais, devendo ser supervisionados por cientistas experientes com esses agentes.

Todos os procedimentos que envolverem a manipulação de material infeccioso devem ser conduzidos dentro de cabines de segurança biológica ou

outro dispositivo de contenção física. Os manipuladores devem usar roupas de proteção individual.

O laboratório deverá ter instalações compatíveis para o NB-3.

Para alguns casos, quando não existirem as condições específicas para o NB-3, particularmente em instalações laboratoriais sem área de acesso específica, ambientes selados ou fluxo de ar unidirecional, as atividades de rotina e operações repetitivas podem ser realizadas em laboratório com instalações NB-2, acrescidas das práticas recomendadas para NB-3 e o uso de equipamentos de contenção para NB-3.

Cabe ao Pesquisador Principal a decisão de implementar essas modificações, comunicando-as a CIBio e CTNBio.

Práticas microbiológicas para o NB-3: Além das práticas microbiológicas estabelecidas para o NB-2, o trabalho com agentes de risco 3 exige que menores de 18 anos de idade não entrem no laboratório.

Se forem realizados experimentos com agentes que exigirem nível de contenção inferior a NB-3, eles devem ser conduzidos de acordo com as práticas laboratoriais estabelecidas para o NB-3.

Práticas especiais para o NB-3: Além das práticas estabelecidas para o NB-2 devem ser obedecidas para o NB-3 as práticas a seguir discriminadas:

As superfícies de trabalho das cabines de segurança e de outros equipamentos de contenção devem ser descontaminadas sempre ao término do

trabalho. Toalhas absorventes com uma face de plástico voltado para baixo, recobrimo as superfícies das bancadas, facilitam o trabalho de limpeza.

Deve ser usado uniforme completo específico para as áreas de trabalho com OGM. É proibido o uso dessas roupas fora do laboratório. As mesmas devem ser descontaminadas antes de serem encaminhadas a lavanderia ou para descarte.

Animais de laboratório em NB-3 devem ser mantidos em sistemas de confinamento parcial (sistemas de caixas com filtros e paredes rígidas ou sistemas de contenção de caixas equipadas com radiação ultravioleta e refletores).

Os sistemas convencionais de caixas só poderão ser usados quando todo o pessoal utilizar dispositivos e roupas protetoras. Esses dispositivos devem incluir roupa completa do tipo escafandro e respiradores. Todo o pessoal deverá tomar banho ao deixar essas áreas de trabalho.

As linhas de vácuo devem estar protegidas com filtro de ar com elevada eficiência (filtros HEPA, High Efficiency Particulated Air) e coletores com líquido desinfetante.

Equipamentos de contenção para o NB-3: Cabines de segurança biológica (Classes I, II ou III), ou outra combinação apropriada de dispositivos de proteção pessoal e contenção física devem ser usados em qualquer operação com OGM. Estas incluem manipulação de culturas e de material clínico ou

ambiental, cultivo de tecidos ou fluidos infectados de animais em experimentação ou ovos embrionados, e necropsia de animais em experimentação.

Instalações laboratoriais para o NB-3: O laboratório deverá estar separado das áreas de trânsito irrestrito do prédio. É exigido um sistema de dupla porta como requisito básico para entrada no laboratório a partir de corredores de acesso ou para outras áreas contíguas.

A separação física entre laboratório de elevada contenção e os demais laboratórios ou corredores de acesso, pode ser por sistema de dupla porta, com sala para troca de roupas, chuveiros, bloqueio de ar e outros dispositivos, para acesso ao mesmo em duas etapas.

As superfícies das paredes internas, pisos e tetos devem ser resistentes a água, de modo a permitir acesso fácil para limpeza. Toda a superfície deve ser selada e sem reentrâncias, para facilitar limpeza e descontaminação.

As superfícies das bancadas devem ser impermeáveis a água e resistentes aos ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado. O mobiliário do laboratório deve ser rígido, com espaçamentos entre as bancadas, cabines e equipamentos para permitir acesso fácil para limpeza.

Próxima à porta de saída cada laboratório deve ter pelo menos uma pia para lavar as mãos. A torneira deve ter um sistema automático de acionamento ou sistema de pedais.

As janelas do laboratório devem ser fechadas ou lacradas. As portas de acesso ao laboratório ou ao módulo de contenção devem possuir fechamento automático.

Deve existir autoclave para a descontaminação de resíduos, localizada no interior do laboratório ou em área contígua, preferencialmente com sistema de dupla porta.

O laboratório deve ter um sistema de ar independente, com ventilação unidirecional, onde o fluxo de ar penetra no laboratório pela área de entrada. Não deve existir exaustão do ar para outras áreas do prédio. O ar de exaustão não deve, portanto, ser recirculado e deverá ser filtrado através de filtro HEPA antes de ser eliminado para o exterior do laboratório. Deve haver verificação constante do fluxo de ar no laboratório.

O ar de saída das cabines de segurança biológica com filtros HEPA de elevada eficiência (Classe I ou Classe II) deve ser retirado diretamente para fora do edifício por sistema de exaustão. O ar de saída das cabines pode recircular no interior do laboratório se a cabine for testada e certificada anualmente.

Nível de biossegurança 4-NB-4: este nível de contenção deve ser usado sempre que o trabalho envolver OGM resultante de organismo receptor ou parental classificado como classe de risco 4 ou sempre que envolver organismo receptor, parental ou doador com potencial patogênico desconhecido.

Práticas especiais para o NB-4: Devem ser obedecidas as práticas especiais estabelecidas para o NB-3 acrescida das exigências a seguir discriminadas:

Nenhum material deverá ser removido do laboratório de contenção máxima, a menos que tenha sido autoclavado ou descontaminado, exceção feita aos materiais biológicos que necessariamente tenham que ser retirados na forma viável ou intacta.

Suprimentos e materiais a serem usados no laboratório devem ser descontaminados em autoclave de dupla porta, câmara de fumigação, ou sistema de ante-câmara pressurizada.

O material biológico viável, a ser removido de cabines Classe III ou do laboratório de contenção, deve ser acondicionado em recipiente de contenção inquebrável e selado. Este, por sua vez, deve ser acondicionado dentro de um segundo recipiente também inquebrável e selado, que passe por um tanque de imersão contendo desinfetante, ou por uma câmara de fumigação ou por um sistema de barreira de ar.

Equipamentos ou materiais que não resistam a temperaturas elevadas devem ser descontaminados utilizando-se gases ou vapor em câmara específica.

Somente pessoas que trabalham no laboratório devem ter permissão para entrar. O supervisor tem a responsabilidade final no controle do acesso ao laboratório. Por questão de segurança o acesso ao laboratório deve ser bloqueado

por portas hermeticamente fechadas. A entrada deve ser controlada pelo pesquisador principal, ou por outra pessoa responsável pela segurança do prédio.

Antes de adentrar ao laboratório as pessoas devem ser avisadas sobre o potencial de risco e instruí-las sobre as medidas apropriadas de segurança. As pessoas autorizadas devem cumprir com rigor as instruções de procedimento para entrada e saída do laboratório. Deve haver um registro, por escrito, de entrada e saída de pessoal, com data, horário e assinaturas. Devem ser definidos protocolos para situações de emergência.

A entrada e a saída de pessoal do laboratório deve ocorrer somente após uso de chuveiro e troca de roupa. A entrada e saída de pessoal por antecâmara pressurizada somente deve ocorrer em situações de emergência. Para adentrar ao laboratório a roupa comum, de rua, deve ser trocada por roupa protetora completa e descartável.

Antes de sair do laboratório para a área de banho, a roupa protetora deve ser deixada em área específica para descontaminação antes do descarte. Deve ser organizado um sistema de notificação de acidentes, exposição e absenteísmo do pessoal do laboratório, bem como um sistema de vigilância médica. Deve-se ainda, prever uma unidade de quarentena, isolamento e cuidados médicos para o pessoal suspeito de contaminação.

Equipamentos de contenção para o NB-4: As manipulações com agentes de classe de risco 4, conduzidas no laboratório, devem ser realizadas em cabine de segurança biológica Classe III, ou cabines Classes I ou II, neste caso

usadas em associação com roupas de proteção pessoal com pressão positiva, ventiladas por sistema de suporte de vida.

Instalações laboratoriais para o NB-4: A unidade de contenção máxima deve estar localizada em prédio separado ou em área claramente demarcada e isolada do edifício. Devem ser previstas câmaras de entrada e saída de pessoal separadas por chuveiro. Deve ser previsto, ainda, um sistema de autoclave de dupla porta, câmara de fumigação, ou sistema de ventilação com ante-câmara pressurizada para o fluxo de materiais para o interior do laboratório.

Paredes, tetos e pisos do laboratório devem ser construídos com sistema de vedação interna, para permitir maior eficiência da fumigação, e evitar o acesso de animais e insetos. As superfícies internas do laboratório devem ser resistentes a líquidos e produtos químicos. O sistema de drenagem do solo deve conter depósito com desinfetante químico eficaz para o agente em questão, conectado diretamente a um sistema coletor de descontaminação de líquidos. O sistema de esgoto e ventilação deve estar acoplado a filtros HEPA de elevada eficiência.

O sistema de suprimento de luz, dutos de ar e linhas utilitárias devem, preferencialmente, estar posicionados verticalmente para evitar o acúmulo de poeira.

A descontaminação de material deve ser realizada por meio de sistema de autoclave de dupla porta com controle automático, para permitir a retirada de material pelo lado oposto. Materiais e equipamentos que não possam ser

descontaminados na autoclave devem passar por tanque de imersão com desinfetante, ou câmara de fumigação.

O líquido efluente, antes de ser liberado do laboratório, deve ser descontaminado com tratamento por calor. Os líquidos liberados de chuveiros ou de sanitários devem ser descontaminados com produtos químicos ou pelo calor.

O sistema de ar no laboratório deve prever uma pressão diferencial e fluxo unidirecional de modo a assegurar diferencial de pressão que não permita a saída do agente de risco. No sistema de ar devem estar acoplados manômetros, com sistema de alarme, que acusem qualquer alteração sofrida no nível de pressão exigido para as diferentes salas. O sistema de exaustão deverá estar acoplado a filtros HEPA de elevada eficiência.

O ar liberado pelas cabines de segurança biológica Classe I e Classe II pode ser eliminado para dentro ou fora do ambiente do laboratório desde que no sistema de exaustão esteja acoplado filtros HEPA. A cada seis meses as cabines biológicas devem ser testadas e certificadas.

A exaustão de ar das cabines Classe III deve ser realizada sem recirculação usando sistema de dupla filtragem com filtros HEPA em série, por sistema de exaustão do laboratório.

O laboratório deve ter local para o pessoal vestir roupas específicas com pressão positiva e sistema de suporte de vida. O sistema deve prever alarmes e tanques de respiração de emergência.

O laboratório deve ter chuveiro para a descontaminação química das superfícies da roupa antes da saída da área.

O ar deve ser insuflado através de filtros HEPA e eliminado para o exterior através de dutos de exaustão, cada um com dois filtros HEPA colocados em série e com alternância de circuito de exaustão automatizado. A entrada de ar de insuflamento deverá estar protegida com filtro HEPA.

Deve haver um sistema de descontaminação, com autoclave de dupla porta. As instalações de filtros e esgotos devem estar confinados à área de contenção.

2.2.1.3 Sinalização

O equipamento e as zonas de risco devem estar identificadas pela sinalização padronizada referente a risco. A correta sinalização quer seja através da colocação correta de etiquetas ou através da sua função como medida educacional e pedagógica é um dos itens fundamentais na política de segurança do laboratório forense. A sinalização aumenta nível de percepção quanto ao risco que estão expostos os profissionais e age como medida profilática na prevenção de acidentes. (TEIXEIRA,1996) Na porta de acesso deve ser colocado cartazes visando a fornecer informações básicas a respeito do pesquisador responsável, do tipo de risco envolvido associando a figura de símbolos internacionais. A

sinalização das embalagens que contém material biológico deve ser feita de forma a fornecer claramente a informação da presença de risco biológico.

2.2.1.4 *Proteção contra incêndio*

O incêndio é um dos piores acidentes de laboratório que deve ser evitado a todo custo ou combatido no seu início. Após alguns minutos torna-se incontrolável e seu combate é quase tão destruidor quanto o próprio, pois o que não for consumido pelas chamas torna-se imprestável pela alta temperatura do local e pela degradação que ocasiona. São três os métodos de extinção do fogo:

Resfriamento: quando se retira o calor. É um dos métodos mais eficientes de extinção de incêndio, ou seja, quando baixamos a temperatura do combustível até o ponto em que não existam mais condições de desprendimentos de gases ou vapores quentes. A água, largamente usada no combate a incêndios, é um dos mais eficientes agentes resfriantes.

Isolamento: quando se retira o material (combustível) que poderia ser atingido pelo fogo, evitando a sua propagação para outras áreas.

Abafamento: quando se retira o comburente (oxigênio), abaixando os níveis de oxigenação da combustão.

O oxigênio é encontrado na atmosfera na proporção de 21%. Quando esta porcentagem é limitada ou reduzida a 15%, o fogo deixa de existir² (USP, 2001)

A redução dos riscos de incêndio depende de alguns fatores fundamentais e decisivos:

A preocupação seria de cada funcionário, a responsabilidade, o conhecimento das causas e a dedicação e bom senso de todos os que utilizam ou freqüentam o local, mapeamento e a divulgação periódica dos pontos de risco, a supervisão e a segurança sistemática da chefia em relação aos riscos de incêndio, treinamento de funcionários no combate imediato aos focos de incêndio.

Por outro lado existem também os fatores considerados responsáveis pela maioria dos incêndios. O desconhecimento da periculosidade dos materiais e equipamentos do laboratório, o excesso de confiança, a negligência e a monotonia ante operações cotidianas, a falta de manutenção e revisão periódica de equipamentos, instalações elétricas e condutores de gases, utilização de equipamentos de forma inadequada, forçada ou deteriorados, utilização de materiais de baixa qualidade, vencidos ou mal conservados, exposição de funcionários a rotina extenuante de trabalho, sob ação de estresse e tensão social.

A indiferença ante situações anormais como temperatura, odores ou ruídos estranhos, assim como a proximidade de materiais incompatíveis passíveis

² USP, Instituto de física Noções básicas de prevenção de incêndio <http://adm.if.usp.br/basicincendios.htm>

de reações violentas e a sinalização inadequada, fumar em ambientes de risco, esquecer bicos de gás acessos, manipular voláteis fora da capela, manter materiais reativos em bancada também colaboram com o aumento do risco de incêndios.

Os materiais explosivos, combustíveis, oxidantes e redutores fortes devem ser armazenados separadamente em depósitos especialmente construídos e fechados. Os condutores elétricos e as tubulações de gases devem ter revisões especialmente programadas e estar devidamente isolados de materiais como madeira tecido e papel.

Nunca permitir adaptações e ligações não planejadas, evitar pessoas não treinadas em operações consideradas de risco. Os equipamentos de combate a incêndio permanecer em local de fácil acesso e dentro da validade.

Algumas substâncias devem ser mantidas em local distante do laboratório ou protegidas por armários anti-chamas e usadas sob vigilância e treinamento adequados.

Cada laboratório deve ter sempre em destaque os seus produtos de maior risco devidamente identificados e sinalizados com o maior número de informações possíveis como ponto de fuga, pressão de vapor, ponto de ignição e limite de inflamabilidade. Esses dados são facilmente conseguidos na literatura específica e devem ser reproduzidos de acordo com a periculosidade do material e do local a ser utilizado.

2.2.1.4.1 Extintores

O laboratório deve possuir específicos para os diversos tipos de materiais: água, papel; tecido e madeira, eletricidade, metais e líquidos inflamáveis.

Outros equipamentos de combate a incêndio como hidrantes, areia seca, mantas de amianto também requerem treinamento para sua utilização, porém de uso mais simples, rápido e barato.

A ocorrência de fenômenos naturais incomuns e imprevisíveis como raios, abalos sísmicos, radiações ou acidentes inesperados como desabamentos, explosões e abalamentos, podem iniciar incêndios que teriam sido evitados se as regras fundamentais relativos aos principais riscos fossem observadas. Há a possibilidade de um incêndio ser iniciado propositadamente por vingança, descontentamento, vandalismo, e que neste caso novamente o acesso controlado aos materiais perigosos ou de alto risco é fundamental.

A combustão somente ocorre em presença de oxigênio. Algumas ocorrem em presença de cloro. As condições para a combustão:

De 0 a 8% de O ₂	Não ocorre
De 8 a 13% de O ₂	Lenta
De 13 a 21% de O ₂	Viva

Tabela 1 Percentual de Oxigênio na combustão

Para que haja fogo é necessário que existam os seguintes fatores estejam presentes: Combustível, calor ,oxigênio comburentes .

O fogo é um processo químico que obedece rigorosamente as Leis das Proporções Definidas ou Leis de Proust, ou seja, a configuração desordenada desses três elementos não produzirá o fogo.

A combustão pode ocorrer pelas seguintes formas de combustão: Combustão viva, desprende luz e calor; exemplo: gasolina em chamas; combustão lenta: não desprende luz, exemplo: oxidação do ferro.

Os materiais combustíveis podem ser classificados em:

Combustíveis sólidos: O que entra em combustão não é o corpo em si, mas os vapores despreendidos. Os fatores que afetam a combustibilidade dos combustíveis sólidos são a composição química, ou seja, os materiais mais combustíveis encerram os elementos carbono, enxofre e hidrogênio; e as

dimensões, os materiais finamente divididos entram em combustão mais rapidamente; exemplo, serragem.

Combustíveis Líquidos: também não ardem somente os vapores desprendidos da sua superfície é que entram em combustão.

Os fatores que afetam a combustibilidade são a quantidade de vapores, superfície exposta, volatibilidade, temperatura.

Combustíveis gasosos: via de regra são acondicionados na forma liquefeita, comprimida ou em tubulações.

Existem duas classes de gases, os comburentes: aqueles que possibilitam a existência da combustão. Exemplo: oxigênio; os gases inertes: servem para suprimir a combustão, são os agentes extintores. Exemplos: gás carbônico e nitrogênio.

Em caso de incêndio de pequeno porte: deve-se seguir corretamente as instruções de uso do extintor; ter sempre os extintores em local livre e não distantes mais do que a 1 metro do piso. Após o uso do extintor, notificar o serviço de segurança para recarregamento.

Em caso de incêndio de grande porte, procurar manter a calma e dar o alarme, desligar imediatamente a capela e fechar as saídas de gás; fazer a evacuação com calma; em caso de fumaça, ande o mais rente possível do piso.

2.2.1.4.2 Substâncias Inflamáveis e solventes em geral

Segundo a *National Fire Protection Association* (NFPA-USA), são considerados líquidos inflamáveis os que nas condições normais de temperatura e pressão têm ponto de fulgor abaixo de 93°C. Dividem-se nas seguintes classes:

Classe	Ponto de Fulgor	Exemplos
I	abaixo de -4°C	éter, gasolina
II	entre 4°C e 21°C	álcool etílico, toluol
III	entre 21°C e 93°C	querosene e alguns óleos

Tabela 2 Classes de Incêndios

2.2.1.4.3 Cuidados no Manuseio de Inflamáveis

Ao trabalhar com solventes em geral, deve-se seguir as seguintes recomendações: trabalhar em locais ventilados, trabalhar longe de fontes de calor, utilizar capelas, utilizar máscara adequada, sinalizar o local de trabalho, conhecer a localização dos extintores de incêndio.

2.2.1.4.4 Cuidados na estocagem e transporte

O transporte de substâncias inflamáveis requer planificação e aparelhagem apropriadas. Além da necessidade de embalagem adequada para prevenir rupturas ou quebras, torna-se necessário que os corredores por onde se movimentam tais materiais estejam livres de objetos que possam interferir no trânsito.

Em todos os casos de armazenamento de produtos inflamáveis, deve-se proporcionar ventilação adequada e sistemas de extinção de incêndios apropriados aos compostos estocados.

Nos locais onde se armazena inflamável deve-se colocar avisos de advertência, tais como: Não Fumar/Acesso Restrito/Outros.

No manuseio de inflamáveis deve-se ter em mente a produção de eletricidade estática, que ocorre pela movimentação de corpos com atrito.

No interior do ambiente de trabalho estocar o mínimo necessário, em armários específicos ou em equipamentos de refrigeração devidamente protegidos e aterrados.

2.2.1.4.5 Descarte de Inflamáveis

Deve-se ter nos laboratórios, recipientes adequados para o descarte de líquidos inflamáveis (existem vários no mercado). Durante todo o expediente, os resíduos devem ser descartados nesses recipientes de segurança e nunca lançados diretamente na pia. Após o enchimento desses coletores, o órgão encarregado dessa atividade deve providenciar a sua troca por outro recipiente vazio.

2.2.1.4.6 Incêndios

Avisar imediatamente o pessoal que está próximo do fogo. Iniciar o mais rapidamente possível o combate às chamas, utilizando extintor de CO₂. Avisar imediatamente o serviço de segurança e/ou ligar para o corpo de bombeiros, cujo telefone deve estar sempre em local visível e de fácil acesso.

2.2.1.5 *Mapa de risco*

Mapa de risco é a representação gráfica de um conjunto de fatores presentes nos locais de trabalho, capazes de acarretar prejuízos a saúde dos trabalhadores: acidentes e doenças do trabalho. É uma ferramenta que nos permite a reunião programada de dados que expressam a situação relacionada com os fatores de risco presentes nos postos de trabalho. (TEIXEIRA,2000)

As instruções para sua elaboração constam da NR-5, que trata da CIPA. Algumas críticas se tem feito em relação as dificuldades de se estabelecer o limite de nocividade do trabalho devido os variados tipos de substâncias utilizados (segundo a OIT, são cerca de 80.000) e o pouco conhecimento dos efeitos destas substâncias interagindo com outros fatores como calor, ruído, fumo. Ainda são poucas as empresas habilitadas para realizar avaliações ambientais confiáveis. As suscetibilidades individuais não podem ser ignoradas quando comparadas com os limites de tolerância com sinais e sintomas de sensibilização a algum agente nocivo.

2.2.2 Roteiro de elaboração

A construção do roteiro deverá seguir duas etapas: O levantamento e sistematização do processo de produção e o preenchimento dos documentos da norma regulamentadora NR-5. (MATTOS, 1993)

O levantamento de dados sobre o processo de trabalho, equipamentos instalações, resíduos, equipes materiais e riscos identificados será elaborado em seis documentos:

- 1.Fluxograma de produção, que é a representação gráfica das rotinas de trabalho, com a descrição dos principais passos executados na execução dos exames.
- 2.Descrição de equipamentos e soluções.
- 3.Descrição dos produtos materiais e resíduos.
- 4.Descrição das equipes de trabalho.
- 5.Descrição das

atividades dos trabalhadores. 6.Documento que sintetize o quadro das condições de trabalho sob o ponto de vista de grupo de risco, fontes,doença de trabalho e sintomas.

A segunda etapa consiste no preenchimento dos documentos da NR-5. Esta consiste na representação gráfica através de círculos feita sobre o *layout* do local de trabalho.Nestes deverá estar discriminado a que grupo pertence o risco de acordo com as cores padronizadas; o número de trabalhadores expostos ao risco, o qual deverá ser anotado dentro do círculo. A especialização do risco; a identidade do risco, representada de acordo com a gravidade.

O grau dos riscos será determinado pelo diâmetro dos círculos dentro da planta baixa. Gravidade pequena, diâmetro 1, gravidade média, diâmetro 2, gravidade grande diâmetro 3.Quando houver no mesmo local, riscos diferentes, estes serão representados no mesmo círculo, dividindo-se em setores correspondentes.

VERDE: Físico
VERMELHO: Químico
MARROM: Biológico
AZUL: Mecânico
AMARELO: Ergonômico

Figura 8 Mapa de risco - cores

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

Grupo 1: Riscos físicos: Ruído, vibração, radiações, pressões anormais, frio, calor, umidade.

Grupo 2: Riscos químicos: Poeira, fumos, névoas, vapores, gases, neblina, produtos químicos em geral.

Grupo 3: Riscos biológicos: Vírus, bactérias, protozoários, fungos, parasitas, insetos.

Grupo 4: Riscos ergonômicos: Esforço físico intenso, posturas inadequadas, controle rígido de produtividade, treinamento inadequado, ritmo intenso, alta responsabilidade, trabalho noturno, jornadas prolongadas, monotonia e repetitividade, outras situações causadoras de stress físico ou psíquico.

Grupo 5: Riscos de acidentes: Arranjo físico deficiente, máquinas e equipamentos sem proteção, ferramentas inadequadas ou defeituosas, eletricidade, perigo de incêndio ou explosão, transporte de materiais, edificações, armazenamento inadequado, acidentes com animais peçonhentos, iluminação deficiente, sinalização.

2.3 Equipe de Trabalho

Não somente o coordenador e todo o pessoal do laboratório devem conhecer os riscos envolvidos, mas todos devem estar diretamente interessados e

envolvidos na promoção de condições seguras. Quando não existir métodos descritos, o trabalho deve ser supervisionado por um responsável que conheça ou possa avaliar os riscos envolvidos em uma operação rotineira ou emergencial. Um consultor geral deveria ser indicado para dar suporte de informações e supervisão geral e, pelo menos, analisar criticamente os procedimentos utilizados nos laboratórios como uma pessoa externa ao grupo. A experiência mostra que esta visão dissociada do grupo de trabalho é indispensável como elemento facilitador da análise de riscos simples que possam ser negligenciados. (GASSE JUNIOR, 2001) É necessária a perfeita integração entre coordenação, equipe de trabalho e o periciado que irá fornecer material para as amostras em casos forenses.

2.3.1 Padronização de procedimentos

Os laboratórios de pesquisa, sobretudo os de prestação de serviços em análises de rotina deve adotar as boas práticas de laboratório como base de seu funcionamento. Em ambos os casos haverá sempre a participação de um responsável que estará encarregado de supervisionar os procedimentos adotados, estabelecendo metodologias, orientando a manipulação de produtos perigosos e treinando os participantes nas práticas rotineiras e emergenciais. O uso de acessórios de proteção individual e coletiva, como aventais, luvas de procedimentos, óculos ou máscaras, barreiras de proteção contra radiação, forração descartável de bancadas, deve ser obrigatório.

Os laboratórios devem adotar protocolos de metodologia após testes de sua eficiência e reprodutibilidade. Recomenda-se que os métodos padronizados sejam organizados em formulário e fichário apropriados, de fácil identificação em seus diversos tópicos, prevendo revisão e atualização periódicas. É recomendado também que os procedimentos de segurança e de emergência sejam dispostos em locais de fácil consulta e leitura, como em capelas de ensaios químicos e de fluxo laminar, e junto a nichos de descarte de material biológico ou radioativo. Tais protocolos devem ser de livre acesso aos participantes permanentes e eventuais do laboratório.

Em procedimentos que envolvem riscos de contaminação ou desperdício de material perigoso recomenda-se a elaboração de uma folha de verificação ao se planejar os experimentos, assinalando cada etapa realizada durante a sua execução. O de fazer dupla verificação das etapas executadas também é altamente recomendado para evitar falhas e repetições desnecessárias de ensaios. Após os procedimentos os locais e os instrumentos deverão ser adequadamente higienizados e, conforme o caso, esterilizados.

Se necessário, criar áreas de circulação restrita para manipulação e/ ou descarte de microrganismos, de material geneticamente modificado, de fluidos fisiológicos, de tecidos e órgãos de plantas e animais.

2.3.2 Treinamento de pessoal

As informações sobre a segurança e o treinamento preliminar do pessoal devem ser, a princípio, conduzido pelo responsável do setor. Entende-se que cada novo componente de um laboratório seja minimamente orientado para evitar ocorrências de perigos por conduta laboratorial inadequada.

Os procedimentos de boas práticas de laboratório devem ser fornecidos aos novos integrantes do grupo. Um treinamento geral deve ser programado com os novos componentes de um laboratório ou de um setor no âmbito da unidade, com periodicidade pré-estabelecida.

Na divisão de atribuições de um setor, todos devem ter conhecimento dos encarregados pela execução de tarefas específicas vinculadas à biossegurança. A ausência de uma pessoa deve ser coberta por outra igualmente habilitada na realização das tarefas.

Documentar, um dos principais pontos de sustentação dos sistemas de qualidade reside na documentação de todos os procedimentos realizados em setores de prestação de serviço e de pesquisa. Para tanto é necessário organizar e manter um rígido controle sobre a entrada e a saída de material biológico. Nesses registros devem constar as datas, os nomes dos fornecedores ou receptores, quantidade, local de armazenamento, temperatura de conservação, nome de quem efetuou a manipulação. Este tipo de procedimento permite a

rastreabilidade dos produtos e rejeitos em caso de acidentes, facilitando as medidas corretivas.

Convém reforçar a necessidade de manter os registros dos experimentos realizados no local de trabalho. Cadernos de notas de laboratório e livros de uso de equipamentos são documentos que não devem circular com os usuários dos laboratórios, biotérios e setores que manipulam material biológico, pois serão importantes na rastreabilidade de erros e falhas segurança.

2.3.3 Gestão da qualidade e biossegurança

A abordagem da qualidade, em qualquer área de prestação de serviços e de produção, envolve concertos e procedimentos básicos que garantem a reprodutibilidade dos processos, a confiabilidade dos resultados e a segurança do trabalho e dos produtos gerados pelo trabalho.

Os sistemas de gestão da qualidade, independentemente da denominação adotada, preconizam normas de ação que devem ser de conhecimento de todo pessoal envolvido. Quando o enfoque é o da biossegurança, boas práticas de laboratório são necessárias aos procedimentos específicos para minimizar os riscos de acidentes pessoais e de contaminação, ambiental. A meta é atingir o risco zero em acidentes. Para tanto é imperioso assumir programas de treinamento para a conscientização e o efetivo engajamento nas normas de segurança. A preocupação com biossegurança deve

ser um dos objetivos fundamentais da gestão de qualidade. É parte importante do sistema e políticas para a qualidade de um laboratório. Uma forma de se conseguir o engajamento de todos os envolvidos é através da adoção de boas práticas laboratoriais que envolveriam a adoção também de ações diretas e a promoção de medidas em prol da biossegurança.

2.4 Riscos Químicos

O estudo e conhecimento dos riscos químicos são muito importantes, pois os acidentes de laboratórios com substâncias químicas são os mais comuns e bastante perigosos.

Cuidados e precauções devem ser tomadas no manuseio, transporte e preparação das soluções e reagentes químicos. Além dos cuidados na conservação, a utilização de proteção adequada deve ser observada para evitar riscos. A obediência das normas de segurança é fundamental para evitar acidentes de trabalho. (TORREIRA,1999)

De forma didática, os riscos químicos podem ser classificados por grau de periculosidade, em contaminantes do ar, substâncias tóxicas, explosivos, irritantes, oxidantes, corrosivas, voláteis, inflamáveis e cancerígenas.

2.4.1 Contaminantes do ar

Os contaminantes do ar são: poeiras, fumos, fumaças, aerossóis, neblinas, gases asfixiantes, gases irritantes e vapores. Podem ser gerados durante a manipulação de centrífugas, ultracentrífugas, incubadoras orbitais, liofilizadores, evaporadores, homogenizadores, misturadores, moedores.

Como medida de proteção, além do uso de aventais de manga comprida, óculos de segurança e máscaras, devem ser utilizados anteparos de acrílico ou vidro. A manipulação de substâncias voláteis, geradoras de fumos e vapores, e gases asfixiantes deve ser feita em capelas de segurança com bom sistema de aspiração e filtração do ar, utilizando equipamentos de proteção individual adequados. A manipulação de materiais biológicos, geradores de aerossóis durante a centrifugação (por exemplo), deve ser realizada em câmaras biológicas ou fluxos laminares. Dependendo do grau de risco oferecido pelo agente infeccioso em estudo, mais equipamentos de segurança coletiva devem ser utilizados. (CARVALHO, 1996)

2.4.2 Substâncias tóxicas e altamente tóxicas

O manuseio de substâncias tóxicas pode causar graves danos para a saúde, portanto deve-se evitar o contato com o corpo humano. Cuidados especiais devem ser tomados com as substâncias de ação cancerígena e

teratogênica ou que predispõe a risco de alterações genéticas (exemplo, brometo de etídeo, acrilamida, solventes orgânicos, entre outras).

2.4.3 Substâncias explosivas

As substâncias explosivas devem ser armazenadas em local ventilado, isolado da ação do fogo, calor e faíscas. Deve-se evitar choques.

2.4.4 Substâncias irritantes e nocivas

São possíveis causadores de danos para a saúde em caso de utilização inadequada. Para algumas substâncias não é possível descartar totalmente uma ação cancerígena, alteração genética ou teratogênica.

Tomar precauções evitando contato com o corpo humano e também a inalação de vapores. Devem ser utilizados os EPI e EPC adequados ao trabalho com essas substâncias.

2.4.5 Substâncias Oxidantes

Evitar qualquer contato com substâncias combustíveis que possam desencadear incêndio de difícil extinção. O uso de equipamentos e materiais de proteção é fundamental para a segurança do operador.

2.4.6 Substâncias corrosivas

Evitar contato com os olhos, pele e a roupa mediante medidas de proteção especiais. Proteger a árvore respiratória utilizando máscaras com filtros específicos. Cuidados devem ser tomados na manipulação dessas substâncias devido ao seu efeito teratogênico e cancerígeno.

2.4.7 Líquidos e substâncias voláteis

Manipular com muito cuidado evitando a inalação. Sempre manipular em capela de ar forçado ou exaustão e manipular com equipamentos de proteção adequados.

2.4.8 Substâncias inflamáveis

Manipular longe de chamas ou emissores de calor e centelhas. Quando voláteis, manipular com proteção adequada e em capela de ar forçado ou exaustão. Todas estas substâncias devem ser adequadamente identificadas. Normalmente nos rótulos do fornecedor existe uma adequada instrução no manuseio, com identificação pertinente. Cuidados na manipulação das substâncias sólidas inflamáveis. Na fricção: fósforo branco, vermelho, amarelo, persulfato de fósforo. Na exposição ao ar, boro, carvão vegetal, ferro pirofosfórico, fósforo branco, vermelho e amarelo, hidratos, sódio metálico, nitrato de cálcio e pó de zinco. Na absorção de umidade: cálcio, carbonato de alumínio, hidratos, magnésio finamente dividido, óxido de cálcio, peróxido de bório, pó de alumínio, pó de zinco, potássio, sódio, sulfeto de ferro. Na absorção de pequena quantidade de calor: carvão vegetal, dinitrobenzol, nitrato de celulose, piroxilina, pó de zinco. (TEIXEIRA, 1996)

2.4.9 Classificação dos agentes químicos

Ter sempre em mente que toda substância química é um risco em potencial, é interessante basear-se em alguma classificação do grau de risco. Ao final no anexo encontra-se uma relação da Classificação de Agentes Químicos da

National Fire Protection Association - NFPA 704-m / USA segundo seus graus de risco.

2.4.10 Segurança no preparo de soluções

Alguns cuidados devem ser adotados para uma preparação segura de soluções:

Fazer uma leitura prévia das características da substância que está manuseando; utilizar sempre, EPI específico; a vidraria utilizada no preparo de soluções deve ser de boa qualidade, de preferência de vidro boro-silicato; usar sempre, bastão com proteção de borracha, teflon ou plástico, para evitar trincar o vidro.

Não usar vidraria que esteja trincada, lascada ou corroída; lembrar que o ácido perclórico é particularmente perigoso porque explode em contato com materiais orgânicos. Evite o contato com mesas ou bancadas de madeira. Mantenha os frascos de ácido perclórico em bandejas de vidro ou cerâmica que tenham um volume suficiente para conter o volume do frasco em caso de derrame. Utilizar sempre, bancada de aço inoxidável; nunca aspirar substâncias químicas pela boca, utilizar pêras de borracha ou pipetadores automáticos; não utilizar vidraria para uso pessoal.

2.4.11 Noções de toxicologia - Riscologia química

Deve estar a disposição e de forma de fácil o acesso a informações específicas a respeito de procedimentos de emergência em caso de intoxicações. A existência de fichas de emergência específicas a cada produto devem ser mantidas ao alcance do manuseador.

É importante o conhecimento das características básicas sobre as principais substâncias tóxicas e dos principais meios de penetração das substâncias químicas no organismo, a saber:

2.4.11.1 Inalação

Maior grau de risco devido à rapidez com que as substâncias químicas são absorvidas pelos pulmões.

A inalação é a principal via de intoxicação no ambiente de trabalho, daí a importância que deve ser dada aos sistemas de ventilação. A superfície dos alvéolos pulmonares representam, no homem adulto, uma área de 80 a 90 m². Esta grande superfície facilita a absorção de gases e vapores, os quais podem passar ao sangue, para serem distribuídos a outras regiões do organismo. Sendo o consumo de ar de um homem adulto normal de 10 a 20 Kg/dia, dependendo do esforço físico realizado, 90% das intoxicações generalizadas tenham esta origem.

2.4.11.2 Absorção

Contato das substâncias químicas com a pele.

A absorção é extremamente crítica quando se lida com produtos lipossolúveis, que são absorvidos através da pele. Quando uma substância química entra em contato com a pele, pode acontecer as seguintes situações:

A pele e a gordura protetora podem atuar como uma barreira protetora efetiva. O agente pode agir na superfície da pele, provocando uma irritação primária. A substância pode combinar com as proteínas da pele e provocar uma sensibilização. A substância pode penetrar através da pele produzindo uma ação generalizada. Por exemplo, no caso de contato com o gás de amônia, pela propriedade higroscópica do mesmo, ao contato com qualquer parte do corpo humano, o gás tende a absorver a água existente causando, numa primeira fase, queimaduras. Com água absorvida pela amônia (NH_4OH) que, pelo fato de possuir características alcalinas, irá reagir com gorduras existentes no corpo humano, resultando, então, um sabão de amônia.

2.4.11.3 Ingestão

Via de regra, acontece por descumprimento de normas de higiene e segurança. Representa uma via secundária de ingresso de substâncias químicas no organismo, isto pode acontecer de forma acidental. (Anexo - Toxicologia)

2.4.12 Peróxidos

Os peróxidos fazem parte de uma classe de compostos químicos extremamente instável. São substâncias explosivas, daí o cuidado no seu manuseio, procurando-se evitar choques, atritos e outra fonte de ignição.

Alguns peróxidos são mais sensíveis ao choque do que alguns explosivos primários como o TNT (trinitrotolueno). Os peróxidos têm uma meia-vida específica ou um grau de decomposição que varia com as condições de estocagem. Em geral, os peróxidos são irritantes ao aparelho respiratório, pele e olhos. Todos os peróxidos devem ser armazenados em uma área fresca e ventilada, isolada de materiais orgânicos. Os frascos devem ser devidamente identificados.

2.4.12.1 Compostos Formadores de Peróxidos

Substâncias tais como: aldeídos, éteres, acetato de vinila, tetrahidrofurano, etc., formam peróxidos explosivos quando expostos ao ar e à luz. Existem vários testes colorimétricos para a identificação de peróxidos em éter. Se o líquido estiver contaminado, ele pode ser recuperado através de uma coluna cromatográfica de alumina, até que o teste apresente resultado negativo. Jamais destilar éter sem antes fazer o teste de peróxido. Os frascos contendo éter etílico devem ser datados no momento de sua abertura e mensalmente testados. Se apresentar resultado positivo deve ser recuperado ou descartado.

O éter etílico, éter isopropílico, éter tert-butilico, cloreto de vinilideno, divinil acetileno; devem ser descartados entre 3 a 6 meses após o início do seu uso. O tetrahidrofurano, dioxano, ciclohexano devem ser descartados entre 6 e 12 meses após o início do seu uso.

2.4.12.2 Cuidados no manuseio de peróxidos

O uso de peróxidos deve ser limitado à quantidade mínima necessária. Qualquer respingo de peróxido deve ser imediatamente limpo. Espátulas de metal não devem ser usadas para manusear peróxidos; e sim, de madeira ou cerâmica. Evitar fontes de calor. Soluções de peróxidos devem ser armazenadas em frascos de polietileno com tampas esmerilhadas, jamais frascos de vidro. Evitar qualquer tipo de impacto tais como, moagem, fricção, etc.

Para minimizar a decomposição, os peróxidos devem ser estocados em temperaturas baixas, de acordo com a sua solubilidade e ponto de congelamento.

2.4.12.3 Descarte de Peróxidos

2.4.12.3.1 Pequenas Quantidades

Os peróxidos devem sempre ser descartados na forma diluída e nunca pura. Pequenas quantidades (25 gramas ou menos), geralmente são descartadas após diluição com água para uma concentração de 2% ou menos, e então transferidos para um frasco de polietileno contendo uma solução aquosa de um

agente redutor, tal como sulfato ferroso ou bissulfito de sódio. Dessa forma, o material pode ser manuseado como rejeito químico, mas nunca misturado com outros rejeitos.

2.4.12.3.2 Grandes Quantidades

Quantidades maiores (acima de 25 gramas) requerem manuseio especial, sendo cada caso considerado separadamente. Nunca se deve lançar peróxido diretamente na pia.

2.4.13 Produtos Corrosivos

Entre os produtos químicos corrosivos estão incluídos principalmente os ácidos, anidridos e álcalis. Eles geralmente destroem seus recipientes e contaminam a atmosfera da área de armazenagem. Alguns são voláteis, outros reagem com sulfetos, sulfitos e cianetos, liberando outras substâncias tóxicas. Os recipientes de produtos corrosivos devem ser cuidadosamente manipulados, conservados fechados e devidamente etiquetados. Tanto os ácidos quanto os álcalis causam sérias queimaduras e danos aos olhos, portanto deve ser usada proteção na forma de luvas, aventais e óculos, quando manusear tais produtos, seja dentro do laboratório ou na área de armazenagem, isto é, em almoxarifados.

2.4.13.1 *Cuidados no Manuseio de Produtos Corrosivos*

O piso dos locais de manipulação de produtos corrosivos deve ser conservado o mais seco possível. Quando diluir ácidos com água, este deverá ser adicionado à água, lentamente, agitando continuamente a mistura; a água nunca deverá ser adicionada ao ácido.

O derrame ou escape de líquidos corrosivos não deve ser absorvido por meio de serragem, estopas, pedaços de pano ou outro material orgânico. Deve-se neutralizar com cal ou absorvê-lo com granulado absorvente.

Em caso de contato físico, deve-se lavar abundantemente com água corrente e procurar imediatamente socorro médico.

2.4.14 Substâncias químicas de uso em biotecnologia

Inúmeros produtos utilizados em biotecnologia são tóxicos ou requerem cuidados especiais de manuseio. Muitos solventes, tais como o clorofórmio, o isobutanol, *n*-butanol, formaldeído, éter, podem produzir vapores que podem ser inalados. Outros reagentes são potencialmente cancerígenos ou mutagênicos, como por exemplo o brometo de etídeo ou a formamida e devem ser manipulados com cuidados e com proteção adequada. Uma das regras básicas devido a esta presença de inúmeros tóxicos é nunca efetuar a pipetagem com a boca.

2.4.14.1 *Acrilamida*

Na temperatura do seu ponto de fusão ou sob ação dos raios UV, polimeriza-se espontaneamente. É um produto tóxico por inalação contato com a pele ou por inalação Deve ser manipulado em um lugar livre correntes de ar e o recipiente deve ser mantido fechado sempre que possível. Usar EPI (óculos, máscara, avental e luvas). Deve ser estocado em pequenas quantidades, ao abrigo da luz e afastado de substâncias básicas ou ácidas(COSTA,1996) e também catalizadores de polimerização e aceleradores,cobre, latão,bronze e alumínio. (CARVALHO, 1999) É considerada uma substância potencialmente perigosa se não manipulada de forma adequada.Os efeitos crônicos da exposição prolongada podem provocar depressão do sistema nervoso central. Esta substância é suspeita de ser carcinogênica para o homem.

2.4.14.2 *Aldeído Fórmico*

Substância extremamente reativa, polimeriza-se facilmente. Evita-se a polimerização com a adição do metanol. As soluções de aldeído são corrosivas para a maioria dos metais, exceto aço inoxidável e alumínio. Forte irritante de pele, olhos e mucosas respiratórias. Cáustico por ingestão. Sua utilização por longos períodos leva a reações alérgicas. Deve ser estocado em locais ventilados de 16 a 35 graus Celsius. Usar EPI e capelas.

2.4.14.3 Brometo de etídeo (BET)

É um poderoso mutagênico, irritante de olhos, pele e mucosas, nocivo por inalação. As operações de pesagem devem ser feitas em um ambiente sem turbulências com a devida proteção respiratória. Procedimentos especiais de descontaminação e descarte são necessários. (CISTERNAS, 1999; COSTA, 1996)

Descontaminação do Brometo de etídeo

Descontaminação de soluções concentradas:(Lunn and Sansone)

- Adicione água para reduzir a concentração até < 0.5 mg/ml
- A solução restante adicione 0,2 de volume de ácido hipofosforoso fresco a 5% e 0,12 de volume de nitrito de sódio a 0.5 M. Mexa cuidadosamente e cheque se o pH da solução é inferior a < 3 . O ácido hipofosforoso é normalmente oferecido em soluções de 50% de concentração, que é corrosivo e deve ser manipulado com cuidado. Para estar fresco deve ser diluído imediatamente antes do uso. A solução de nitrito de sódio (0.5M) pode ser preparada pela dissolução de 34.5g de nitrito de sódio em água até o volume de 500ml.
- Após a incubação por 24 horas a temperatura ambiente, adicione uma grande quantidade de bicarbonato de sódio a 1M. A solução pode então ser descartada (SAMBROOK, 1989).

Descontaminação de soluções concentradas (Quillardete Hofnung)

- Adicione água suficiente para reduzir a concentração de brometo de etídeo a < 0,5 mg/ml.
- Ao resultado desta solução, adicione 1 volume de KmnO_4 a 0.5 M. Misture cuidadosamente, e adicione 1 volume de HCl a 2.5 N. Deixe a solução repousar a temperatura ambiente por várias horas.
- Adicione 1 volume de 2.5 N de NaOH. Mexa cuidadosamente e descarte a solução.

Existem também procedimentos específicos para descontaminação de soluções diluídas de brometo de etídeo (por exemplo a encontrada no *buffer* da eletroforese que contém brometo na concentração de $0.5 \mu\text{g/ml}$).

2.4.14.4 Cloreto de lítio

Produto extremamente higroscópico, irritante para pele, e olhos. Usar luvas e óculos de proteção.

2.4.14.5 Clorofórmio

Irritante para a pele, para os olhos e anestésico na concentração de inalação de 1 a 2 %. Sua exposição prolongada pode provocar riscos a saúde. Estocagem em lugares ventilados, longe de bases e principalmente acetona. Na

sua utilização usar luva de poli álcool vinílico e óculos de proteção. (COSTA, 1996)

2.4.14.6 Fenol

Tóxico quando em contato com a pele e por ingestão. Provoca queimadura química. Em caso de contato com a pele, lavar abundantemente com água corrente. Estocar ao abrigo da luz solar, longe de produtos oxidantes. Na sua manipulação utilizar luvas de polietileno ou neoprene e óculos de proteção.

2.4.14.7 Formamida

Forte irritante para olhos e para a pele. Na sua manipulação em capelas utilizar luvas e óculos de proteção.

Todos os procedimentos que envolvam a manipulação destas substâncias tóxicas deveriam ser realizadas em cabines de segurança química. (CARVALHO, 1999).

2.4.15 Desinfecção e disposição

Esterilização, desinfecção, e anti-sepsia são todas as formas de desinfecção. Esterilização implica na morte de todos os organismos. Desinfecção recorre ao uso de agentes de antimicrobial em objetos inanimados; seu propósito

é destruir todo o não esporo que forma organismos. Anti-sepsia é a aplicação de uma substância química de antimicrobial líquida a um tecido vivo.

2.4.15.1 *Desinfetantes químicos*

É importante escolher um desinfetante que efetivamente foi provado ser efetivo contra o organismo que é usado. Desinfetantes químicos podem ser divididos nas seguintes categorias seguintes:

Esterilizador ou esterelizante: destruirá todos os microorganismos que incluem bactérias e esporos de fungos em superfícies inanimadas.

Desinfetante: destruirá ou inativará irreversivelmente vírus específicos, bactérias, e fungos patogênicos, mas não esporos bacterianos.

Desinfetante de hospital agente mostrado para ser efetivo contra *S. aureus*, *S. cholerae* e *aeruginosa*. Pode ser efetivo contra *M. tuberculosis*, fungos patogênicos ou vírus especificamente conhecidos. (UNIVERSITY MARYLAND..., 2000)

2.4.15.2 *Desinfetantes comumente usados no laboratório*

Dentre os compostos químicos que são utilizados podemos citar: os álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro, fenóis sintéticos, compostos de amônio quaternário, iodóforos e outros.

2.4.15.2.1 Iodofor

A diluição recomendada é de 75 ppm, ou aproximadamente 4.5 água de ml/por litro. É efetivo contra bactérias vegetativas, fungos, e vírus. Efetividade reduzida por matéria orgânica (mas não tanto quanto o hipoclorito). Se mantém estável se armazenamento resfriado e bem fechado. Se sua cor da solução for marrom ou amarela, ainda está ativo. Relativamente inofensivo a humanos. Atua por oxidação e substituição por iodo livre. Atividade eficaz contra bactérias gram-negativas. Necessita de dois minutos de contato para liberação do iodo livre. É alterado pela presença de matéria orgânica. (SOUZA, 1998) Os iodóforos constituem uma combinação entre o iodo e um agente solubilizante ou carreador. O complexo resultante fornece um reservatório de iodo que é liberado em pequenas quantidades na solução aquosa. O composto mais conhecido é o polivinilpirroliidona-iodo (PVP-I).

Os iodóforos têm atividade contra bactérias na forma vegetativa, incluindo micobactérias, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos e para esporos bacterianos. A atividade esporádica pode requerer tempo de contato prolongado.

O mecanismo de ação do iodo se deve a atividade de ruptura de estruturas de proteínas e de ácidos nucleicos e a interferência na síntese protéica. Os iodóforos são rapidamente inativados por proteínas e por substâncias plásticas e detergentes não iônicos.

Utilizam-se como anti-sépticos, como alternativa para situações que se necessita ação rápida e de amplo espectro. Na desinfecção de ampolas, vidros,

termômetros, estetoscópios, superfícies externas e metálicas de equipamentos. Utiliza-se também em superfície de equipamentos relacionados a alimentos. Não se deve utilizar em metais sensíveis oxidação (cromo, ferro, alumínio, e outros) e em materiais que absorvem o iodo e mancham, como os plásticos.

As formulações anti-sépticas contém 1% de iodo disponível em base ácida ou aquosa. Produtos para escovação cirúrgica contém 0,75% de iodo. Soluções diluídas possuem atividade mais rápida de que as concentradas. A razão para tal ainda não está conhecida, supõe que a ligação do polímero carreador ao iodo esteja mais fraca disponibilizando o iodo livre. Portanto, as diluições devem ser adequadamente feitas para uso adequado.

Devido à baixa toxicidade, e uso abundante, deve se precaver devido a atividade irritante para os olhos e em menor extensão a pele. Cuidados sempre devem ser tomados, pois algumas pessoas desenvolvem hipersensibilidade ao iodo.

2.4.15.2.2 Hipocloritos

A diluição de trabalho é 1:10 a 1:100 em água é efetivo contra bactérias vegetativas, fungos, a maioria dos vírus a diluição de 1:100. Efetivo também contra esporos bacterianos na 1:10 diluição, é um produto muito corrosivo. São considerados oxidantes fortes. (CARVALHO, 1999) Rapidamente inativado por matéria orgânica, as soluções se decompõem rapidamente; para

evitar este inconveniente, as soluções deveriam ser preparadas diariamente. As soluções de hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e polivinilpirrolidona (PVP) são contra-indicados para artigos metálicos devido a sua ação corrosiva sobre os mesmos. (BRASIL, 2000). O hipoclorito na concentração de 1:100 age sobre o vírus da hepatite B. (GUANDALINI, 1999) Os compostos liberadores de cloro ativo são utilizados na desinfecção em diversas áreas do laboratório. Os mais comuns são os inorgânicos: hipoclorito de sódio, cálcio, lítio e os orgânicos: ácido dicloroisocianúrico e seus sais sódicos e potássico e o ácido tricloroisocianúrico.

Estes compostos são ativos contra bactérias na forma vegetativa, gram-positivas e gram-negativas, ativos contra micobactérias, esporos bacterianos e de fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos. Em altas concentrações apresentam efeito letal para os *prions*.

A forma ativa é o ácido hipocloroso (HOCl), que se forma em soluções com pH de 5,0 a 8,0. O íon hipoclorito (OCl⁻), que predomina nas soluções alcalinas fortes, constitui a forma menos ativa. A eficácia do cloro decresce com o aumento de pH e vice-versa. O mecanismo de ação do cloro ativo ainda não é bem conhecido, acredita-se que o cloro se combina com as proteínas de membrana celular formando compostos tóxicos que inibem a atividade de enzimas essenciais.

Os compostos liberadores de cloro reagem rapidamente com a matéria orgânica, incluindo sangue, fezes e tecidos. Sua atividade reduz significativamente, e de forma proporcional à presença de matéria orgânica.

Desta forma a quantidade de cloro disponível deve ser elevada nos processos de desinfecção para poder suprir a demanda necessária para destruir os microorganismos.

Os hipocloritos são instáveis e incompatíveis com detergentes catiônicos, a sua estabilidade depende de fatores como concentração, temperatura, pH, luz e presença de metais. Soluções concentradas (100.000 ppm de cloro ativo) são mais instáveis do que as diluídas. Altas temperaturas reduzem a estabilidade. O pH baixo favorece a ação microbicida destes compostos, mas o tornam mais instáveis. O armazenamento deve ser feito de forma tamponada em pH alto, de forma que ao diluir, o pH diminua e se torne mais ativo. A decomposição fotoquímica ocorre na presença de íons, metais pesados, cobalto, manganês, níquel e ferro, produzindo cloreto e oxigênio.

Os hipocloritos são corrosivos para metais. Os objetos de prata e de alumínio são os mais afetados, mas o hipoclorito ataca também o aço inoxidável em altas concentrações.

A aplicação destes compostos liberadores de cloro ativo têm ampla aplicação como na desinfecção em geral de objetos e superfícies inanimadas, inclusive as contaminadas com sangue, e outros materiais orgânicos e para recipientes de descarte de materiais. Utiliza-se na desinfecção de materiais

super-críticos não metálicos e artigos de latarias e também é recomendado na desinfecção de água para consumo humano e para processos industriais, água de piscinas e alimentos.

A solução de hipoclorito disponível se apresenta na concentração de 5%, como reagente químico e de 2% como água sanitária. Os hipocloritos de cálcio e lítio são compostos sólidos e os isocianóricos são comercializados na forma de pó, contendo detergentes.

O uso deve ser feito nas concentrações de 1.000 ppm por 10 minutos de contato para desinfecção e descontaminação. Para desinfecção em latarias 200 ppm, por 60 minutos; para desinfecção de material de inaloterapia e oxigenioterapia não metálicos, 200 ppm, por 60 minutos e para desinfecção de artigos semicríticos, 10.000 ppm, por 30 minutos e em recipientes de descarte de materiais, 10.000 ppm.

Os compostos liberadores de cloro são tóxicos, causam irritação na pele e nos olhos. Nas mucosas causam irritação e corrosão. A inalação do ácido hipocloroso provoca tosse e choque, podendo causar irritação grave no trato respiratório.

2.4.15.2.3 Álcoois (etílico, isopropílico)

A diluição efetiva é 70-85%. Efetivo contra um largo espectro de bactérias e muitos vírus. Sua ação rápida, não deixa nenhum resíduo, não é

corrosivo. Nenhum possui efeito efetivo contra esporos bacterianos Não são efetivos em presença de matéria orgânica,são pobres agentes de limpeza de artigos e superfícies. Agem por desnaturação de proteínas e como solvente de gorduras. (GUANDALINI, 1999) razão pela qual os álcoois absolutos são menos efetivos. Pode ser usado associado a glicerina a 2% para evitar o ressecamento da pele e a evaporação rápida do álcool, ou associado ao iodo a 0,5 a 1,0%. Neste caso pode provocar lesões irritativas com a formação de eritemas, vesículas e pústulas. (CARVALHO,1999) O álcool etílico a 70 ou 77% pode ser utilizado na desinfecção de superfícies fixas e artigos, deve ser friccionado por 10 minutos em três aplicações após a limpeza prévia da superfície com água e sabão. (GUANDALINI, 1999). Atuam provavelmente inibindo a divisão celular por interferir na produção de metabólicos essenciais.

O etanol é o mais empregado no Brasil, como desinfetante e na descontaminação de superfície de bancada de fluxo laminares, equipamentos de grande e médio porte e para anti-sepsia das mãos e de muitos equipamentos de uso médico. O isopropanol também pode ser utilizado com a mesma eficácia. A concentração recomendada é em torno de 77% volume/volume o que corresponde a 70% em peso. A adição de iodo na proporção de 0,5% a 1% p/v a soluções de 70% em peso incrementa a atividade e acrescenta ação residual a estas soluções.

O álcool por ser volátil e inflamável deve ser cuidadosamente utilizado, pois é irritante aos olhos e é considerado tóxico. A aplicação freqüente produz irritação e ressecamento da pele.

2.4.15.2.4 Glutaraldeído

É considerado um desinfectante de alto nível e como esterilizante químico dependendo do tempo de exposição a solução, ação desinfectante em 30 minutos e esterilizante em 10 horas. (GUANDALINI, 1999) Tem como desvantagens o fato de ser irritante aos tecidos, causar reação alérgica, descolorir alguns metais, ação corrosiva, é inativado pelo amoníaco e pelas aminas primárias. O glutaraldeído possui amplo espectro de atividade com ação rápida, age sobre as bactérias na forma vegetativa, incluindo micobactérias, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos e esporos bacterianos. Tem atividade esporicida mais eficiente que outros aldeídos.

A sua ação nas micobactérias é mais lenta. Tem maior atividade em pH alcalino (7,5 a 8,5). Pode-se ativar o glutaraldeído com bicarbonato de sódio 0,3%, sendo recomendado o uso em uma concentração de 2%. A ação do glutaraldeído se dá pela alquilação de proteínas contendo grupos sulfidrilas, hidroxila, e anímicos presentes nos microorganismos, alterando os ácidos nucléicos e a síntese de proteínas.

A sua aplicação é mais efetiva como esterilizante de materiais cirúrgicos, como endoscópicos, equipamentos de aspiração e artigos metálicos, que não podem ser submetidos a métodos físicos de esterilização. Nos laboratórios de pesquisa e ensino, a sua utilização é limitada devido ao alto custo e toxicidade.

A concentração recomendada 6 a 2% em soluções ácidas, que são ativadas por agentes alcalinizantes. Após a ativação, recomenda-se utilizar em 14 dias.

O glutaraldeído é tóxico, irritantes para a pele, mucosas e olhos, mas em menor grau que o formaldeído. Pode provocar dermatite e sensibilização da pele. O limite máximo recomendado é de 0.2 ppm.

2.4.15.2.5 Clorexidina

Tem grande eficácia sobre bactérias gram-positivas e boa atividade sobre bactérias gram-negativas e vírus e nenhuma sobre fungos. (SOUZA,1996) Tem ação imediata e efeito residual. Apresenta baixo potencial de toxicidade. Em solução na forma alcoólica tem ação imediata, com redução de 85 a 95% da microbiota da pele em uma única aplicação (GUANDALINI,1999) por este motivo é utilizada na concentração de 4% assepsia das mãos .

2.4.15.2.6 Formaldeído

O formaldeído apresenta atividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas na forma vegetativa, incluindo as micobactérias, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos e esporos bacterianos. A atividade esporicida é lenta, exigindo um tempo de contato em torno de 18 horas para a maioria das formulações. O formaldeído destrói os microorganismos através de alquilação dos

grupamentos sulfidrilas de proteínas e dos anéis de nitrogênio das bases da purina.

O formaldeído é pouco ativo a temperaturas menores que 200°C, apresentando maior atividade em temperaturas acima de 40°C. Tem atividade mesmo na presença de material orgânico, não sendo inativado por materiais naturais e sintéticos e detergentes. Se utilizado na forma gasosa, requer uma umidade relativa acima de 50%.

Utiliza-se o formaldeído para descontaminação através de fumigação de ambientes fechados (cabins de segurança, salas diversas, salas de envase, biotérios e hospitais). Devido a sua toxicidade e por ser irritantes, não se recomenda para desinfecção rotineira de superfície equipamentos e vidraria, podendo ser utilizado em situações especiais, de acordo com o microrganismo envolvido. A concentração utilizada com formalina é de 18 ml e 35 ml de igual/m por 24 horas. Para o paraformaldeído 4g/m a 10,5/m por 24 horas. Para desinfecção, utiliza-se a solução a 4% (v/v), por 30 minutos. Para esterilizações, utiliza-se a solução alcoólica a 8% e soluções aquosas a 10% ou produtos comerciais, por aproximadamente 18 horas.

Por ser altamente tóxico e seus vapores irritantes ao sistema respiratório e para os olhos, não se recomenda a manipulação do formaldeído sem as devidas precauções, principalmente devido às reações de sensibilização e potencial carcinogênico, a quantidade máxima recomendada na atmosfera é de 1 ppm.

2.4.15.2.7 Fenóis

Os fenóis sintéticos são derivados de fenol onde os átomos de hidrogênio ligados ao anel benzeno são substituídos por grupos funcionais (alquil, fenil, benzil ou halogênico). Estas substituições aumentam a ação antimicrobiana e diminuem a característica irritante dos fenóis. Os mais comuns são: ortofenilfenol, ortofenil benzil para clorofeno e para terciário butilfenol.

A ação é semelhante aos compostos fenólicos, mas não possuem atividade biocida para esporos bacterianos e vírus hidrofílicos. O mecanismo de ação é por inativação de sistemas enzimáticos essenciais, provocando o extravasamento de metabólitos através da parede celular. A sua ação é maior em pH neutro ou ligeiramente ácido. A influência do pH é crítica, sendo que a alcalinidade reduz a sua eficácia. A ação dos fenóis é pouco afetada pela presença de matéria orgânica. Óleos e gorduras reduzem a sua ação. São incompatíveis com detergentes catiônicos e inativados por detergentes não iônicos.

Os fenóis sintéticos são utilizados para desinfecção de objetos e superfícies inanimadas (bancadas, pisos etc) em laboratórios, hospitais e biotérios, em situações onde haja necessidade de desinfecção na presença de matéria orgânica. Não se recomendam para artigos que entram em contato com trato respiratório, alimentos, objetos de látex, acrílico e borracha. Não são indicados em berçários, devido a ocorrência de hiperbilirrubinemias em criança.

Por serem insolúveis em água, as formulações de fenóis sintéticos contém tensoativos aniônicos ou sabões e emulsificantes. A concentração relativa entre o tensoativo e os sabões é crítica. O produto deve ser diluído na hora do uso.

Por serem tóxicos devem ser evitados os contatos com a pele e mucosas. Sempre usar proteção adequada para a sua aplicação.

2.4.15.2.8 Compostos de amônio

Os compostos de amônio quaternário são agentes onde os átomos de nitrogênio do grupo amônio possui valência 5, sendo quatro dos substituintes radicais alquila ou arila e o quinto um haleto (cloreto), sulfato ou similar. Cada composto possui características antimicrobianas próprias que dependem da distribuição e do tamanho das cadeias dos radicais. Alguns compostos freqüentemente utilizados são cloretos de alquildimetilbenzilamônio, e cloretos de dialquildimetilamônio.

A atividade antimicrobiana é muito efetiva nas bactérias gram-positivas e em menor grau nas gram-negativas, sendo as *pseudomonas* especialmente mais resistentes. Esses compostos são ativos para alguns fungos e para vírus não lipofílicos não apresentam ação letal para esporos bacterianos, para vírus hidrofílicos e para micobactérias.

A ação é atribuída a inativação de enzimas responsáveis pelos processos de produção de energia, desnaturação de proteínas celulares essenciais e ruptura da membrana celular.

Esses agentes bactericidas são fortemente inativados por proteínas através de processo de absorção por uma variedade de materiais naturais e sintéticos e por detergentes não iônicos e sabões. São influenciados negativamente pela presença dos íons cálcio e magnésio presente na água dura. Podem danificar borrachas sintéticas, cimento e alumínio. O pH ideal 6 o alcalino (9,0-10,0); valores abaixo de 7,0 são desfavoráveis. Possuem efeito residual.

Os compostos de amônio quaternário são recomendáveis para desinfecção ordinária de superfície não críticas como pisos, e paredes. Apropriados para desinfecção de superfície e equipamentos em todas as áreas relacionadas com alimentos. As formulações são apresentadas concentradas, contendo mais que um princípio ativo, que deve ser diluído de forma adequada. Os compostos quaternários são de baixa toxicidade, por fim podem causar irritação e sensibilização da pele.

2.4.16 Produtos Químicos Incompatíveis

A relação de produtos químicos que, devido às suas propriedades químicas, podem reagir violentamente entre si é extensa. As principais estão listada abaixo:

Substâncias	Incompatível com
Acetileno	Cloro, bromo, flúor, cobre, prata, mercúrio
Ácido Acético	Óxido de cromo IV, ácido nítrico, ácido perclórico, peróxidos, permanganato, ácido acético, anilina, líquidos e gases combustíveis.
Ácido Nítrico	Ácido acético, anilina, líquido e gases combustíveis
Ácido Oxálico	Prata, sais de mercúrio
Ácido Perclórico	Anidrido acético, álcoois, papel, madeira, clorato de potássio, perclorato de potássio
Amoníaco	Mercúrio, hipoclorito de cálcio, iodo, bromo
Amônio Nitrato	Ácidos, metais em pó, substâncias orgânicas
Anilina	Ácido nítrico, peróxido de hidrogênio
Carvão Ativo	Hipoclorito de cálcio, oxidantes
Cianetos	Ácidos
Cloratos	Sais de amônio, ácidos, metais em pó, enxofre
Cobre	Acetileno, peróxido de hidrogênio
Cromo IV Óxido	Ácido acético, naftaleno, glicerina, líquidos combustíveis.
Hidrocarbonetos	Flúor, cloro, bromo, peróxido de sódio
Hidrogênio Peróxido	Cobre, cromo, ferro, álcoois, acetonas, substâncias combustíveis
Líquidos inflamáveis	Nitrato de amônio, peróxido de hidrogênio, ácido nítrico, peróxido de sódio, halogênios
Mercúrio	Acetileno, amoníaco
Metais Alcalinos	Água, tetracloreto de carbono, halogênios
Permanganato de Potássio	Glicerina, etilenoglicol, ácido sulfúrico

Tabela 3 Incompatibilidade entre produtos químicos

2.4.17 Produtos perigosos

2.4.17.1 Classificação

Os produtos perigosos são classificados em nove classes de risco. Dentro de cada uma podem existir divisões, onde os produtos também são agrupados pelo tipo de risco, como podemos acompanhar a seguir:

Classe 1 - Explosivos

Classe 2 - Apresenta três divisões:

- 2.1. Gases inflamáveis;
- 2.2. Gases não inflamáveis comprimidos;
- 2.3. Gases tóxicos.

Classe 3 - Líquidos inflamáveis

Classe 4 - Apresenta três divisões:

- 4.1. Sólidos inflamáveis;
- 4.2. Espontaneamente combustíveis;
- 4.3. Perigosos quando molhados.

Classe 5 - Apresenta duas divisões:

- 5.1. Agentes oxidantes;
- 5.2. Peróxidos orgânicos.

Classe 6 - Apresenta duas divisões:

- 6.1. Tóxicos;
- 6.2. Infecciosos.

Classe 7 - Radiativos

Classe 8 - Corrosivos

Classe 9 - Miscelânea

Tabela 4 Classificação dos produtos perigosos

A NR29e do Ministério do Trabalho trás informações mais completas sobre o assunto. Existe uma simbologia específica empregada para identificar tais produtos. (Ver anexo). A cada classe e divisão apresentadas anteriormente no

item Classes de Risco, corresponde um símbolo pictográfico indicativo do tipo de risco oferecido. A construção dos mesmos é descrita pelas normas de referência e pela NBR7500- Simbologia.

2.4.18 Rotulagem

A rotulagem e a marcação de recipientes que contenham substâncias químicas, por intermédio de símbolos e textos de avisos, são precauções essenciais de segurança.

Os rótulos ou etiquetas aplicados sobre uma embalagem devem conter em seu texto as informações que sejam necessárias para que o produto ali contido seja tratado com toda a segurança possível. Exemplos de dados que devem conter um rótulo:

- Nome do produto
- Concentração
- Cuidados
- Antídotos
- Incompatibilidades
- Outros

É prática perigosa utilizar frasco de um produto rotulado para guardar qualquer outro diferente. Isto pode causar um grave acidente. Colocar nova etiqueta sobre a antiga, também o é.

Quando encontrar uma embalagem sem rótulo, não tente adivinhar o que há em seu interior. Se não houver possibilidade de identificação, descarte o produto.

2.4.19 Gases comprimidos

O manuseio de gases sob pressão requer muito cuidado e atenção, pois qualquer defeito no equipamento pode provocar uma difusão de gases no ambiente. O gás difundido pode ter efeitos: anestésico, asfixiante, tóxico ou formar misturas extremamente explosivas com o ar, a grande maioria dos gases são inodoros e incolores, dificultando assim sua rápida identificação.

2.4.19.1 Cuidados no Manuseio de Gases

- Procurar na literatura, informações sobre o gás em uso, tais como: risco de explosão, reatividade, toxicidade e outros.
- Jamais utilizar graxa, óleo ou glicerina em cilindros que contenham gases oxidantes, devido ao risco de explosão (oxigênio, por exemplo).
- Utilizar somente cilindros equipados com válvulas de redução.

- Ao transportar cilindros ter sempre o cuidado de fechar a válvula de saída e nunca esquecer de usar a capa de proteção e um carrinho apropriado para o transporte.

- Sob hipótese alguma esquecer os cilindros soltos no laboratório. Quedas ou qualquer tipo de choque pode provocar danos na válvula e liberar o gás com muita violência, arremessando o cilindro como um projétil com potência suficiente para atravessar uma parede.

- Nunca colocar cilindros perto de fontes de calor.

- Quando usar mangueiras para ligações, ter o cuidado de verificar as compatibilidades químicas com o gás, e se as ligações estão bem firmes.

- Antes do uso, verificar possíveis vazamentos, utilizando uma solução de sabão nos locais a serem testados.

- Cilindros vazios devem ser estocados separadamente e devidamente etiquetados com a inscrição: vazio.

2.4.19.2 *Armazenamento de cilindros de gás*

Tal como os reagentes, os cilindros de gás não devem ser armazenados no laboratório. Quando isto for inevitável, os cuidados acima devem ser observados (COSTA, 1996).

O armazenamento correto, requer local externo, amplo, coberto, naturalmente ventilado e devidamente protegido. Devem ser observadas as incompatibilidades químicas entre os diversos tipos de gás.

O transporte deve ser feito em carrinhos específicos, com o cilindro acorrentado e com o capacete de proteção da válvula acoplado.

2.4.19.3 Cores nos cilindros de gases

- Nitrogênio: cinza
- Acetileno: bordô
- Acetileno aa: bordô com faixa amarela
- Ar sintético: amarelo
- Gás carbônico: alumínio
- Oxigênio: preto ou verde

2.4.20 Conceito e Classificação dos Gases e Vapores Tóxicos

Os gases e vapores tóxicos são classificados em:

2.4.20.1 *Irritantes*

O termo gases e vapores irritantes engloba um grande número de substâncias químicas cuja característica comum é a ação tóxica que resulta num processo inflamatório das superfícies tissulares com as quais elas entram em contato, geralmente afetam trato respiratório, pele e olhos.

2.4.20.1.1 Irritantes Primários

Quando exercem apenas ação local. Estas substâncias atuam sobre a membrana mucosa do aparelho respiratório e sobre os olhos, levando à inflamação, hiperemia (avermelhamento), desidratação, destruição da parede celular, necrose (destruição) e ao edema (inchaço).

Dentro do aparelho respiratório, o local da ação dos irritantes primários dependerá da solubilidade dos mesmos em água. Os mais solúveis são absorvidos pelas vias aéreas superiores, dissolvendo-se na água presente nas mucosas, causando irritação. Os menos solúveis serão pouco absorvidos pelas vias aéreas superiores, alcançando o tecido pulmonar, onde produzem seu efeito.

Na exposição imediata ou aguda, estes agentes provocam nas vias aéreas superiores: rinite, faringite, laringite, com quadro clínico de dor, coriza, espirros, tosse e irritação. Nas vias aéreas inferiores, eles provocam: bronquite, broncopneumonia e edema pulmonar, com quadro clínico de tosse e dispnéia.

Na exposição prolongada a baixas concentrações, os gases e vapores irritantes provocam: bronquite crônica, asma, conjuntivite, pterígio e queratite.

A intensidade da irritação dessas substâncias depende de:

1. Concentração da substância no ar e da duração da exposição.
2. Propriedades químicas: por exemplo, a solubilidade em água.
3. Exposições repetidas: mesmo em baixas concentrações, certos gases irritantes provocam alterações tissulares, bioquímicas e funcionais das vias respiratórias.
4. Fatores anatômicos, fisiológicos e genéticos que podem influenciar o sítio de ação.
5. Interação química: a inalação simultânea de outro agente tóxico em forma de aerossol pode modificar a toxicidade dos gases e vapores irritantes.

Os efeitos irritantes dessas substâncias são atribuídos essencialmente a uma excitação dos receptores neurais na conjuntiva e nas membranas mucosas do sistema respiratório, que desencadeiam processos dolorosos e uma série de reflexos (motor, secretor e vascular) que levam a diminuição na frequência respiratória e cardíaca, diminuição na pressão arterial e ao espasmo da glote, com sensação de sufocamento, tosse e constrição dos brônquios.

Nos pulmões, a lesão ao parênquima provoca pneumonia. O edema pulmonar resulta de uma mudança na permeabilidade dos capilares, liberação de histamina, com conseqüente bronco constrição e aumento na pressão dentro dos

capilares que levam a uma transudação (passagem) de líquidos serosos para dentro dos alvéolos, impedindo as trocas gasosas.

Exemplos de substâncias químicas com efeitos irritantes primários: ácidos, amônia, cloro, soda cáustica, dióxido de enxofre e óxidos de nitrogênio.

2.4.20.1.2 Irritantes Secundários

Quando ao lado da ação irritante local há uma ação geral, sistêmica. São substâncias químicas que, além de ocasionarem irritação primária em mucosas de vias respiratórias e conjuntivas, são absorvidas e distribuídas, indo atuar em outros sítios do organismo, como sistema nervoso e sistema respiratório.

Exemplo de substância química com efeito irritante secundário: gás sulfídrico (H_2S).

2.4.20.2 *Asfixiantes*

São substâncias químicas que levam o organismo à deficiência ou privação de oxigênio, sem que haja interferência direta na mecânica da respiração.

São subdivididas em:

2.4.20.2.1 Asfixiantes Simples

São gases fisiologicamente inertes, cujo perigo está ligado à sua alta concentração, pela redução da pressão parcial de oxigênio. São substâncias químicas que têm a propriedade comum de deslocar o oxigênio do ar e provocar asfixia pela diminuição da concentração do oxigênio no ar inspirado, sem apresentarem outra característica em nível de toxicidade. Algumas dessas substâncias são liquefeitas quando comprimidas.

Exemplos de substâncias químicas com efeitos asfixiantes simples: etano, metano, propano, butano, GLP, acetileno, nitrogênio, hidrogênio, etc.

2.4.20.2.2 Asfixiantes Químicos

São substâncias que produzem asfixia mesmo quando presentes em pequenas concentrações, porque interferem no transporte do oxigênio pelos tecidos. São substâncias que produzem anóxia tissular (baixa oxigenação dos tecidos), quer interferindo no aproveitamento de oxigênio pelas células.

Exemplo de substância química com efeito asfixiante químico: monóxido de carbono (CO).

2.4.20.3 Anestésicos

São substâncias capazes de provocar depressão do sistema nervoso central. Estas substâncias deprimem a atividade do sistema nervoso central, interferindo com o sistema neurotransmissor. Em consequência, ocorrem perda da consciência, parada respiratória e morte.

Os hidrocarbonetos derivados do petróleo, pela sua alta afinidade pelo sistema nervoso, rico em gordura, possuem esta propriedade.

Farmacologicamente, os hidrocarbonetos acima do etano podem ser agrupados como anestésicos gerais, na extensa classe dos depressores do sistema nervoso central. A saber:

1. Hidrocarbonetos acetilênicos (acetileno, aleno, crotonileno).
2. Hidrocarbonetos lefínicos (do etileno ao heptileno).
3. Etil éter e isopropil éter.
4. Hidrocarbonetos parafínicos (do propano ao decano).
5. Acetonas alifáticas (da acetona à octanona).
6. Álcoois alifáticos (etil, propil, butil e amil).

Esta classificação foi elaborada por Henderson e Haggard, denominada de Classificação Fisiológica de Contaminantes Aéreos e apresenta algumas restrições, porque em muitos gases e vapores, o tipo de ação fisiológica depende da concentração deles. Assim, um vapor a uma determinada

concentração pode exercer seu efeito principal como um anestésico, enquanto que, em baixas concentrações sem efeitos anestésicos, lesiona o sistema nervoso, o sistema hematopoiético e outros órgãos.

2.4.21 Armazenagem

Ao armazenar substâncias químicas, deve-se considerar as incompatibilidades entre os materiais armazenados, principalmente nos almoxarifados, o sistema de ventilação, a sinalização correta, a disponibilidade de EPI e EPC, a área administrativa separada da área técnica e da armazenagem.

2.4.21.1 Armazenamento e transporte de produtos químicos e biológicos

O armazenamento ou estocagem de produtos químicos e biológicos requer cuidados especiais em função do grau de periculosidade do produto. Por isso as substâncias com maiores riscos merecem maiores cuidados e maior grau de vigilância por pessoas devidamente treinadas para que possam perceber riscos característicos ou eventuais que certos produtos oferecem potencialmente. A adoção da sinalização e rotulagem adequada com os códigos de riscos e grau de periculosidade em todos os locais que os produtos se encontrem assim como a divulgação periódica ao grupo de trabalho é de grande valia para prevenir acidentes.

Os indivíduos incautos, irresponsáveis ou despreparados devem ser mantidos longe de produtos perigosos. Além dessa dedicação especial dos envolvidos, deve haver o investimento da instituição para oferecer depósitos especiais, boas condições de transportes aquisição de embalagens seguras, literatura específica e treinamento de pessoal.

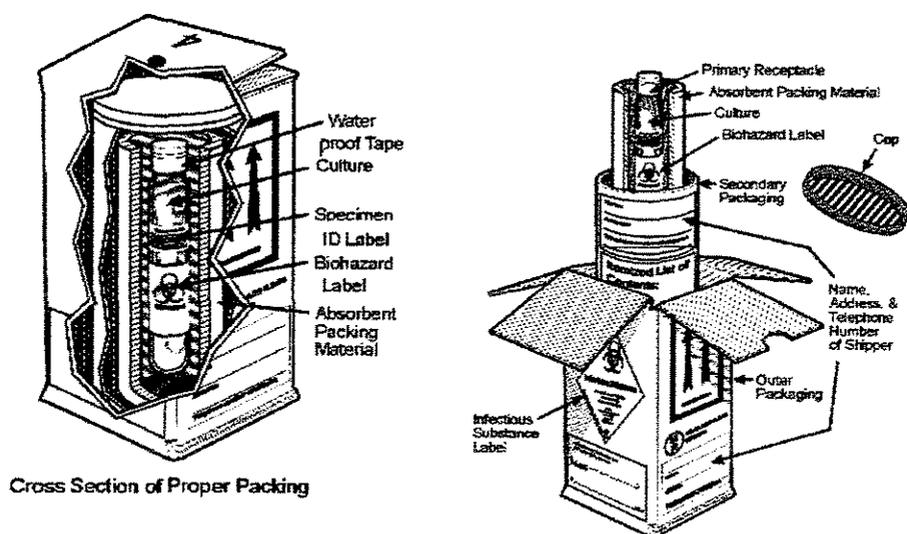


Figura 9 Acondicionamento de amostras

A observação de detalhes que possam parecer sem importância pode evitar graves acidentes com produtos perigosos, exemplos:

- A presença de escadas em tamanho compatível com as prateleiras

- Recipientes adequados para fracionamento (funis, bandejas antiderrames, tampões automáticos, suporte e anteparos para funis e garrafas, carrinhos com estabilidade e proteção lateral, EPI, local devidamente ventilado)

- Presença de pelo menos duas pessoas durante a operação

- Conhecimento detalhado do grau de periculosidade do produto

- Manter os materiais incompatíveis, muito reativos, voláteis, tóxicos etc, distantes entre si e transportá-los individualmente, com embalagens de proteção (madeira, borracha ou outro material antichoque), mesmo que a segurança possa parecer adequada.

- Sempre observar criticamente, as condições da embalagem ou recipientes originais, o aspecto do produto, a ocorrência de odores, cores ou qualquer outro fator estranho.

- Acompanhar os produtos de alta periculosidade de EPIs e EPCs e sinalização, mesmo em curtos trajetos e/ou pequenas quantidades.

- Jamais reconduzir as sobras de materiais perigosos ao almoxarifado ou depósito central. É necessário sempre lembrar que muitos acidentes ocorrem por displicência, distração, excesso de confiança, descrédito no grau de periculosidade da operação e por despreparo do operador. (FILHO,1999; KAUFMAN, 1990; BRASIL...1999)

2.4.22 Transporte de produtos químicos

O transporte deve ser realizado por condutor treinado e dotado de equipamentos de proteção individual e coletiva (EPI, EPC). A carga deve ser acompanhada por um responsável técnico devidamente documentado e com a autorização do responsável. Para os solventes enquadrados na classe B. É necessário o laudo de análise do órgão ambiental competente.

O veículo transportador necessita da identificação com os símbolos de periculosidade. Os produtos que oferecem riscos biológicos (classe A) exigem acondicionamento especial (3 camadas), refrigeração, documentação específica e sinalização própria de material infectante. A não observância dessas normas pode colocar em risco o registro do profissional e a cassação do alvará de funcionamento da unidade. Para os resíduos biológicos a serem descartados, exige-se a inativação na origem e acondicionamento segundo norma imposta pelo órgão coletor.

O manuseio e transporte corretos dentro da unidade requer retirada de quantidade mínima possível por pessoas devidamente protegidas (luvas, óculos, máscaras, botas e aventais). A rotulação de periculosidade deve acompanhar o produto ou o resíduo, independentes da quantidade e em embalagens ou recipientes adequadas, é bom lembrar que o indivíduo pode sofrer mal súbito e expor a si mesmo ou a transeuntes a um produto perigoso e provocar danos à saúde ou mesmo até a morte (FERREIRA, 1999).

2.5 Riscos Físicos

Os riscos físicos podem ser enumerados dependendo dos equipamentos de manuseio do laboratório, podendo estar relacionados com a umidade, calor, ruídos, radiações (ionizantes e não-ionizantes), etc.

2.5.1 Radiações não ionizantes

O ambiente de trabalho deve estar com intensidade de luz adequada para manter confortável a utilização da visão. A adequação da iluminação deve ser realizada por profissionais especializados. Além da iluminação branca, outros tipos de radiação não-ionizante utilizadas são a radiação ultra-violeta (UV) e a infra-vermelho. Apesar de ser utilizada como meio terapêutico, a exposição excessiva à radiação infra-vermelho provoca desidratação e queimaduras.

2.5.1.1 Radiações ultravioleta

De acordo com o comprimento de onda, os raios ultra-violetas (raios UV) são classificados em raios UV-C, em raios UV-A (320 – 400 nm) e em raios UV-B (280- 320 nm).

A radiação não ionizante é absorvida por várias partes celulares, mais o maior dano ocorre nos ácidos nucleicos, que sofrem alteração de suas pirimidias.

Formam-se dímeros de pirimida e se estes permanecem (não ocorre reativação), a réplica do DNA pode ser inibida ou podem ocorrer mutações. (RADIAÇÃO, 2001)

A principal consequência é a possibilidade de dano genético. O DNA absorve os raios UV-B e a energia absorvida pode quebrar as cadeias de DNA. Muitas destas quebras são reparadas pelas proteínas presentes no núcleo da célula, mas o dano genético que não é reparado pode causar câncer de pele. (NASA, 2001)

Raios UV, cujo comprimento de ondas estejam entre os valores de 4000 e 3000 angstroms produz queimaduras (exposição solar em horário inadequado). A região entre 2800 a 2200 angstroms é conhecida pelo seu efeito bactericida ou germicida. As lâmpadas germicidas emitem luz a 2537 angstroms, sendo um risco aos indivíduos expostos a ela periodicamente. Entre 2200 a 1700 angstroms o risco irá variar em função da presença ou não de ozônio no ar. O tempo de exposição permitido irá variar em relação ao comprimento de onda e a potência da fonte UV (CARVALHO, 1999).

A radiação ultravioleta não pode ser utilizada como processo de esterilização. Fatores como matéria orgânica, comprimento de onda, tipo de material, tipo de microrganismo e intensidade da radiação interferem na sua ação germicida. Além disso, a radiação não ionizante não tem poder de penetração, age apenas sobre a superfície onde os raios incidem e não atravessam tecidos, líquidos, vidros, nem matéria orgânica. Alguns autores relatam ainda que o vírus

HIV tem alta resistência à luz ultravioleta. A aplicação da luz ultravioleta em hospitais se restringe à destruição de microrganismos do ar ou inativação destes em superfície. Em algumas situações em que há necessidade de esterilização do ambiente, a radiação UV pode ser utilizada. Nos laboratórios de pesquisa e ensino, as fontes de UV (exemplo, transiluminadores) são utilizadas para detecção de substâncias fluorescentes.

A radiação UV é extremamente danosa para a retina dos olhos. A manipulação de transiluminadores UV deve ser feita de forma segura, com utilização obrigatória de protetores faciais e óculos de proteção que retém esse tipo de radiação. É muito comum a utilização apenas dos óculos de proteção, sem a máscara, na manipulação de transiluminadores de UV, no entanto, deve-se tomar o cuidado que exposição a essa radiação por tempo prolongado e de forma cumulativa pode causar queimadura ou câncer de pele. Nos experimentos de manipulação de DNA normalmente utiliza-se uma fonte de luz ultra-violeta de 302 nm para visualizar os produtos da reação, também utiliza-se na fotografia dos géis. É necessária a presença de um fotosspectrômetro no laboratório. (DAVIS, 1996)

2.5.1.2 *Radiação infravermelho*

Apesar de ser utilizada como meio terapêutico, a exposição excessiva à radiação infra vermelho provoca desidratação e queimaduras.

2.5.2 Equipamentos

Todo o instrumental utilizado dentro do laboratório, compreendendo vidrarias, equipamentos fixos, móveis, objetos pérfuro-cortantes, etc.

2.5.2.1 Equipamentos de vidro

No tocante a vidraria deve-se observar a resistência mecânica (espessura do vidro), resistência química e a resistência ao calor. Tendo em vista a estas circunstâncias, algumas sugestões são importantes: deve-se utilizar apenas vidros de borossilicato, resistentes ao calor, para aquecimentos ou reações que liberam calor e principalmente nunca levar a chama direta, um frasco de vidro, é recomendável utilizar-se manta elétrica ou tela de amianto. Ao aquecer, nunca fechar hermeticamente o frasco de vidro. Deve-se ressaltar ainda que vidros contendo substâncias inflamáveis devem ser aquecidos em banho de água, nunca em mantas ou em chama. Para proteção da equipe deve-se utilizar sempre luvas de amianto ou com poder de isolamento térmico adequado.

Ao utilizar material de vidro em sistema de auto vácuo não utilizar vidraria de parede fina, recomenda-se utilizar frasco de Kitazato. Tomar precauções de utilizar manômetro para controle do vácuo e proteger o frasco em tela de arame ou caixa fechada para evitar estilhaço em caso de implosão, principalmente na utilização de frasco de grande dimensão.

Quando da utilização de rolhas em frascos de vidro deve-se avaliar com cuidado o tamanho da rolha em relação ao tamanho do orifício de vidro a ser tampado e em determinados casos utilizar lubrificante tais como: silicone, vaselina ou mesmo água, caso não permita uso de tais lubrificantes.

Em relação à equipe deve-se proteger as mãos com luvas que não permitam perfuração, e principalmente proteger os olhos com uso de óculos de proteção.

Deve-se ainda ressaltar que não se deve utilizar frasco de vidro com fratura e trincas, pois estes podem se quebrar, além de se constituírem as trincas em locais de retenção de germes e bactérias.

Também se deve ressaltar que também a vidraria sofre fadiga após inúmeras utilizações, devendo ser substituídas periodicamente para se evitar acidentes, o uso repetido, torna o vidro mais frágil.

A lavagem da vidraria poderá propiciar acidentes, devido à utilização de detergentes. Sempre utilizar material amortecedor nos locais de lavagem, ou seja, na superfície da pia colocar material de borracha, bem como protetores de torneira de silicone. Toda vidraria utilizada deve ser energicamente lavada e esterilizada. (DAVIS, 1996)

A equipe deverá utilizar luvas com material antiderrapante. Deve-se, na medida do possível, evitar-se a utilização de solução sulfocrômica, por ser esta altamente perigosa, e causar contaminação no meio ambiente, no comércio

existem disponíveis detergentes adequados para remoção de resíduos químicos ou biológicos.

O descarte de material de vidro deve ser realizado de forma adequada, em caixas de papelão/plástico ou mesmo metálica resistentes.

2.5.2.2 Equipamentos que geram calor ou chama

Estufas, muflas, banhos-maria, bico de gás, lâmpada infravermelho, manta aquecedora, agitadores magnéticos com aquecimento, termociclador, incubadora elétrica, forno de microondas, esterilizador de alça ou agulha de platina e autoclaves são os principais equipamentos geradores de calor. As instalações destes equipamentos devem ser feitas em local ventilado e longe de material inflamável, volátil e de equipamentos termo-sensíveis.

Os aparelhos que geram altas temperaturas, como a estufa, devem ser cuidadosamente instalados em suportes termo-resistentes ou em balcões com resistência térmica (nunca em balcão de madeira). Nunca instalar incubadoras próximas de refrigeradores.

Ao manipular equipamentos geradores de calor o operador deve se proteger com luvas adequadas, avental. Já na manipulação de voláteis perigosos (destiladores de solventes) utilizar máscaras com filtros adequados, dentro de capelas para substâncias químicas voláteis.

2.5.2.3 *Equipamentos de baixa temperatura*

Quando se utiliza congeladores de baixa temperatura aproximadamente -70°C deve-se utilizar aventais térmicos e máscaras, além da proteção das mãos com luvas térmicas e prender os cabelos, se muito longos. Evitar manter aberto esses congeladores por muito tempo, pois haverá queda demasiada da temperatura. Ao manipular com acetona ou etanol, antes observar a solubilidade do material térmico em que se encontra acondicionado. Uma sala fria é útil para o desenvolvimento das reações a 4°C e centrifugações. (DAVIS, 1996)

2.5.2.4 *Equipamentos de engrenagens e sistemas de trituração*

Esses equipamentos requerem cuidados especiais. O operador nunca deve estar com aventais desabotoados e de mangas compridas soltas, os cabelos devem sempre estar presos, se longos. Utilizar equipamento de proteção individual de forma adequada e certificar-se dos cuidados na manipulação destes equipamentos, seguindo rigorosamente os manuais de instrução para cada tipo de equipamento. O manuseio inadequado é descrito freqüentemente com acidentes graves. As máquinas de triturar precisam ser usadas e abertas no interior de cabines de segurança biológica. (SOUZA, 1998)

2.5.2.5 *Equipamentos e instrumentos perfurantes*

Deve-se proteger as mãos com luvas adequadas e sem dúvida tomar os devidos cuidados na manipulação nunca voltando o instrumento contra o próprio corpo. Apoiar adequadamente em superfície firme antes de utilizar os instrumentos perfurantes, ou prender em equipamentos adequados para cada tipo de uso.

2.5.2.6 *Equipamentos de rotação*

A maioria dos métodos necessitam múltiplas centrifugações. Microcentrífugas, centrífugas de mesa refrigeradas, modelos de chão e ultracentrífugas. A presença de uma segunda centrífuga em uma sala fria também é útil. Muitas vezes os procedimentos requerem centrifugações longas, demoradas, por isto é necessário mais de um tipo de cada equipamento. (DAVIS, 1996) São necessários cuidados no fechamento adequado dos tubos, na sua correta inserção no aparelho e cuidados especiais na abertura dos tubos. Nunca abra a câmara enquanto o rotor está em movimento, nunca utilize velocidade superior a que o rotor está especificado. (NINFA, 1995) O álcool a 70% será usado como meio de equilibrar os porta tubos. Não convém utilizar soro fisiológico nem solução de hipoclorito, visto que estes corroem os metais (SOUZA, 1998). Lembre-se que há o risco de partículas infecciosas transmissíveis serem projetadas durante o emprego da centrífuga.

2.5.2.7 Outros equipamentos específicos para pesquisa em DNA

Máquina fotográfica para fotografar o gel quando este é transluminado por um sistema de luz UV, autoradiografia, sistemas de eletroforese, filtros câmaras de eletroforese. Ao operar com sistemas de eletroforese normalmente são utilizadas sistemas de suprimento elétrico eletroforese a alta amperagem (400 mA) ou a alta voltagem (2.000V). Cuidados como risco de choque elétrico ao realizar as conexões. Nunca ligue a fonte de suprimento sem ter certeza que os cabos estão corretamente ligados ao tanque. Tenha certeza de o dial estar na posição zero antes de ligar a corrente e somente a partir deste ponto regule na corrente desejada. Após o procedimento desconecte aos cabos do tanque. Estes procedimentos ajudam a evitar acidentes. (NINFA,1995)

2.5.3 Umidade e temperaturas extremas

Em caso de trabalhar em locais muito úmidos deve ser utilizada proteção continua devido ao risco de invalidez permanente. Nesse caso, deve-se utilizar roupas impermeáveis, que protejam da umidade, do calor ou do frio excessivo. O tempo de trabalho nestas condições deve ser bastante limitado.

2.5.4 Ruídos e vibrações

Nos locais em que são instalados equipamentos que emitem ruído devem ser utilizados protetores auriculares.

Os equipamentos que podem emitir ruídos de forma anormal são: trituradores, centrífugas, ultracentrifugas, ultra-som, autoclave, congelador ultrafrio, bombas de autovácuo, determinados condicionadores de ar, capela de fluxo laminar ou capela química entre outros. Existe legislação específica que normatiza os níveis de ruído do ambiente de trabalho e determine os limites permissíveis.

2.6 Riscos Biológicos

Os riscos biológicos são decorrentes da exposição produtos e subprodutos de animais, vegetais e microrganismos. Entre os agentes de risco biológico podemos citar os mais importantes: bactérias, fungos, leveduras, vírus, protozoários, metazoários, esses agentes podem estar presentes no ambiente laboratorial veiculados sob diversas formas que oferecem risco biológico, tais como: aerossóis, poeira, alimentos, instrumentos de laboratório, água, culturas, amostras biológicas (sangue urina, escarro, secreções), entre outros.

Ainda os riscos biológicos em laboratórios podem estar relacionados com a manipulação de: agentes patogênicos selvagens, agentes patogênicos

atenuados, agentes patogênicos que sofreram processo de recombinação, amostras biológicas, culturas e manipulações celulares e animais.

Todos os itens citados acima podem tornar-se fonte de contaminação para os manipuladores. As principais vias envolvidas num processo de contaminação biológica são a via cutânea ou percutânea (com ou sem lesões, por acidente com agulhas e vidraria; na experimentação animal, arranhões e mordidas), a via respiratória (aerossóis), a via conjuntival e a via oral.

A manipulação de materiais biológicos, principalmente os que são potenciais contaminantes no ser humano deve ser realizada tomando-se várias precauções, sendo estas individuais e/ou coletivas.

Dentre as precauções individuais, deve-se fazer uso de máscara tripla, óculos de proteção, gorro, avental, luvas, proteção adequada para os pés.

Já no tocante às precauções coletivas, devemos fazer a limpeza, desinfecção, esterilização, descontaminação e anti-sepsia.

2.6.1 Fatores que interferem na eficácia da desinfecção e esterilização

Natureza do microrganismo: A suscetibilidade aos agentes químicos e físicos depende da natureza do microrganismo, que variam na sua constituição. De modo geral, em ordem decrescente de resistência, tem-se: *prions*, endosporos bacterianos (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*), micobactérias, vírus

hidrofílicos ou pequenos (poliovírus, Coxsackie vírus, rinovírus), fungos vegetativos e esporos de fungos assexuados (*Trichophyton spp*, *Cryptococcus spp*, *Candida spp*), bactérias de forma vegetativa (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesius*) e os vírus lipofílicos ou médios (Herpes simples vírus, Citomegalovírus, vírus da Hepatite B, vírus da HIV).

O número de microrganismos e a localização dos mesmos também influenciam na ação dos desinfetantes. Uma boa limpeza antes da desinfecção sempre é recomendada para melhorar a eficácia do trabalho, uma vez que reduz o número de microrganismos e pode expor melhor o agente.

2.6.2 Concentração do agente químico e tempo de exposição

De modo geral, quanto mais concentrado o produto químico, maior a eficácia e menor o tempo necessário para a destruição dos microrganismos, portanto a potência do desinfetante depende da concentração e do tempo de exposição. Os compostos fenólicos são altamente potentes como desinfetantes.

Na maioria dos casos o tempo requerido varia de 10 a 30 minutos para desinfecção de superfície, de 30 minutos para desinfecção de artigos e de 10 a 18 horas para esterilização de artigos.

2.6.3 Fatores que interferem na eficácia da desinfecção e esterilização

Outros fatores que afetam a eficácia do agente químico no processo de desinfecção ou esterilização são: pH, temperatura, água, umidade relativa e matéria orgânica.

De modo geral, o aquecimento aumenta a eficácia os desinfetantes. No entanto, é necessário tomar cuidado, pois o aquecimento provoca evaporação de compostos, reduzindo a concentração efetiva da mistura desinfetante. O pH de alguns desinfetantes influencia drasticamente, como por exemplo, para os compostos de amônio quaternário que agem por carga como cátions, o pH alcalino favorece a ação. Os compostos fenólicos agem mais efetivamente em pH ácidos, apesar de agir em pH neutro ou ligeiramente alcalino.

Dependendo da concentração de ácido e magnésio na água (água dura) esses interagem com os sabões e outros compostos formando precipitados insolúveis. A exemplo disso, a atividade dos compostos de amônio quaternário é significativamente afetada na presença de água dura. No caso de utilização de compostos gasosos, como o óxido de etileno e formaldeído, a presença de umidade pode afetar de forma significativa.

A matéria orgânica pode servir de barreira física, pois interage com os compostos ativos, como por exemplo, o cloro, inibindo a sua ação direta. Essas podem estar sob várias formas como sangue, pus, material fecal, resíduos de alimentos. Podem também agir formando complexos menos ativos, deixando

menor quantidade do agente químico disponível para atuar sobre os microrganismos.

2.6.4 Classificação dos microrganismos por classe de risco

Há uma classificação dos agentes patogênicos que leva em consideração os riscos para o manipulador, para a comunidade e para o meio ambiente. Esses riscos são avaliados em função do poder patogênico do agente infeccioso, da sua resistência no meio ambiente, do modo de contaminação, da importância da contaminação (dose), do estado de defesa imunitária do manipulador e da possibilidade de tratamento preventivo e curativo eficazes.

As classificações existentes são bastante similares, dividindo os agentes em quatro classes:

- Classe 1 - onde se classificam os agentes que não apresentam riscos para o manipulador, nem para a comunidade (exemplo, *E. coli*, *B. subtilis*);
- Classe 2 - apresentam risco moderado para o manipulador e fraco para a comunidade e há sempre um tratamento preventivo (exemplo, bactérias - *Clostridium tetani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*; vírus - herpes; fungos - *Candida albicans*; parasitas - *Plasmodium*, *Schistosoma*);
- Classe 3 - são os agentes que apresentam risco grave para o manipulador e moderado para a comunidade, sendo que as lesões ou sinais

clínicos são graves e nem sempre há tratamento (exemplo, bactérias - *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium tuberculosis*; vírus - hepatites B e C, HTLV 1 e 2, HIV, febre amarela, dengue; fungos - *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma*; parasitos - *Echinococcus*, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*);

- Classe 4 - os agentes desta classe apresentam risco grave para o manipulador e para a comunidade, não existe tratamento e os riscos em caso de propagação são bastante graves (exemplo, vírus de febres hemorrágicas). (UFRGS...2001)³

2.7 Proteção Individual

Trabalhos de laboratório executados por um longo período são freqüentes em nosso dia a dia. Alguns laboratórios têm sistema de ventilação deficiente e dependendo da substância química empregada, o ambiente de trabalho pode estar seriamente comprometido, interferindo na saúde daqueles que se fazem presentes. Um alerta se faz necessário no sentido da segurança do trabalhador, buscando-se sempre as informações pertinentes ao tipo de trabalho executado e ao uso correto dos equipamentos de proteção individual.

³ UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul : Comissão de Biossegurança. http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot09.htm

2.7.1 Equipamento de proteção individual

Segundo a Lei n. 6.514 de 22 /12/1977, no artigo 166 que a empresa é obrigada a fornecer aos empregados, gratuitamente, Equipamentos de Proteção Individual (EPI) adequado ao risco e em perfeito estado de conservação.

Os empregados, de acordo com a Norma Regulamentadora 6/6.7.1 são obrigados a usar o EPI e se responsabilizar pela guarda e conservação deste.

Esses equipamentos devem ser utilizados obrigatoriamente quando da execução de qualquer atividade que envolva o manuseio de reagentes químicos e soluções, movimentação e transporte de materiais perigosos e também quando da circulação em áreas externas que são consideradas áreas de risco.

Os equipamentos de proteção individual são regulamentados pela Portaria 3214NR-6 do Ministério do Trabalho de 08/10/78.

2.7.1.1 Protetores para a cabeça

- Capacetes de segurança (serviços com eletricidade)
- Proteções faciais (máscaras faciais) - protegem a face contra riscos de impacto (de partículas sólidas), substâncias nocivas (vapores), radiações (raios infra-vermelhos). Oferecem melhor proteção pois, além dos olhos, protegem toda face contra os perigos dos respingos das

substâncias potencialmente corrosivas e tóxicas (fenol, hidróxido de sódio e potássio e ácidos).

- Os óculos de proteção (de segurança) - Oferecem proteção somente para os olhos. Precisam ser de qualidade comprovada, a fim de oferecer ao usuário visão transparente, sem distorções e opacidade. Para trabalhos envolvendo luz ultravioleta, é necessário além dos óculos especiais à proteção de toda a face.

- Proteção respiratória (máscaras para proteção respiratória)
São utilizadas máscaras com filtros que protegem o aparelho respiratório podendo ter: respiradores com filtros mecânicos (proteção contra partículas suspensas no ar) e respiradores com filtros químicos (protegem contra gases e vapores orgânicos) e respiradores com filtros combinados (filtros mecânicos e químicos). Essas máscaras são necessárias no caso de uso de gases irritantes como cloreto de hidrogênio, dióxido de enxofre, amônia e formaldeído, os quais produzem inflamações nos tecidos que entram em contato. Também se deve usar a máscara no caso de gases anestésicos como o obter e grande parte de solventes orgânicos que tem ação depressiva sobre o Sistema Nervoso Central. Conforme a cor do filtro temos a indicações para o seu uso: branco (gases ácidos); amarelo (vapores orgânicos e gases ácidos); verde (amônia); marrom (vapores orgânicos, gases ácidos e amônia); vermelho (universal, serve para gases industriais, monóxido de carbono, fumo e fumaças); branco com listras

verdes (vapores de ácido clorídrico); branco com listras amarelas (cloro); azul (monóxido de carbono).

- Proteção auricular - (proteção contra níveis elevados de ruído).

2.7.1.2 *Protetores para o tronco*

São utilizados quando há risco de projeção de partículas, golpes ligeiros, calor radiante, chamas, respingos de produtos químicos, etc.

- Aventais de PVC - Quando há riscos de respingos de produtos químicos.

- Aventais de Kevlar - Utilizados onde o calor é excessivo.

- Aventais de borracha - Protegem o corpo do pessoal envolvido na manipulação de grandes volumes de soluções ou quando o trabalho a ser executado é reconhecidamente perigoso. Para o pessoal responsável pela lavagem, limpeza de vidrarias e equipamentos, os aventais devem ser de uso obrigatório.

2.7.1.3 *Proteção dos membros superiores*

Protegem contra riscos de golpes, cortes, substâncias químicas, choques elétricos, radiações ionizantes, etc.

- Luvas - As luvas precisam ser de material resistente e compatíveis com as substâncias que serão manuseadas. Para os trabalhos que geram calor, o uso de luvas de pano resistentes ou revestidas de material isolante ao calor é recomendado. Os tipos de materiais de luvas recomendadas para o manuseio de substâncias químicas são as seguintes: borracha natural, neoprene, PVC, PVA e borracha butadieno. A escolha deveria ser feita conforme o tipo de substância química a ser utilizada.

2.7.1.4 *Proteção dos membros inferiores*

Protegem contra riscos de superfícies cortantes e abrasivas, de substâncias químicas, de calor e frio, perigos elétricos, impactos de objetos pesados, etc.

- Botas de borracha - para aqueles que trabalham em áreas úmidas, é necessário à utilização de botas de borracha. Em algumas situações emergenciais, como o derrame de líquidos ou qualquer material perigoso, é importante que o responsável pela tarefa de limpeza esteja com seus pés devidamente protegidos.

- Calçados - Pés desprotegidos (sandálias) ou pouco protegidos (sapatos de pano) acarretam problemas sérios e podem gerar situações perigosas. O sapato deverá ser compatível com o tipo de atividades desenvolvidas.

2.7.2 Equipamento de proteção individual básico

Luvas, óculos de proteção, gorro, máscara, avental, adequados ao procedimento executado.

Grupos de EPI

Grupo 1 EPI básico: Óculos de segurança para produtos perigosos.

Grupo 2 EPI básico: Máscara panorâmica com filtro GA combinado.

Grupo 3 EPI básico: Máscara panorâmica com filtro VO combinado.

Grupo 4 EPI básico: Máscara panorâmica com filtro NH₃.

Grupo 5 EPI básico: Máscara panorâmica com filtro CO combinado.

Grupo 6 EPI básico: Máscara panorâmica com filtro SO₂ combinado.

Grupo 7 EPI básico: Óculos de segurança para produtos perigosos. Máscara semi-facial com filtro VO combinado ou máscara de fuga.

Grupo 8 EPI básico: Óculos de segurança para produtos perigosos. Máscara semi-facial com filtro VO combinado ou máscara de fuga.

Grupo 9 EPI básico: Óculos de segurança para produtos perigosos. Máscara semi-facial com filtro NH₃ ou máscara de fuga.

Grupo 10:EPI básico: Óculos de segurança para produtos perigosos. Respirador de pó. (GASSE, 2001)

2.7.3 Equipamento de proteção coletiva

São utilizados para minimizar a exposição dos trabalhadores aos riscos e, em caso de acidentes, reduzir suas conseqüências. Podemos citar como exemplo o uso de câmaras de fluxo laminar, que protegem os profissionais e o meio ambiente do risco de contaminação e os chuveiros de emergência e lava-olhos para o caso de uma emergência.

2.8 Equipamentos de Contenção

2.8.1 Cabines de segurança

São equipamentos que visam promover uma barreira primária para evitar a fuga de contaminantes, normalmente aerossóis para o meio ambiente, evitando a sua inalação pelo operador ou pessoal do laboratório.

As cabines de contenção irão variar de acordo com a área de trabalho (aberta ou fechada), fluxo de ar, equipamentos de filtração e tipos de exaustão, devendo atender os objetivos de proteger o operador, proteger o meio ambiente.

As cabines de segurança biológica dividem-se em três classes: Classe I, classe II e classe III. A classe I e II são consideradas barreiras parciais, a classe III, é uma barreira de proteção total. As cabines de biossegurança de Classe I e II, usadas em conjunto com boas práticas microbiológicas fornecem boa contenção para a manipulação de organismos de risco moderado e alto (agentes de níveis 2 e 3). Ambas têm fluxo de ar para o interior a cerca de 75 pés lineares por minuto.

As cabines Classe I têm a frente aberta e pressão negativa. O ar de exaustão é filtrado através de um filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) diretamente para o ambiente. Protegem pessoal e o ambiente, mas não materiais de pesquisa. Eles provêem um fluxo dentro de ar de não filtrado, semelhante a um capuz de fumaça químico que protege o trabalhador do material na cabine. O ambiente é protegido através da filtração através do HEPA que limpa o ar antes que este seja liberado para o laboratório ou para o exterior das instalações do laboratório.

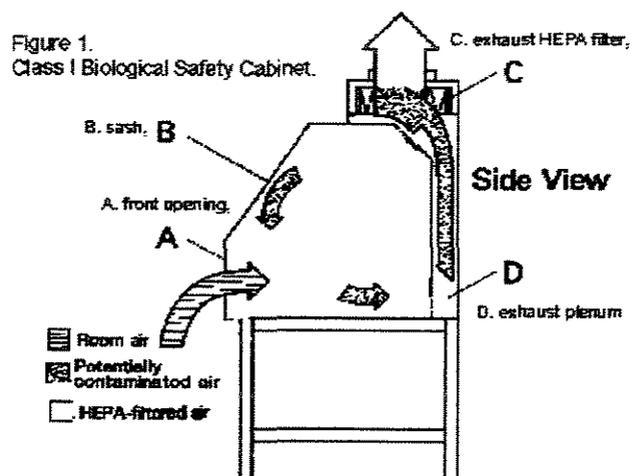


Figura 9 Cabine classe I

As cabines Classe II têm a frente aberta e fluxo laminar vertical. Nesta cabine o ar recircula através do filtro HEPA dentro da área de trabalho. Os padrões para as cabines Classe II foram desenvolvidos pela *National Sanitation Foundation*, NSA, que são aceitos internacionalmente. Para uso em microbiologia, esta cabine fornece a vantagem adicional de proteger os materiais de contaminantes externos devido à recirculação do ar em seu interior através do filtro HEPA.

Cabines de segurança biológicas, classe II, protegem o pessoal, o ambiente, e protegem o produto. Ar é tirado ao redor do operador na grade dianteira da cabine fornecendo proteção ao operador. Além, do fluxo laminar descendente, flui ar filtrado através de HEPA dentro da cabine provendo proteção ao produto, minimizando a chance de contaminação secundária ao longo da superfície de trabalho da cabine. Na cabine II B2 e B3 o sistema de exaustão necessita estar conectado com o sistema de exaustão do prédio.

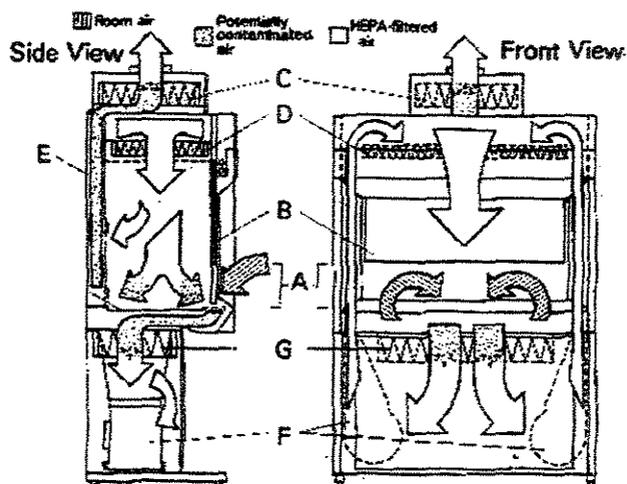


Figura 10 Cabine classe II B 1

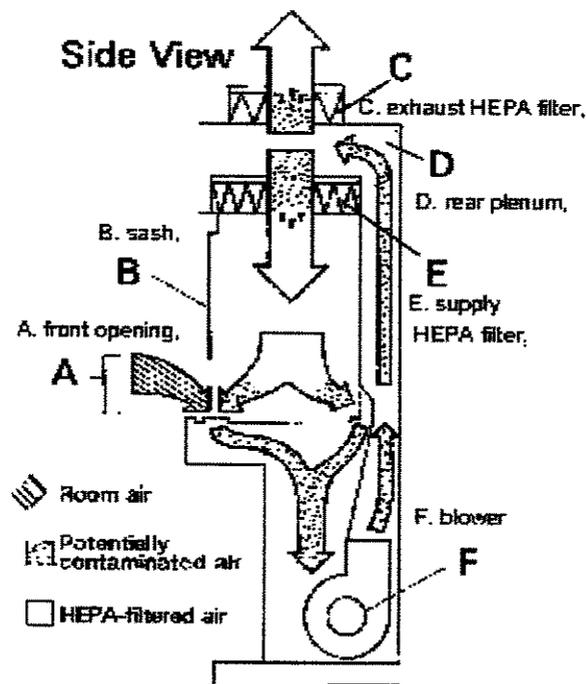


Figura 11 Classe II tipo B 2

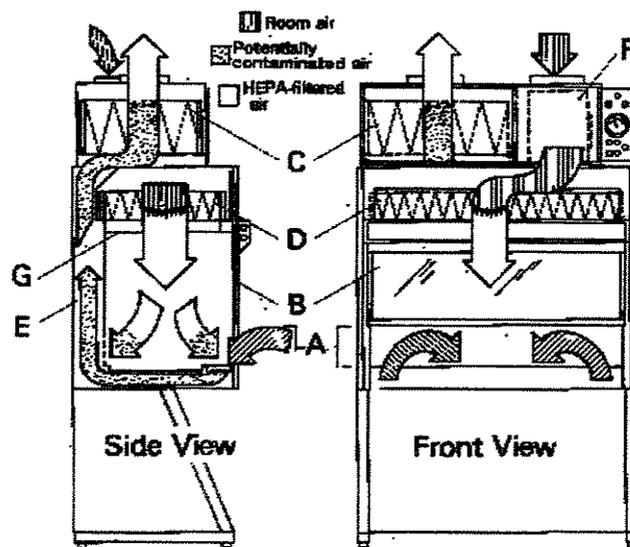


Figura 12 Cabine Classe II B3

As cabines Classe III são totalmente seladas e os materiais são manipulados através de luvas adaptadas ao corpo da cabine, sendo o interior da cabine submetido a constante pressão negativa durante o uso. São as cabines que fornecem maior nível de proteção individual. A cabine de classe III foi projetada para o trabalho com agentes infecciosos que requerem para NB-4 de contenção, e provê o máximo de proteção ao ambiente e o trabalhador. A cabine está separada com uma janela de visão de sem abertura, e tem luvas de borracha prendidas a orifícios na cabine que permite manipulação de materiais. O ar é filtrado por um HEPA que filtra o ar que entra, e por um segundo filtro HEPA antes de ser liberado ao ar livre. O exaustor da cabine necessita estar conectado a um sistema de exaustão próprio independente do sistema de exaustão do prédio. O elemento comum para todas as classes de cabinas de segurança biológicos é filtro de alta eficiência contra partículas (HEPA). Este filtro remove partículas de 0.3 microns com uma eficiência de 99.97%. Porém, não remove vapores ou gases. (MARYLAND, 2001)⁴

⁴ UNIVERSITY OF MARYLAND **Biosafety Manual for University of Maryland**
<http://www.inform.umd.edu/CampusInfo/Departaments/Envirsafety/biosafety/rest/manual.pdf>.

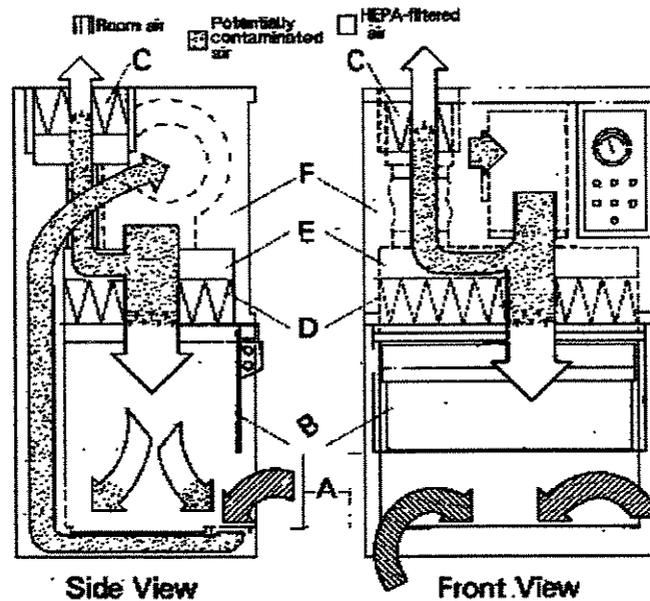


Figura 13 Cabine classe III

O roteiro para utilização da cabines pela equipe deve ser fornecido por escrito. O operador deve evitar interromper o fluxo de ar, executando movimentos repetidos de retirada e reintrodução das mãos; depois de encerrado o trabalho, o ventilador da mesma precisa permanecer em funcionamento por no mínimo cinco minutos(SOUZA,1999).

2.8.2 Fluxo laminar

É uma massa de ar confinada que se move com velocidade uniforme ao longo de linhas paralelas. (SILVA,1996) O fluxo descarrega ar filtrado através de HEPA para a superfície de trabalho e para o usuário, provendo só proteção do produto. Eles podem ser usados em atividades limpas, como sobre equipamento

estéril ou dispositivos eletrônicos, com certeza. Porém, eles nunca deveriam ser usados para controlar materiais de cultura, ou materiais potencialmente infecciosos, ou como substituto para cabine de segurança biológica em laboratórios de pesquisa.

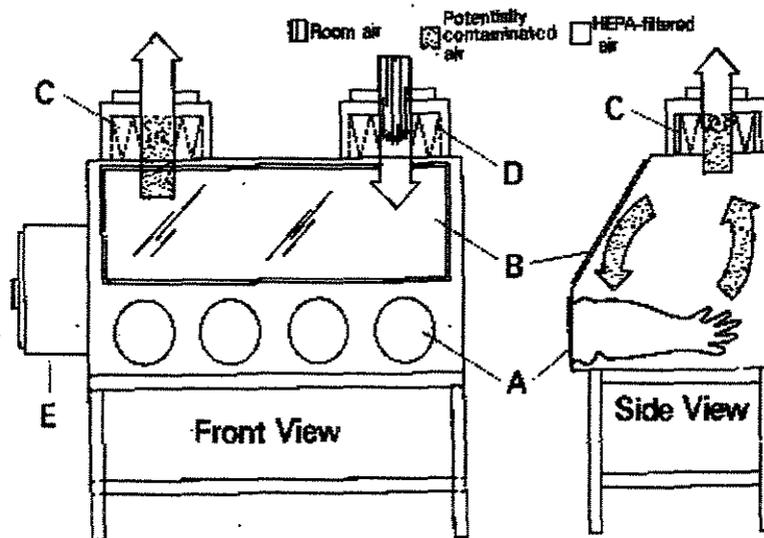


Figura 14 Fluxo laminar

2.9 Doenças Ocupacionais

No manuseio de fluidos corporais que contenham sangue visível ou ao sangue, são necessários precauções que basicamente constituem-se no uso de barreiras de proteção. Outros cuidados também se fazem necessários: O cuidado

no manuseio de agulhas e de material perfuro-cortante, o uso de pipeteadores mecânicos, o manuseio cuidadoso do material potencialmente infectado, para evitar a formação de aerossóis, são regras básicas para evitar o risco de contaminação pelo HIV, hepatite ou *prions* (possíveis causadores da encefalopatia subaguda espongiiforme. (TEIXEIRA, 1996) Para a inativação dos agentes causadores das encefalopatias subagudas espongiiformes pode-se adotar por ordem de prioridade os seguintes procedimentos:

- Autoclavação a 132°C por uma hora ou 138°C por 20 minutos
- Tratamento com hidróxido de sódio 1N durante uma hora.
- Tratamento com hipoclorito de sódio a 5% durante uma hora.
- Após um destes métodos pode-se utilizar a incineração dos materiais de maior risco, em particular aqueles contendo sistema nervoso central.

2.10 Organização das Atividades no Laboratório

A organização do trabalho é um aspecto fundamental para a segurança do pesquisador ou analista e para garantir resultados precisos e de qualidade. A falta de organização no ambiente de trabalho, pode variar situações de risco para o operador e para outros indivíduos que estão presentes no local e também pode promover danos às instalações prediais. As situações de risco predis põem a

ocorrência acidentes que podem ser irreversíveis levando ao afastamento temporário ou definitiva do profissional.

Portanto, é fundamental que qualquer atividade laboratorial seja previamente planejada e seja executada em ambiente seguro.

No ambiente de trabalho devem ser considerados as condições de trabalho e todos os fatores que oferecem risco para o operador, como as instalações, os locais de armazenamento e manipulação de produtos químicos, as condições operacionais dos equipamentos, as bancadas, os equipamentos de proteção, entre outros.

A realização de uns experimentos ou qualquer outra atividade laboratorial exige um planejamento próprio e um roteiro para execução adequada e segura do trabalho e orientação para descarte dos resíduos gerados.

O planejamento das atividades e a organização do ambiente de trabalho são essenciais para detectar qualquer dificuldade que possa prejudicar a execução dessas atividades ou, ainda, expor o operador a riscos ocupacionais.

A seguir, são descritas algumas orientações que podem auxiliar no planejamento das tarefas. (CARVALHO, 1996)

Orientações para o planejamento das tarefas

1. Equipamentos e instrumentos: verificar a disponibilidade e condições de uso. Observar as instruções de uso e o responsável em situações de emergência. Para equipamentos de multiusuários, o agendamento é essencial.

2. Vidraria e outros materiais: observar a limpeza, o estado (trincas e rachaduras), a resistência térmica, a resistência e compatibilidade a solventes e outros reagentes. Observar a necessidade de tratamento próprio (esterilização, descontaminação química ou biológica)

3. Reagentes e soluções: preparar antecipadamente as quantidades necessárias, observando a estabilidade e as condições de armazenamento. Seguir os procedimentos adequados de armazenamento dos produtos químicos, observando a compatibilidade entre os mesmos.

4. Condições do laboratório: observar a necessidade do uso equipamentos de proteção individual (óculos de segurança, máscaras, aventais, luvas, etc) e de equipamentos de proteção coletiva, como gabinete de segurança química (capela) para a manipulação de substâncias químicas tóxicas, fluxo laminar para a manipulação de amostras ou materiais biológicos (culturas de microorganismos), entre outros.

5. Sinalização das áreas de trabalho: observar os sinais universais de indicação de risco químico, biológico, físico ou outro. Uma atividade de alto risco deve ser realizada em área restrita, bem sinalizada, e os demais colegas devem ser informados sobre os riscos a que possam estar expostos.



Figura 15 – Risco Contaminação Biológica

6. Tempo de execução da atividade, é possível estimar a tempo necessário para a execução de uma dada tarefa, se as condições e os materiais necessários para a sua excursão forem previamente planejados e disponibilizados, é importante lembrar que atividades realizadas além do período normal do expediente predispõem a acidentes que podem causar danos irreparáveis à saúde do operador, principalmente pela falta de socorro imediato.

Outro aspecto importante a ser considerado é organizar os procedimentos operacionais e as atividades laboratoriais de modo a otimizar a trabalho a ser realizado e minimizar a geração de riscos de acidentes.

2.11 Resíduos de Laboratório

Os resíduos de laboratórios podem ser classificados de uma forma geral em resíduos infectantes (possibilidade de causar uma patologia); especiais (resíduos radioativos, químicos perigosos); e comuns (assemelhados ao lixo doméstico comum). (FERREIRA, 1996)

Não há uma forma única ou solução simples para o problema de gestão dos resíduos produzidos por um laboratório forense devido a diversidade de produtos manipulados. O conhecimento dos diversos métodos é necessário e a responsabilidade por sua implementação em cada caso específico deve ser coordenada pelo pesquisador ou responsável pelo laboratório.

Para uma operação de descarte eficaz a primeira providência a se efetuar com o material a ser descartado é sua correta identificação. Ao se rotular resíduo de laboratório é importante levar em conta que as classificações gerais ou específicas devem ser usadas como diretrizes básicas e que sempre se deve fazer um diagnóstico local pormenorizado de itens, características toxicológicas, natureza das exposições a estes resíduos e volumes envolvidos.

Grandes volumes - colete os resíduos sólidos, luvas contaminadas, vidros, papéis, etc, em caixas de papelão com dois sacos de plástico.

Os líquidos devem conter a descrição da natureza de solutos e solventes e concentrações. Também descrever a quantidade de água presente.

2.11.1 Descarte de produtos químicos

Instituições de ensino e pesquisa que possuem em suas instalações laboratórios onde são realizadas atividades práticas, geram resíduos químicos que podem causar efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente se descartados inadequadamente. A fiscalização dessas instituições por órgãos públicos de

defesa da segurança, saúde pública e preservação ambiental, torna-se uma prática difícil devido a grande variedade de resíduos gerados, e que, embora em pequenas quantidades são muito tóxicos ou apresentam outros graus de periculosidade ou ainda estão misturados e não identificados.

Quando essas substâncias são lançadas no meio ambiente sofrem processos naturais de degradação e tendem a ser absorvidas e concentrar-se nos seres vivos, processos estes que podem demorar longos períodos de tempo e seus resultados somente aparecerem após várias gerações, podendo até ocorrer mudanças irreversíveis em algumas espécies, levando-as a extinção. A emissão de esgoto saturado com matéria orgânica e contaminado com substâncias tóxicas como metais pesados, solventes orgânicos sintéticos não biodegradáveis, agentes patogênicos, detergentes e outros, ocasionam modificações profundas nos corpos d'água e mesmo no solo, que podem demorar décadas para desaparecer.

O gerenciamento adequado do descarte de resíduos e substâncias químicas perigosas vem preocupando e envolvendo a cada dia mais pessoas que, através de um levantamento criterioso, constante e sistemático conseguem sensibilizar os colegas e a direção da instituição para as devidas providências a serem tomadas dentro do seu ambiente de trabalho.

Segundo as normas da ABNT (NBR 12809 e 10004) recomenda-se que o resíduo químico perigoso seja, sempre que possível, incinerado, reciclado, inativado ou que o processo gerador seja substituído por outro que produza resíduo menos perigoso. O resíduo que não for classificado como perigoso seja

tratado como resíduo comum. Dentro deste contexto, propõe-se o controle para a aquisição desses materiais e a verificação e classificação do tipo de resíduo junto aos órgãos e normas competentes, antes de descartá-lo.

2.11.2 Gases

Os gases e vapores devem ser manipulados dentro de capelas ou coifas com segurança de que o ducto condutor os conduza para a atmosfera exterior observando seus limites estabelecidos pela legislação vigente. Gases muito perigosos podem exigir filtros específicos, cortina de água de lavagem ou soluções neutralizantes para borbulhamento. Alguns gases podem exigir estudo especial que conduza a minimização de seu uso, substituindo por menos tóxico ou minimizando de seus efeitos.

2.11.3 Sólidos

A resolução nº. 5 do CONAMA estabelece que os sólidos do grupo B que oferecem riscos a saúde e ao meio ambiente, devem ser enviados para incinerado ou para aterro especial, após a devida análise e autorização do órgão competente. Os que não se enquadrarem nos grupos A (biológicos) B (perigosos) e C (radioativos), podem ser enviados para aterro comum como resíduo doméstico classe D. Muitos sólidos podem ser recuperados, reciclados, revalidados,

exemplos: determinação de unidade em hidróxidos e sais, recristalização de sais, recuperação do título de ácidos minerais, envio de fosfatos, nitratos, sulfatos, carbonetos para usinas de compostagem, troca de sobras de reagentes com outras instituições etc.

2.11.4 Líquidos

Os líquidos aquosos sem metais pesados e/ou fluoretos, podem ser neutralizados e descartados no esgoto ou no solo. Podem ser autoclavados (com cuidados específicos), ou sofrer desinfecção química. (FERREIRA,1996) Se houver metais pesados e/ou fluoretos, estes devem ser precipitados, filtrados secados e o sólido resultante tratado como resíduo da classe B. O filtrado será tratado como líquido aquoso sem metais e/ou fluoretos. (ABNT..1993)

Os líquidos orgânicos devem ser separados por classe (cloretos, não clorados, nitrogenados, combustíveis e cancerígenos) e pode seguir algumas vias em função das características, tais como incineração, recuperação no próprio laboratório, envio para recuperação por empresa especializada (só para quantidades razoáveis). Venda para fornos industriais como combustíveis inativados. Reduzindo a periculosidade (exemplo, reação do fenol com formoldeído, resultando resina).

Para serem incinerados, os solventes devem ser submetidos às exigências da incineradora e do órgão de controle ambiental. Solventes

explosivos, cancerígenos, hepatotóxicos, indutores de discrasias, devem receber rotulagem especial para a devida proteção dos operadores na incineração. Mercúrio metálico: deve ser recolhido em recipientes hermeticamente fechados, mantido sob enxofre e enviado para empresa recuperadora. Soluções contendo berílio, cianetos, bório, devem receber tratamento de inativação segundo prescrições legais e embalagens específicas para descarte em aterro industrial. Deve-se evitar a permanência desses materiais no laboratório. (KAUFMAN, 1990)

2.11.5 Descarte de sangue e fluídos corporais

Todo o sangue humano e fluídos deveriam ser controlados como materiais potencialmente infecciosos e nestes casos as precauções universais deveriam ser utilizadas. O descarte dos artigos contaminados com sangue humano ou fluidos corporais deve ser a incineração.

2.11.6 Reagentes com prazos de validade vencidos

Todo reagente com prazo de validade vencido, perigoso ou não, deverá ter seu frasco acondicionado em saco plástico transparente e ser encaminhado à Comissão de Segurança Interna se houver.

2.11.7 Frascos de reagentes

Todos os recipientes vazios que continham reagentes (garrafas, frascos e sacos) deverão ser lavados em água corrente antes de serem descartados, especialmente se os reagentes em questão tratavam-se de agentes tóxicos ou perigosos. Os rótulos devem ser removidos dos frascos de reagentes antes de descartá-los. Os rótulos só deverão ser removidos após a lavagem dos frascos, garantindo-se que não contenham resíduos que ofereçam risco à saúde. As garrafas ou frascos de vidro não devem ser quebrados para o descarte. Este material deve ser mantido à parte do lixo comum-seco para ser recolhido pelo pessoal de limpeza. Vidrarias quebradas que ofereçam risco de corte devem ser armazenadas nos laboratórios em recipientes apropriados (baldes plásticos ou metálicos). Quando estes recipientes estiverem cheios, a vidraria quebrada deverá ser descartada em um container destinado exclusivamente para este fim.

2.11.8 Contaminação por brometo de etídeo

Todos os géis de agarose ou acrilamida contendo menos de 5 mg/ml de EtBr (a concentração usual é de 0,5 mg/ml) deverão ser descartados nos próprios laboratórios, em baldes contendo dois sacos plásticos. As ponteiros contaminadas com soluções concentradas de EtBr (usualmente de 1 a 10 mg/ml) deverão ser descartadas juntamente com os géis. As soluções concentradas de EtBr (> 0,5 mg/ml) não poderão ser descartadas. Soluções diluídas de EtBr (< 0,5 mg/ml)

deverão ser deixadas em repouso e expostas à luz por três semanas e descartadas na pia, sob intensa água corrente. Para as soluções concentradas observar os procedimentos descritos para descontaminação.

2.11.9 Contaminação por material biológico

Todo material contaminado por vírus, microrganismos, qualquer organismo geneticamente modificado ou derivado biológico que ofereça risco à saúde (sangue, urina, etc) deverá ser auto-clavado ou tratado com solução de hipoclorito ou lisofórmio antes do descarte.

2.11.10 Solventes orgânicos

Misturas contendo fenol, b-mercaptoetanol, álcool isoamílico ou outro solvente tóxico deverão ser descartadas nos próprios laboratórios em garrafas apropriadas. Quando cheias, o conteúdo destas garrafas deverá ser vertido nos tonéis localizados nas capelas de exaustão localizados em locais pré-determinados. Quando estes tonéis estiverem cheios, a Comissão de Segurança deverá ser avisada. As garrafas deverão ser retornadas aos laboratórios, lavadas com etanol e água corrente antes de serem descartadas, ou serem reutilizadas como desprezadores de solventes.

2.11.11 Ponteiras e tubos de microcentrifuga

Todo material contaminado por microrganismos, qualquer organismo geneticamente modificado ou derivado biológico que ofereça risco à saúde (sangue, urina, etc.) deverá ser autoclavado ou tratado com solução concentrada de hipoclorito ou lisofórmio antes do descarte. Todo material que esteve em contato com reagente tóxico deverá ser lavado em água corrente antes de ser descartado no lixo comum. Os tubos de microcentrifuga contaminados com algum solvente tóxico deverão ser lavados com etanol seguido de água corrente antes de serem descartados. Jamais descarte tubos de microcentrifuga (ou outros tubos) fechados contendo solvente orgânico.

2.11.12 Material pontiagudo ou cortante

Todo material pontiagudo ou cortante como, por exemplo, lâminas de bisturi, agulhas, estiletes, etc, deverão ser desprezados em um frasco plástico de paredes grossas e tampa de rosca que cada laboratório deverá providenciar. Este frasco deverá ser identificado, mantido fechado e descartado no lixo comum, com a devida identificação, somente quando estiver completamente cheio. Este material deverá ser descartado em recipiente identificados com o símbolo de infectante, de acordo com a norma NBR 7500 da ABNT com a transcrição das expressões “Infectante” e “material pérfuro-cortante”. Após o fechamento do recipiente do coletor de material pérfuro-cortante, ele deve ser colocado em saco

branco leitoso, padronizado (ABNT-NBR 9190 e NBR: 9191. Neste saco também deve constar o símbolo de infectante (NBR-7500) e aguardar a coleta em separado dos demais resíduos (MINISTÉRIO, 2000)⁵. Todo material contaminado por vírus, microrganismos, qualquer organismo geneticamente modificado ou derivado biológico que ofereça risco à saúde (sangue, urina, etc.) deverá ser autoclavado ou tratado com solução de hipoclorito ou lisofórmio antes do descarte.

2.11.13 Classificação

Um resíduo químico é considerado de risco quando listado especificamente em publicações dos órgãos oficiais de controle, nacionais e internacionais.

2.11.13.1 Resíduo que possa servir como fonte de ignição

Um líquido que tenha o ponto de fulgor de menos que 140°C. Um sólido capaz de causar fogo por fricção ou absorção de umidade ou que sofre mudanças químicas espontâneas que resultem em queima vigorosa e persistente.

2.11.13.2 Resíduos corrosivos

Soluções aquosas de pH menor ou igual a 2 ou maior ou igual a 12,5.

⁵ Ministério da Saúde: Controle de infecções e a prática Odontológica em tempos de AIDS,2000.

2.11.13.3 Resíduos reativos

Soluções aquosas de materiais instáveis que sofram mudanças químicas violentas sem detonação, possam reagir violentamente com água formando misturas potencialmente explosivas ou que possam gerar gases perigosos ou possivelmente letais. Materiais detonantes ou explosivos também se incluem nesta classe.

2.11.13.4 Resíduo tóxico

Resíduo que contém um dos seus componentes em concentrações iguais ou maiores que os valores das tabelas de concentração máxima de resíduos tóxicos.

Os resíduos químicos também podem ser classificados como resíduos de processo ou descarte de materiais químicos comerciais. Esta distinção é importante na rotulagem. Um resíduo de processo é aquele que em virtude de algum uso, processo ou procedimento, não atende as especificações originais do fabricante. Exemplos: efluentes de colunas cromatográficas, produtos diluídos, misturas reacionais, papéis contaminados.

Um produto comercial (nunca processado) deve ser descartado no frasco original. Exemplos: pequenos frascos de produtos antigos nunca utilizados de laboratórios, áreas de serviço.

Mesmo que um resíduo de laboratório não se enquadre em nenhuma destas classes ou esteja listado nas tabelas deve haver regras específicas de descarte definidas no âmbito da própria instituição.

2.11.14 Classificações específicas de resíduos

- Soluções de formol ou formaldeído: Soluções diluídas devem ser estocadas segundo critérios específicos definidos por órgãos oficiais ou no plano interno da instituição. O formaldeído é um agente suspeito de provocar câncer com baixos índices de exposição permitida e poucos sintomas de advertência.
- Soluções de brometos de etídio: São agentes mutagênicos em altas concentrações. Soluções muito diluídas devem ser descartadas com descargas em vasos sanitários ou linhas de esgoto especiais. A concentração máxima para a execução destes procedimentos é de 5 ppm. Não diluir as soluções propositadamente para atingir este valor.
- Géis de brometo de etídio - coletar em sacos plásticos duplos. O descarte deve ser feito segundo normas específicas de órgãos oficiais ou da própria instituição.
- Líquidos que sejam fontes de ignição e solventes orgânicos: Manter separados de solventes halogenados de solvente não-halogenados se

possível. Separar os solventes orgânicos de soluções aquosas quando possível. Manter os solventes acidificados separados de outros solventes e resíduos ácidos.

- Ácidos, bases e soluções aquosas: Não misturar ácidos inorgânicos fortes ou oxidantes com compostos orgânicos. Manter ácidos, bases e soluções aquosas contendo metais pesados separados de outros resíduos. Evitar misturar ácidos e bases concentradas num mesmo recipiente.

- Soluções contendo mercúrio: manter estes resíduos separados de todos os outros.

- Materiais corrosivos: os resíduos de ácido nítrico em concentrações superiores a 40%, ácido perclórico, peróxido de hidrogênio em concentração superior a 52% em peso, ácido nitroclorídrico; não devem ser misturados a quaisquer outros em nenhuma circunstância. Estes líquidos devem ter recipientes especiais para seu descarte.

- Resíduos tóxicos: verificar as tabelas e seguir os procedimentos específicos de descarte.

- Resíduos muito tóxicos: procedimentos especiais definidos por órgãos oficiais ou no plano de higiene química da instituição.

- Resíduos de amianto: devem ser fixados em aglomerantes naturais ou artificiais como, cimento, plástico, asfalto ou resinas. Seguir procedimentos definidos pela instituição. (MICHIGAN STATE ...2001)

2.11.15 Eliminação de resíduos de laboratório

Os produtos químicos de laboratório são geralmente resíduos de caráter especial. A eliminação de tais resíduos deve ser cuidadosa observando-se as leis físicas válidas em seu correspondente estado (ou forma). Recomenda-se sempre o contato com órgão responsável ou com o responsável no programa de higiene química da instituição.

2.11.16 Classificação dos recipientes

A. Solventes orgânicos e soluções de substâncias orgânicas que não contenham halogênios.

B. Solventes orgânicos e soluções orgânicas que contenham halogênios.

C. Resíduos sólidos de produtos químicos orgânicos que são acondicionados em sacos plásticos ou barricas originais do fabricante.

D. Soluções salinas; nestes recipientes deve-se manter o pH entre 6 e 8.

E. Resíduos inorgânicos tóxicos, por exemplo, sais de metais pesados e suas soluções; descartar em frascos resistentes ao rompimento com identificação clara e visível (consultar padrão de sua instituição ou legislação específica).

F. Compostos combustíveis tóxicos; em frascos resistentes ao rompimento com alta vedação e identificação clara e visível.

G. Mercúrio e resíduos de seus sais inorgânicos.

H. Resíduos de sais metálicos regeneráveis; cada metal deve ser recolhido separadamente.

I. Sólidos inorgânicos.

2.11.17 Recolhimento e desativação de resíduos de laboratório

A finalidade destas indicações é transformar produtos químicos ativados em derivados inócuos para permitir o recolhimento e eliminação segura.

Ao se manejar produtos químicos de laboratório e principalmente ao se desativar produtos químicos deve-se ter a máxima precaução, visto que são muitas vezes reações perigosas. Todos os trabalhos devem ser executados por pessoal habilitado com o uso de roupas e material de proteção adequada a cada finalidade. Insiste-se para que a inativação seja feita em escala reduzida, podendo-se fazer adaptações.

A seguir são indicados métodos de eliminação e desativação de produtos de laboratório.

1. Solventes orgânicos isentos de halogênios - Recipiente Coletor A.
2. Solventes orgânicos contendo halogênios - Recipiente Coletor B.

3. Reagentes orgânicos relativamente inertes, do ponto de vista químico, recolhidos no recipiente coletor A. Se contiverem halogênios no Coletor B. Resíduos sólidos no Coletor C.

4. Soluções aquosas de ácidos orgânicos são neutralizadas cuidadosamente com bicarbonato de sódio ou hidróxido de sódio - Recipiente Coletor D. Os ácidos carboxílicos aromáticos são precipitados com ácido clorídrico diluído e filtrados. O precipitado é recolhido no Coletor C e a solução aquosa no Coletor D.

5. Bases orgânicas e aminas na forma dissociada - Recipiente Coletor A ou B. Recomenda-se freqüentemente, para se evitar maiores odores, a cuidadosa neutralização com ácido clorídrico ou sulfúrico diluído.

6. Nitritos e mercaptanas são oxidados por agitação por várias horas (preferivelmente à noite) com solução de hipoclorito de sódio. Um possível excesso de oxidante é eliminado com tiosulfato de sódio. A fase orgânica é recolhida no recipiente A ou B e a fase aquosa no recipiente D.

7. Aldeídos hidrossolúveis são transformados com uma solução concentrada de hidrogenossulfito de sódio a derivados de bissulfitos. Recipiente Coletor A ou B.

8. Compostos organometálicos, geralmente dispersos em solventes orgânicos, sensíveis a hidrólise, são gotejados cuidadosamente sob agitação em n-butanol na capela. Agita-se durante a noite e se adiciona de imediato um

excesso de água. A fase orgânica é recolhida no Coletor A e a fase aquosa no recipiente D.

9. Produtos cancerígenos e compostos combustíveis, classificados como tóxicos ou muito tóxicos - Recipiente Coletor F.

10. Peróxidos orgânicos são destruídos e as fases orgânicas colocadas no recipiente A ou B e aquosa no recipiente D.

11. Halogenetos de ácido são transformados em ésteres metílicos usando-se excesso de metanol. Para acelerar a reação pode-se adicionar algumas gotas de ácido clorídrico. Neutraliza-se com solução de hidróxido de potássio. Recipiente Coletor B.

12. Ácidos inorgânicos são diluídos em processo normal ou em alguns casos sob agitação em capela adicionando-se água. A seguir neutraliza-se com solução de hidróxido de sódio. Recipiente Coletor D.

13. Bases inorgânicas são diluídas como ácidos e neutralizadas com ácido sulfúrico. Recipiente Coletor D.

14. Sais inorgânicos - Recipiente Coletor I. Soluções - Recipiente Coletor D.

15. Soluções e sólidos que contém metais pesados - Recipiente Coletor E.

16. No caso de sais de tálio, altamente tóxicos e suas soluções aquosas é necessário precaução especial - Recipiente Coletor E. As soluções são

precipitadas com hidróxido de sódio (formam-se óxidos de tálio) com condições de neutralização.

17. Compostos inorgânicos de selênio - Recipiente Coletor E. O selênio elementar pode ser recuperado oxidando-se os concentrados em capela com ácido nítrico concentrado. Após a adição de hidrogenossulfito de sódio o selênio elementar é precipitado. Recipiente Coletor E.

18. No caso de berílio e sais de berílio (altamente cancerígenos) recomenda-se precauções especiais. Recipiente Coletor E.

19. Compostos de urânio e tório devem ser eliminados conforme legislação especial.

20. Resíduos inorgânicos de mercúrio - Recipiente Coletor G.

21. Cianetos são oxidados com hipoclorito de sódio, preferencialmente à noite. O excesso de oxidante é destruído com tiosulfato. Recipiente Coletor D.

22. Peróxidos inorgânicos são oxidados com bromo ou iodo e tratados com tiosulfato de sódio. Recipiente Coletor D.

23. Ácido fluorídrico e soluções de fluoretos inorgânicos são tratadas com carbonato de cálcio e filtra-se o precipitado. Sólido - Recipiente Coletor I e solução aquosa - Recipiente Coletor D.

24. Resíduos de halogênios inorgânicos, líquidos e sensíveis à hidrólise são agitados na capela em solução de ferro e deixados em repouso,

durante a noite. Neutraliza-se com solução de hidróxido de sódio. Recipiente Coletor E.

25. Fósforo e seus compostos são muito inflamáveis. A desativação deve ser feita em atmosfera de gás protetor em capela. Adiciona-se 100 ml de solução de hipoclorito de sódio 5% contendo 5 ml de hidróxido de sódio 50%, gota a gota. Em banho de gelo, à substância que se quer desativar. Os produtos de oxidação são precipitados e separados por sucção. Precipitado - Recipiente Coletor I e solução aquosa - Recipiente Coletor D.

26. Metais alcalinos e amidas de metais alcalinos, bem como os hidretos, decompõem-se explosivamente com a água. Por isso estes compostos são colocados com a máxima precaução em 2-propanol, em capela com tela protetora e óculos de segurança. Se a reação ocorrer muito lentamente pode-se acelerar com adição cuidadosa de metanol. Em caso de aquecimento da solução alcoólica deve-se interromper o processo de destruição da amostra. Obs. Nunca esfriar com gelo, água ou gelo seco. Recomenda-se deixar em repouso durante a noite, diluindo-se no dia seguinte com um pouco de água e neutralizando-se com ácido sulfúrico. Recipiente Coletor A.

27. Os resíduos que contenham metais preciosos devem ser recolhidos no recipiente Coletor H para reciclagem. Solução aquosa - Recipiente Coletor D.

28. Alquilas de alumínio são extremamente sensíveis à hidrólise. Para o manejo seguro destes recomenda-se o uso de seringa especial. Deve-se colocar se possível no frasco original ou no Recipiente Coletor F.

Para que tais resíduos de laboratório possam ser eliminados de forma adequada é necessário ter-se à disposição recipientes de tipo e tamanho adequados. Os recipientes coletores devem ter alta vedação, serem confeccionados de material estável e em alguns casos serem combustíveis. Deve-se colocar em local ventilado principalmente quando contiverem solventes. Nos recipientes C, E e I os resíduos são colocados em embalagens separadas devendo ser de plástico resistente ao rompimento. Para se proteger de danos no transporte é necessário se utilizar material de amortecimento. Os líquidos derramados podem ser absorvidos facilmente com Chemizorb granulado ou em pó ou equivalente. Na falta deste pode-se usar uma mistura de areia, resíduos de cerâmica porosa e bicarbonato de cálcio.

Os recipientes coletores devem ser caracterizados claramente de acordo com o seu conteúdo, o que também implica em se colocar símbolos de periculosidade.

Deve-se lembrar que aqui são descritas regras gerais, que devem ser utilizadas como apoio, mas recomenda-se que antes da produção de qualquer resíduo se faça um planejamento específico.

Para se eliminar resíduos de laboratório é freqüentemente necessário inativá-los.

2.11.18 Descarte de material biológico

Os resíduos infectantes ou infecciosos gerados em laboratórios são aqueles que contém patógenos em quantidade e virulência tais que a exposição aos mesmos, de hospedeiro suscetível, pode resultar em uma doença infecciosa.

Para descarte de materiais contaminados, em geral adota-se algum sistema ou critério de identificação e separação, incluindo-se as respectivas embalagens, tais como:

Lixo não contaminado que pode ser eliminado juntamente com lixo comum;

1- material contaminado para autoclavagem e reciclagem;

2- material contaminado para descarte;

3- objetos contundentes, tais como agulhas de injeção, bisturis, facas, cacos de vidro;

4- lixo anatômico, ou seja, tecidos humanos ou de animais.

* Todo material deve ser autoclavado antes de se tentar qualquer limpeza ou reparo.

Materiais contaminados para descarte definitivo

Todas as culturas e materiais contaminados normalmente devem ser autoclavados em embalagens a prova de vazamento, ou seja, em sacos plásticos autoclaváveis que possam ser identificados (coloração codificada), antes de serem eliminados. Após a autoclavagem, o material poderá ser colocado em recipientes destinado ao transporte até o incinerador ou outro tratamento de lixo.

Em cada posto de trabalho devem existir frascos, recipientes descartáveis, preferencialmente inquebráveis (ex. plásticos resistentes) contendo um desinfetante apropriado e preparado no próprio dia. Após prazo mínimo de 18 horas de mergulho completo dos materiais sólidos contaminados, estes devem ser retirados para fins de incineração ou autoclavagem e resíduo do desinfetante dispensados na pia. Se forem materiais recicláveis, antes de voltarem a ser utilizados devem ser lavados e re-esterilizados. (TEIXEIRA, 1998)

A incineração com método de escolha para o tratamento definitivo do lixo contaminado, inclusive de carcaças de animais de laboratório, de preferência após serem autoclavados. A incineração do lixo contaminado depende da aprovação pelas autoridades responsáveis pela saúde pública e pela poluição do ar, de ser aprovado pela comissão de biossegurança. Caso contrário outras alternativas de senso comum devem ser procuradas.

As agulhas não devem ser recapeadas, ou retiradas das seringas descartáveis. Agulha e seringa devem ser colocadas em caixa de paredes impenetráveis: essas caixas não devem estar completamente cheias. Quando

cheias até três quartos de sua capacidade, serão colocados em recipientes para "lixo contaminado" e incineradas. Poderão ser autoclavadas previamente, conforme a exigência da rotina do laboratório. As seringas descartáveis, quando usadas isoladamente e sem agulha, serão colocadas em recipientes próprios e depois incineradas, com ou sem autoclavagem prévia (GRIST,1995).

2.12 Procedimentos de Emergência

2.12.1 Quebra de Frasco e Derrame de Líquido

Jogar imediatamente granulado absorvente (no mercado existem vários fornecedores), juntando depois todo o resíduo em saco plástico, e solicitar a presença do serviço de segurança para providenciar o descarte.

2.12.2 Quebra de Grande Quantidade de Frascos e Derrame de Grande Volume de Líquido

Isolar imediatamente a área atingida. Ventilar naturalmente, abrindo portas e janelas. Eliminar fontes de calor. Lançar imediatamente sobre o líquido areia ou granulado absorvente, em quantidade suficiente, e solicitar a presença do serviço de segurança para providenciar o descarte.

2.12.3 Regras Específicas para Derramamentos

2.12.3.1 Derramamento de sangue humano

Usar luvas e avental para limpar derramamento. Se recipiente quebrado estiver presente, usar fórceps para apanhar e acondicionar no recipiente específico para o material contaminado. Absorver o sangue com toalhas de papel e descartar no recipiente para descarte de material contaminado. Usando uma solução de detergente, limpar o local de derramamento de todo sangue visível. Esfregar o local de derramamento com toalhas de papel saturadas em um desinfetante como alvejante diluído 1:10 (vol/vol). Descartar todo o material contaminado em recipiente de material contaminado. Lavar mãos com sabão e água.

2.12.3.2 Derramamento de material em NB-1

Após calçar luvas e avental, o frasco quebrado deve ser apanhado com uma pinça ou fórceps e colocado no recipiente específico para vidros quebrados. O derramamento deve ser absorvido com toalhas de papel ou outro material absorvente. O materiais contaminados deve ser descartado no recipiente específico para material contaminado. A área de derramamento deve ser esfregada com um desinfetante na diluição efetiva apropriada contra o organismo. Autoclavar todas as toalhas, luvas, e outros materiais usados para limpar o derramamento. As mãos devem ser lavadas com sabão e água.

2.12.3.3 *Derramamento de material em NB-2*

Manter uma pessoa do grupo de trabalho cuidado para evitar o acesso de outros trabalhadores e evitar a propagação do material derramado para fora do ambiente. Se necessário sinalizar a contaminação. Remover a roupa contaminada e acondicioná-la em uma bolsa de material contaminado para desinfecção. Lave mãos e pele exposta e informe ao responsável o ocorrido. Vista roupa protetora novamente e pegue o material necessário (desinfetante, recipiente para autoclave, pinças, toalhas de papel para efetuar a limpeza). Cubra o derramamento com toalhas de papel e algum desinfetante adequadamente diluído. Depois de pelo menos 20 minutos, apanhe as toalhas de papel e re-esfregue a área de derramamento com desinfetante diluído. Junte todo material e recipiente de descarte de material contaminado e autoclave. Lave mãos com sabão e água.

2.12.3.4 *Derramamento de um material em NB-3*

Suspensão imediata de toda atividade. Evitar inalar o material aerotransportado enquanto abandona-se o laboratório. Avisar ao resto da equipe para sair do ambiente Sinal de advertência. Remover roupa a contaminada, e colocar em uma bolsa de material contaminado. Lavar as mãos com sabão e água. Notificar ao pesquisador principal. Esperar 30 minutos para aerossóis dispersarem antes de reentrar o laboratório para começar limpeza total. Vestir

equipamento de proteção pessoal, mais o material necessário à limpeza e acondicionamento do material. Conter o derramamento com toalhas de papel absorventes ou blocos disponíveis. Cuidadosamente adicionar alvejante de cloro a 10% ao derramamento; evitar criar aerossóis ao verter o desinfetante. Deixar o ambiente e esperar 30 minutos para o alvejante a inativar o material. Apanhar copo quebrado com fórceps e descartar em recipiente de quebrados. Limpar o líquido com toalhas de papel e juntar todo material contaminado em recipiente apropriados. Limpar novamente a área com um desinfetante apropriado. Autoclavar (ou saturar em solução de 10% de desinfetante) todo o material utilizado na limpeza. Lavar as mãos com sabão e água.

2.12.3.5 Derramamento em cabine de segurança biológica

Deixar a cabine ligada. Calçando luvas, esfregar as paredes e o equipamento com um desinfetante como por exemplo, etanol a 70%. Esperar uns 20 minutos. Saturar encima do derrame o desinfetante com toalhas de papel. Desinfetar todos os artigos que podem ter sido respingados antes de removê-los da cabine. Descartar todos os materiais de limpeza. Lavar as mãos e a pele exposta com sabão e água.

2.12.3.6 *Derramamento de material radioativo biológico*

Um derramamento que envolve materiais radioativos e biológicos requer procedimentos de emergência diferentes dos procedimentos usados para qualquer material isolado. Como regra geral, utilize um desinfectante químico para o microrganismo e então disponha o material contaminado numa embalagem apropriada e etiquetada com o a identificação do radioisótopo que está misturado ao microrganismo quimicamente desinfetado. Não use soluções desinfetantes em materiais que contêm iodo radiativo, porque gás de iodo radioativo pode ser libertado. Durante a desinfecção do material biológico utilizar procedimentos de proteção contra material radioativo. Antes de qualquer limpeza total, considerar o tipo de material radiativo, as características do microrganismo, e o volume do derramamento. Informar-se para os procedimentos de limpeza total de radioisótopo específicos. Não usar soluções alvejantes em materiais que contenham iodo radioativo. Gás pode ser libertado, ao invés, usar um desinfetante alternativo como um iodofor.

2.13 Segurança em Ambientes de Laboratórios

O ambiente de laboratório deve ser projetado, dimensionado ou adequado devidamente, de modo oferecer condições confortáveis e segurança de trabalho. As áreas de trabalho devem ser definidas de modo a separar as de maior risco (manipulação de produtos químicos e biológicos) daquelas que

apresentam menor probabilidade de acidentes (área administrativa). O ambiente de laboratório também deve oferecer condições adequadas de iluminação, ventilação, temperatura, umidade, circulação e outras que permitam a realização do trabalho de forma confortável e produtiva.

A organização essencial e funcional do laboratório deve também prever o mobiliário, as barreiras de controle, as comunicações, o tratamento acústico, as linhas de serviços (gás, água, vácuo, ar comprimido, vapor, eletricidade, esgoto sanitário), equipamentos de combate a incêndio entre outras instalações.

As áreas do ambiente de laboratório devem ser adequadamente sinalizadas de forma a facilitar a orientação dos usuários, alertar quanto aos riscos existentes e restringir o acesso de pessoas não autorizadas. As cores e símbolos recomendados para uso nas áreas de laboratório são regulamentadas pela NR-26 do Ministério do Trabalho. Devem ser utilizados os símbolos identificando as áreas de: (1) risco biológico: agentes potencialmente patogênicos - vírus, bactérias, fungos, leveduras, protozoários, organismos geneticamente modificados (OGMs), que podem causar infecções graves: (2) risco químico: produtos explosivos, inflamáveis, corrosivos, irritantes, tóxicos e cancerígenos, que causam lesões graves e intoxicações, por vezes irreversíveis: (3) riscos físicos: radiações ionizantes e não-ionizantes, ruídos, vibrações, ultra-som, temperaturas extremas, e outros. Cuidados devem ser tomados quando aos riscos ergonômicos (postura inadequada, ritmo intenso e períodos prolongados de trabalho, situação de estresse, entre outros) que seriamente causam desgaste físico e mental,

instabilidade emocional, depressão. Precauções também devem ser tomadas para evitar os riscos de acidentes, que podem gerar lesões temporárias, definitivas e até mesmo a morte.

O uso de equipamentos de proteção individual e coletiva é fundamental para a execução das atividades laboratoriais de forma a assegurar a saúde do profissional e minimizar a possibilidade de acidentes.

Um aspecto de segurança extremamente importante no ambiente laboratorial é, o armazenamento de substâncias químicas e materiais diversos no interior do laboratório, recomendável que o laboratório disponha de local adequado para armazenamento, seguindo as orientações de organização que considere a compatibilidade entre os produtos químicos. Para grandes quantidades, os produtos químicos e materiais devem ser armazenados em almoxarifados muito bem organizados e administrados por pessoal qualificado. Assim, os laboratórios se isentam da responsabilidade do armazenamento de substâncias, na sua grande maioria, corrosivas, inflamáveis e combustíveis que podem gerar situações emergenciais, levando perigo às instalações e aos usuários e a comunidade, em geral. Cabe lembrar que acidentes e incêndios em laboratórios podem ser causados pela incompatibilidade entre muitos materiais e produtos químicos.

A sinalização dos materiais de combate a incêndio (extintores e hidrantes), das saídas de emergências e das rotas de fuga em situações de

emergência, também devem ser indicados nos ambientes laboratoriais e nos corredores de acesso.

O ambiente de laboratório em que se manipulam agentes infecciosos deve ser adequadamente organizado, construído e ter mecanismos de contenção específicos de acordo com a classe de risco biológico.

A segurança em ambientes de laboratório deve ser objeto de ensino e treinamento profissional permanente, a fim de que a equipe do laboratório e de apoio esteja sempre consciente dos riscos a que estão expostos e da importância das medidas de segurança.

A segurança nos ambientes da área de saúde deve ser planejada, dimensionada e realizada por uma equipe multiprofissional, de modo a atender vários requisitos relacionados com:

1. O cumprimento das normas de segurança vigentes;
2. A disponibilidade e uso adequado de equipamentos de proteção;
3. A organização e realização de programas de treinamento;
4. A manutenção preventiva de equipamentos e instrumentação;
5. A disponibilidade de extintores e outros dispositivos de combate a incêndio;
6. O treinamento de combate a incêndio e em situações de emergência;

7. A sinalização adequada das áreas de risco e das rotas de fuga;
8. A disponibilidade de sistema de geração elétrica de emergência;
9. O planejamento e execução do programa de prevenção de riscos ambientais;
10. Os planos de contenção quando ocorrem situações de emergência (derramamentos, vazamentos, contaminações, explosões, etc);
11. Os planos de emergência para enfrentar situações críticas como falta de energia elétrica, igual incêndio e inundações;
12. O sistema de registro dos testes de segurança e desempenho dos equipamentos é importante lembrar que, grande parte dos acidentes envolvendo profissionais da área de saúde se deve a não observância e obediência às normas de segurança. Devido à exposição direta a agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e leveduras) e substâncias químicas, esses profissionais são alvo de infecções ocupacionais e intoxicações graves. Entretanto, o emprego de práticas seguras e o uso de equipamentos de proteção adequados reduzem significativamente o risco de acidente ocupacional. Riscos em ambientes da área de saúde (BRASIL...1995)⁶

Os riscos são condições que apresentam um determinado potencial para a existência de danos, doença ou prejuízo de uma instituição. Esses danos

⁶ BRASIL, Ministério do Trabalho, Norma regulamentadora nº. 26 (NR-26)

constituem lesões. As pessoas, danos a equipamentos, a instalações, ao meio ambiente, a perda de material e redução da capacidade produtiva.

Os riscos são classificados em físicos, químicos, biológicos, ergonômicos e riscos de acidentes. No ambiente de saúde os riscos mais freqüentes são os físicos, químicos e biológicos.

Os principais agentes físicos presentes nos laboratórios ligados à saúde, são o calor e as radiações ionizantes e não-ionizantes. O calor é uma forma de energia que é transmitida por radiação, condução e convecção. O calor é utilizado nas operações de limpeza, desinfecção e esterilização de materiais e instrumentos, é também utilizado nos laboratórios de análise e de pesquisa para esterilização de soluções, reagente, meios de cultura e materiais. Em ambiente hospitalar, o calor é usado para o aquecimento dos cirúrgicos, ambiente (incubadoras) e em alguns tipos de tratamentos.

As radiações ionizantes são utilizadas, na área de saúde, fins diagnósticos e terapêuticos. No ambiente hospitalar, com riscos da radiação ionizante se localizam nas áreas de radiação e diagnóstico e radioterapia, incluindo os centros cirúrgicos e unidades de terapia intensivas. Vários cuidados e precauções devem ser tomados para evitar a exposição às radiações ionizantes, que são deletérias. Sistemas de contenção, sinalização, orientação e uso de EPI específicos de radioproteção devem ser disponibilizados nos serviços hospitalares. No ambiente laboratorial, também devem ser seguidas as normas de segurança para a manipulação o descarte de materiais radioativos, sinalização

da área de risco, uso de equipamentos de radioproteção e dosímetros para avaliação periódica.

As radiações não ionizantes usualmente utilizadas em ambientes de saúde, são: (1) a radiação ultravioleta (UV) para a esterilização: (2) a radiação infravermelha empregada em fisioterapia e em procedimentos cirúrgicos na forma de LASER. Esses tipos de radiação causam queimaduras graves na pele e nos olhos. (TEIXEIRA, 1996)

Os principais agentes químicos que oferecem risco nos ambientes de saúde são os produtos químicos utilizados na limpeza, desinfecção e esterilização e os quimioterápicos. No ambiente laboratorial, os riscos químicos mais comuns são os agentes químicos utilizados na esterilização, que podem causar irritações dos olhos, da pele e mucosas.

O óxido de etileno, utilizado na esterilização de materiais, de um gás incolor e potencialmente perigoso por ser inflamável e explosivo. O glutaraldeído e o formaldeído em solução são líquidos utilizados na esterilização de materiais específicos e sensíveis ao calor, são produtos tóxicos que causam irritação profunda dos olhos, pele e mucosas. Os compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo (hipoclorito de sódio) são potentes desinfetantes utilizados em recipientes para descarte de materiais, para desinfecção de superfícies em geral e superfícies contendo sangue e outros fluídos corpóreos. Outros produtos químicos também utilizados na desinfecção são: cloramina (libera cloro), iodo e compostos contendo iodo, peróxido de hidrogênio (água oxigenada), álcool e

misturas contendo álcool, e compostos a base de fenol. Esses produtos químicos são, de um modo geral, altamente corrosivos e potencialmente tóxicos, podendo causar lesões graves na pele e danos sérios aos equipamentos de laboratório. Portanto, na sua preparação e uso devem ser utilizados os equipamentos de proteção individual (luvas, máscaras, óculos de proteção, aventais, e outros) e coletiva, devendo ser estritamente seguidas às boas práticas de laboratório. O uso do fenol como agente desinfetante não são mais recomendados devido aos seus efeitos corrosivos e tóxicos, pois é facilmente absorvido pela pele, causando queimaduras graves. (GRIST, 1995)

Regras de segurança para o pessoal da limpeza devem ser adotadas:

- Utilizar sempre material de proteção adequado de acordo com a orientação do pesquisador responsável;
- Despojar-se desta roupa sempre que sair do laboratório para ir a outra parte do prédio;
- Não comer, não fumar no interior do laboratório;
- Em caso de acidente, quebra acidental, avisar imediatamente o responsável pela biossegurança, o chefe da equipe de limpeza ou algum membro do laboratório;
- Não limpar as mesas de trabalho sem autorização;
- Não procurar reparar as conseqüências de um acidente sem autorização do pessoal do laboratório;

- Não entrar em nenhum local em cuja porta haja a sinalização de acesso restrito (risco biológico ou de radiação);
- Não esvaziar nenhum recipiente ou material de resíduo a menos que haja instruções indicando o que deve ser feito (SOUZA,1999).

2.14 Biossegurança Específica em Laboratórios de DNA

No que tange a biossegurança específica em laboratórios de DNA forense, além de todos os aspectos quanto a riscos físicos, químicos, biológicos, ergonômicos e de acidentes, há a necessidade de cuidados de biossegurança no sentido de preservar a integridade e pureza das amostras. O material utilizado para exame muitas vezes é conseguido em mínimas quantidades e sua má utilização pode inviabilizar novo procedimento pericial. Para tanto medidas especiais quanto a distribuição do espaço físico devem ser tomadas no sentido de evitar o diminuir a possibilidade de contaminação das amostras nas diversas fases do procedimento de análise.

A área de recebimento das amostras deve ser isolada de qualquer área de procedimentos. Somente amostras relacionadas com o exame em questão deveriam ser manipuladas em tal local. As técnicas de ampliação são muito sensíveis e há o risco de contaminação do material a ser analisado. A pessoa que recebe as amostras deve calçar luvas e avental, acondicionar o material em

recipientes adequados, manter refrigerado as espécies congeladas entre – 20° a - 70°. (McCREEDY, 1993)

Enquanto as amostras são preparadas, os reagentes refrigerados podem ser removidos do refrigerador e deixados para ficar na temperatura ambiente. As amostras devem ser preparadas com cuidados de biossegurança quanto a aerossóis. Sangue, urina, e outros fluídos biológicos devem ser preparados sob uma coifa de fluxo laminar. Luvas devem ser usadas durante todas as fases de preparação e devem ser trocadas freqüentemente. É de boa conduta usar duas luvas e descartar a que entrou em contato com o espécime potencialmente contaminado. Sobre mangas descartáveis podem ser úteis quando se trabalha sob a coifa de fluxo laminar. As centrífugas devem ser providas de rotores com compartimento para captura de aerossóis e proteger a equipe contra patógenos vaporizados. Alternativamente centrífugas com tubos selados com anéis tipo *O-ring* podem ser utilizados. Fluídos sobrenadantes devem ser aspirados, não decantados, para dentro de recipientes que contenham alvejante. As amostras de sangue contidas em tubos de vácuo (*vacutainer*) devem ser abertas sob coifa e protegidas com gaze para prevenir a contaminação das luvas ou a exposição do técnico a patógenos em potencial em caso de quebra do recipiente. Sempre que possível, pipetas plásticas descartáveis devem ser utilizadas.

Na parte do laboratório de preparo das amostras para exame, somente o pessoal envolvido no procedimento deve ter acesso. Este pessoal deve usar luvas e aventais que devem ser removidos sempre que sair deste ambiente. Para

manter um fluxo de trabalho unidirecional, a equipe deve iniciar o trabalho do dia nesta área antes de se mover para a área de amplificação e análise. Em laboratórios comerciais a equipe pode rodar, isto é, o trabalho é feito o dia todo na mesma área e ser trocado por outra atividade no dia seguinte. Esta medida diminui o trânsito entre a área de pré-amplificação e pós-ampliação e ajuda a evitar erros associados ao trabalho rotineiro de efetuar sempre as mesmas tarefas. (PERSING, 1993)

Há várias estratégias para evitar a contaminação e os resultados falso-positivos. Para prevenir este tipo de contaminação, uma completa separação física entre os espaços pré PCR e pós PCR. (HERRMANN, 1994)

Os reagentes devem ser preparados cuidadosamente em ambiente separado e testados em seu nível de contaminação. Se forem utilizados *kits* comerciais, o controle de qualidade e produção é feito pelo fabricante. Pequenas quantidades de reagentes devem ser mantidas no laboratório de preparação. Os reagentes devem ser armazenados corretamente etiquetados e com seu prazo de validade em condições adequadas no laboratório de preparo de reagentes.

No preparo das amostras deve ser utilizado cabines de segurança biológica para prevenir a formação de aerossóis. Sangue, urina e outros fluídos corporais devem ser manipulados sob fluxo laminar. (McCREEDY, 1993)

2.15 Boas Práticas de Biossegurança

- Devem ser estabelecidos e implementados procedimentos institucionais para assegurar adequado controle da saúde e da segurança das pessoas envolvidas no trabalho;
- Devem ser providenciadas instruções, por escrito, e treinamento de pessoal antes do início de qualquer atividade no laboratório;
- Pessoas estranhas à rotina de trabalho não devem ser admitidas às instalações;
- A equipe de limpeza deve ser adequadamente treinada;
- A área de trabalho será mantida limpa e organizada;
- Um manual de procedimentos de biossegurança e de emergência e fichas de emergência com as rotinas para casos de acidentes, emergências, desinfecção, descarte de resíduos devem ser confeccionadas específicas ao trabalho desenvolvido na unidade;
- Devem ser providenciadas instalações adequadas (pias, chuveiros, sala para a troca de roupa) e roupas de proteção (uniformes, jalecos de laboratório, etc.), e assegurar uma higiene pessoal adequada;
- É proibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos e pipetar com a boca;

- O trabalho de análise forense somente deve ser executado em instalações adequadas;
- Antes de qualquer descarte, os resíduos devem ser inativados, e o tratamento de efluentes deve seguir as normas específicas;
- A adição de material a um sistema, a coleta de amostras e a transferência de líquido de cultura dentro ou entre sistemas deve ser conduzida de forma a minimizar o risco de exposição dos trabalhadores a contaminantes ou a produtos tóxicos;
- Procedimentos de primeiros socorros por escrito;
- Deve ser estabelecido um plano de emergência, incluindo medidas adequadas para conter e neutralizar derramamentos;
- Relação de todos os telefones de emergência em local visível e de trânsito constante;
- Derramamentos ou acidentes devem ser imediatamente relatados ao responsável pelo laboratório ou instalação;
- Avaliação médica, observação e tratamento devem ser providenciados conforme necessário, e relatórios por escrito devem ser elaborados e arquivados;
- O símbolo universal de biossegurança deve ser afixado nos sistemas fechados e em equipamentos de contenção primário;

- Qualquer derramamento ou acidente que resulte na exposição ao material ou produtos deve ser comunicado imediatamente ao pesquisador principal;
- Os sistemas fechados e equipamentos de contenção, serão localizados em área controlada com as seguintes características:
 - A área controlada terá uma entrada separada. Deve possuir um espaço com duas portas, como uma ante-câmara pressurizada, ante-sala ou sala para troca de roupa, separando a área controlada do resto das instalações;
 - A superfície das paredes, tetos e o pavimento da área controlada devem permitir acesso fácil para limpeza e descontaminação;
 - Eventuais perfurações na área controlada devem ser seladas para permitir descontaminação do ambiente com líquido ou gases;
 - Os encanamentos e fiação na área controlada devem ser protegidos contra a contaminação;
 - Instalações para lavar as mãos, equipadas com válvulas acionadas com o pé, cotovelo ou com sistema automático de abertura devem estar presentes em cada

área principal de trabalho, próximo de cada saída principal. Além disso, chuveiro deve estar disponível perto da área controlada;

- A área controlada deve ser planejada de forma a impedir a saída de líquido de cultura para o exterior em caso de derramamento acidental, saída dos sistemas fechados ou dos equipamentos de contenção primária;
- A área controlada deve ter sistema de ventilação capaz de controlar o fluxo do ar. Este deve vir de áreas com menor potencial de contaminação em direção a áreas com maior potencial de contaminação;
- Se o sistema de ventilação resultar em pressão positiva, o sistema deve ser planejado de forma a impedir a reversão do fluxo, ou terá um alarme que indicará tal reversão eventual. O ar que sair da área controlada não deve recircular em outras instalações, devendo ser filtrado por meio de filtros HEPA;
- A entrada de pessoas na área controlada deve ocorrer pelo sistema de ante-câmara pressurizada, pela ante-sala ou sala de troca de roupa;

- Durante as operações de trabalho na área controlada o acesso deve ser restrito às pessoas necessárias para execução do programa. Antes de adentrar a área controlada, as pessoas devem ser informadas sobre os procedimentos de operação e de emergência e sobre o tipo de trabalho a ser executado;
- Não deve ser permitido o acesso de menores de 18 anos à área controlada;
- O símbolo universal de biossegurança deve ser afixado nas portas de entrada da área controlada e nas portas internas enquanto o trabalho estiver em andamento, incluindo os períodos em que procedimentos de descontaminação estejam sendo executados;
- Os cartazes com o símbolo de biossegurança devem ter, também, informações sobre o tipo de procedimento e sobre o pessoal autorizado a adentrar a área controlada, pesquisador responsável e telefone de contato;
- A área controlada deve ser mantida limpa e organizada. É proibido comer, beber, fumar e estocar alimentos;

- Animais e plantas não devem ser permitidos. Deve ser mantido um programa permanente de combate a insetos e roedores;
 - As portas de acesso à área controlada devem ser mantidas fechadas, exceto quando o trabalho estiver em andamento. As portas de serviço, por sua vez, serão fechadas e seladas durante a execução do trabalho;
 - As pessoas devem lavar as mãos antes de sair da área controlada, equipamentos e materiais necessários devem estar disponíveis;
 - Em caso de derramamentos a área controlada deve ser descontaminada usando os procedimentos estabelecidos.
- O laboratório deve possuir necessariamente extintores de incêndio apropriados, sacos de areia (para absorção de líquidos derramados), mantas contra incêndio, lavadores de olhos, chuveiros de emergência, frascos de substâncias absorventes;
 - Limpeza do ambiente de trabalho: bancadas, pisos, equipamentos e instrumentos. A limpeza antes e após o uso de uma boa prática de laboratório essencial.

- Desinfecção do ambiente: para prevenir contaminação do ambiente com materiais ou produtos biológicos que oferecem risco. Em algumas situações é necessário a uso de radiação UV (cuidados devem ser tomados para evitar exposição a esse tipo de radiação). A desinfecção deve ser realizada também após a atividade laboratorial realizada, para evitar exposição dos colegas a riscos desnecessários;

- Manipulação de vidrarias (posição nas bancadas e transportes as vidrarias maiores devem ser colocadas na pane posterior e a direita na bancada. Para a transporte das vidrarias deve-se utilizar um suporte firme, evitando quedas e derramamentos. As vidrarias mal posicionadas ou transportadas podem causar acidentes e, se contiverem produtos tóxicos, os derramamentos podem gerar situações de emergência com conseqüências desastrosas;

- Manipulação de outros materiais (tubos de ensaio, estantes, placas, microtubos, etc): devem ser posicionados na frente da bancada, a esquerda do equipamento a ser utilizado, para oferecer mais conforto ao operador. Os fatores ergonômicos (posição do operador, dos instrumentos e dos materiais) devem ser considerados no planejamento e na execução das atividades laboratoriais;

- Uso de equipamentos: os equipamentos devem ser posicionados na parte direita anterior das bancadas, evitando-se que os cabos elétricos atravessem o campo de trabalho. Fios do cabo elétrico

devem estar bem protegidos e identificados quanto a fonte (110V e 220V), para evitar curtos ou outras situações de risco. Não devem ser utilizadas extensões elétricas para ligar equipamentos, pois, além de afetar a estabilidade da energia, podem gerar sobrecarga elétrica criando uma situação de emergência. Lembrar que cabos e fios soltos podem causar acidentes graves, principalmente no local de trânsito de pessoas e a descontaminação e limpeza, devem ser seguidas às recomendações para descontaminação ou limpeza iniciais de vidrarias, amostras biológicas ou de equipamentos (em caso de derramamento de produtos);

- Produtos químicos perigosos (solventes, metais, ácidos e bases fortes, etc): devem ser manipulados em gabinetes de segurança, e seu descarte deve ser feito em recipientes próprios, que deverão seguir as recomendações e ser encaminhados para o Serviço de Descarte de Resíduos. A manipulação de substâncias inflamáveis deve ser feita com extremo cuidado, evitando proximidade de equipamentos e fontes geradoras de calor. Observar que todos os produtos químicos manipulados no laboratório devem ter a Ficha de Segurança que contém informações sobre os riscos e cuidados na manipulação do produto e também a conduta adequada em situações de emergência;

- Uso de equipamentos de segurança individual (EPI) e coletiva (EPC): as atividades laboratoriais devem ser realizadas dentro das normas de segurança. Os equipamentos de proteção devem estar disponíveis para

tarefas específicas que exija o seu uso. Na aquisição desses equipamentos deve ser considerada a relação custo x benefício, pois o afastamento do funcionário vítima de acidente e o tratamento dispensado na sua recuperação pode representar gastos elevados para a instituição, muitas vezes superior ao custo do investimento em equipamentos de proteção e treinamento dos funcionários;

- Cálculos e avaliações: devem ser realizados em área isolada da área de trabalho, para evitar contaminação e derramamento sobre manuais e livros de anotados;

- Atividades administrativas: devem ser isoladas do laboratório ou área de trabalho, reduzindo a exposição dos trabalhadores a riscos desnecessários;

- Pessoal de apoio: os funcionários responsáveis pela limpeza geral e pela lavagem da vidraria do laboratório devem ser orientados quanto aos cuidados a serem tomados na execução de suas tarefas. Devem ser informados sobre os riscos a que podem estar expostos (físicos, químicos e biológicos). Devem ser dadas orientações sobre o descarte adequado de lixo comum, de resíduos biológicos, de vidros quebrados, etc.;

- Roupa de trabalho: deve ser compatível com o tipo de atividade a ser executada. As atividades laboratoriais exigem a uso de calça comprida, calçado baixo, fechado, avental de mangas compridas. Uso de lentes de contato, maquiagem e adereços devem ser evitados;

- Derramamentos: nos casos de acidentes em que produtos químicos são derramados, a contenção do produto deve ser imediatamente realizada utilizando substâncias absorventes (*Chemisorb* ou outras) ou areia. Materiais incompatíveis como os produtos químicos derramados não podem ser utilizados (Exemplo, pano e *paper* para conter o derramamento de ácido sulfídrico). A área do acidente deve ser imediatamente isolada;

- Uso de equipamento sonoro: os ouvidos não podem estar obstruídos com qualquer tipo de equipamento sonoro, pois os operadores precisam estar atentos a qualquer ruído estranho à sua volta, principalmente aos equipamentos que estejam operando;

- Pipetagem com a boca é terminantemente proibida: devem ser utilizados sistemas de pipetagem automáticos. A ingestão de líquidos corrosivos e tóxicos leva a conseqüências extremas, podendo causar queimaduras graves e promover a morte. (BRASIL...1995)⁷;

- O laboratório deve possuir necessariamente extintores de incêndio apropriados, sacos de areia (para absorção de líquidos derramados), mantas contra incêndio, lavadores de olhos, chuveiros de emergência, frascos de substâncias absorventes.

⁷ BRASIL. Ministério do trabalho Norma regulamentadora no. 5 (NR-5) , Norma regulamentadora nº 9.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho visa realizar uma revisão da literatura existente no sentido de levantar as principais normas de conduta de biossegurança presentes no laboratório de DNA forense, objetivando minimizar e tornar conhecidos os riscos físicos, biológicos, químicos, ergonômicos e de acidentes presentes.

Para tanto, uma listagem de boas condutas laboratoriais a serem adotadas, assim como conclusões a respeito do panorama da biossegurança específica em laboratório de DNA forense serão formuladas no decorrer do estudo, objetivando a elaboração futura de um Manual de biossegurança laboratorial em DNA forense.

4 DISCUSSÃO

Após efetuar a revisão da literatura, observou-se a inexistência de regras específicas para procedimentos em laboratórios de DNA forense. A ênfase maior encontrada na literatura foi quanto a cuidados referentes à área de biotecnologia em especial, a manipulação genética, trabalho com OGMs, proteção de danos ambientais e preocupações de ordem ética.

Os procedimentos de biossegurança na área forense devem permitir o avanço tecnológico, porém ao mesmo tempo permitir uma adequada proteção do elemento humano, o meio ambiente (através dos cuidados com o descarte de amostras e dejetos), e a proteção da integridade do material analisado. De modo que a biossegurança no laboratório forense extrai as características básicas dos procedimentos em geral, porém com a diferenciação conceitual de visar proteger o elemento animal, comum na definição de biossegurança, na forma de proteção e cuidados com a amostra a ser periciada.

Na área de riscos biológicos, observamos a necessidade de pesquisa maior nos cuidados referentes à contaminação acidental do profissional devido ao fato de as amostras serem consideradas todas potencialmente contaminadas. A origem do material, muitas vezes restos humanos não identificados traz latente a possibilidade da presença de inúmeras doenças (AIDS, hepatite), muitas ainda de etiologia em discussão, por exemplo, a encefalopatia subaguda espongiforme.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e as análises realizadas, podemos concluir que:

1. Existe necessidade do estabelecimento de normas de conduta mais abrangentes dentro dos laboratórios forenses, principalmente no que tange à coleta, manuseio, guarda de amostras e descarte de resíduos;
2. Há necessidade de um correto entrosamento entre o coordenador do laboratório e o corpo de auxiliares;
3. Há necessidade de um contínuo treinamento e aprimoramento do pessoal envolvido nas atividades;
4. Há a necessidade da elaboração de um correto mapa de riscos, elaborado de forma clara, concisa e evidente;
5. Há a necessidade do estabelecimento de tarefas ao corpo de auxiliares, onde cada um deverá efetuar uma única tarefa, porém deverão deter o conhecimento global do serviço a ser realizado, cabendo ao coordenador do laboratório a inspeção de execução de cada fase;

6. Há necessidade de elaboração de um manual específico de rotinas e procedimentos em biossegurança de acordo com as atividades desenvolvidas no laboratório;
7. Rotinas específicas para descontaminação, acondicionamento e descarte devem ser conhecidas de todos;
8. A existência material de proteção coletiva e individual, barreiras de contenção treinamento e instruções por escrito são fundamentais ao bom funcionamento laboratorial;
9. O manuseio das amostras envolve produtos biológicos e este deve ser considerado sempre potencialmente contaminado e manuseado de forma a minimizar a formação de aerossóis;
10. É necessário o uso de barreiras de proteção e de contenção de modo a prever a exposição a sangue e fluídos corpóreos; O tipo de barreira ou proteção deve ser adequado ao procedimento;
11. Os procedimentos de emergência e equipamento para uso em situações de risco deve estar presentes de forma visível e acessível no laboratório através de sinalização, fichas de emergência e sala para pronto-atendimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Manuseio de resíduos de serviços de saúde**: NBR 12809. Rio de Janeiro, 1993.
2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Resíduos de serviços de saúde-Classificação**: NBR 12808, Rio de Janeiro, 1993.
3. BAGASR, O.; HANSEN, J. **In situ PCR techniques**. New York:Wiley-Liss, 1997.
4. BERNSTAM, V.A. **Handbook of gene level diagnostics in clinical practice**. Oxford: Oxford University Press, 1992.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Controle de infecções e a prática odontológica em tempos de AIDS**: Manual de condutas. Brasília, 2000.
6. BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma regulamentadora nº 5 (NR-5) **Comissão Interna de Prevenção de Acidentes do Ministério do Trabalho e Emprego** (Portaria no. 25112194)
7. BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma regulamentadora nº 9 (NR-9) - **Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA) do Ministério do Trabalho e Emprego** (Portaria no. 25, 29112194)
8. BRASIL. Ministério do Trabalho Norma regulamentadora nº 26 (NR-26). **Sinalização de Segurança, do Ministério do Trabalho e Emprego**

* De acordo com a NBR-6023 de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas de periódicos de conformidade com a "World List of Scientific Periodicals"

9. BRASIL. Ministério do Trabalho. **Fichas de Orientação para Produtos Químicos**. Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho.(FUNDACENTRO). São Paulo, 1991.
10. BROWN, T. A. **Dna Sequencing - the basics**. Oxford: Oxford University Press, 1994.
11. CALABREZ, M.C.T.; SALDANHA, P.H. Pesquisa de DNA em Odontologia Forense. *In: Compêndio de Odontologia Legal*. São Paulo: Medsi, 1997. Cap.14, p. 167-217.
12. CARVALHO, P. R. **Boas práticas químicas em biossegurança**. Rio de Janeiro: Interciência, 1999.
13. CATÁLOGO BIOAGENCY. **Materiais comuns de uso em biotecnologia**. Disponível em:
< http://www.bioagency.com.br/novo/catalogo_bioagency.htm >. Acesso em 04 dez. 2001.
14. CISTERNAS, J. R.; MONTE, J. V. O. **Fundamentos de bioquímica experimental**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
15. COLLARD ,J. M. **Biological agents and their classification on the basis of hazard**. Disponível em:<<http://www.biosafety/ihe.be>>. Acesso em 10 out. 2001.
16. COSCIONE, A.R *et al.* **Segurança no laboratório químico**. Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas. Disponível em <http://www.chemkeys.com/bra/ag/segura_9/snlq_5/snlq_5.htm>. Acesso em: 15 dez. 2001.

17. COSTA, M.A.F. **Manual para profissionais das áreas médicas e biomédicas - Biossegurança: Segurança química básica em biotecnologia e ambientes hospitalares.** São Paulo: Santos, 1996.
18. DAVIS, L. G.; DIBNER, M. D.; BATTEY, J. F. **Basic methods in molecular biology.** New York: Elsevier, 1996.
19. DNA 101 - What is it?
Disponível em:
<<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>>. Acesso em 14 dez. 2001
20. FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION.,
Disponível em <<http://www.fbi.gov/programs/lab/fsc/current/dnaudit.htm>>.
Acesso em: 05 dez. 2001
21. FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION, Mitochondrial DNA analysis at FBI laboratoty. **Forensic Science Communications.** Vol.1, n.2, July 1999.
22. FERREIRA. R.P. **Manual de Segurança Industrial.** São Paulo: Margus Publicações, 1999.
23. FILHO, A.F.V. **Manual Segurança Laboratorial.** Segurança em Laboratórios. Programa da qualidade Total. São Paulo: Isolab. Consultoria e Representações, 1999.
24. GAASE JUNIOR, W.D.; MELO, D.A. Segurança do Trabalho e do meio ambiente - Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná. <http://www.quimica.ufpr.br/%7Essta/ssta1.html> [último acesso em 11/2001]
25. GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, I.M. **PCR technology-current innovations.** Flórida: CRC Press, 2000.

26. GRIST, N.R. **Manual de Biossegurança para o Laboratório**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1995.
27. GUANDALINI, S. L. **Biossegurança em odontologia**. 2 ed. Curitiba: Odontex, 1999.
28. HARWOOD, A.J. **Methods in molecular biology: protocols for gene analysis**. New Jersey: Human Press, 1994, vol. 31.
29. HERRMANN, B.; HUMMEL, S. **Ancient DNA – Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens**. New York: Springer, 1994. p.65.
30. JEFFREYS, A.J.; BROOKFIELD, J.F.J.; SOMENOFF, R. Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprints. **Nature**, London, V.317, n.31, p 818-819, Oct. 1985.
31. JOBIM, L.F.; JOBIM, M.R.; BRENNER, C. Identificação humana pelo DNA. *In*: GALANTE FILHO, H. *et al*. **Identificação humana**. Porto Alegre: Sagra Luzzato,1999. p.239-303.
32. JOBIM, L.F.; JOBIM, M.R. **Avaliação da individualidade humana pelo DNA: investigação da paternidade e análise de casos forenses**. São Paulo: Santos, 1997.
33. LABOR CANADA **Laboratory biosafety guidelines**. <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/cdc/bureaus.html>.
34. LABORATÓRIO FLEURY. **Técnicas laboratoriais utilizadas**. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/mednews/0700/mdcontfcb0701.htm>>. Acesso em: 10 Dez. 2001.
35. LABORATÓRIO DNAREFERENCE. Disponível em: <<http://www.dnareference.com/artigos/>>. Acesso em: 11 Nov. 2001

36. LEHNINGER, A .L.; DAVID, L.N.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo: Savier,1995.
37. KAUFMAN. J.A. **Waste Disposal in Academic Institutions**. Michigan: Lewis Publishers., 1990.
38. MATTOS, U.A.O. Mapa de riscos. *In:* TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org.) **Biossegurança uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
39. McCREEDY, B.J., CALLAWAY Laboratory design and work flow. *In:* PERSING, D. H. **Diagnostic molecular microbiology, principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993.
40. MICHIGAN STATE UNIVERSITY Office of Radiation, Chemical and Biological Safety. **Eye and face protection**. Disponível em: <http://www.orcbs.msu.edu/biological/ecp_01/ecp_toc.htm>. Acesso em: 30 Mai. 2001.
41. MCKIE, R. **O enigma genético: a ciência desvenda os mistérios da hereditariedade**. Rio de Janeiro: Xenon, 1993
42. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Temas de Biossegurança** Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/biosseguranca.htm>>. Acesso em: 17 Jan. 2002.
43. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança-CTNBio**. Disponível em: <<http://www.CTNBio.gov.br>>. Acesso em: 15 Dez. 1999.

44. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA .**Cartagena protocol on biosafety** Disponível em:
<<http://www.ctnbio.gov.br/ctnbio/bio/rel/cartagena.htm>>.
Acesso em 10 Nov. 1999.
45. MIYAJIMA, F. **Aspectos fundamentais da validade jurídica da provas em DNA**. Piracicaba, 2001. Dissertação (Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia)- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
46. NC STATE UNIVERSITY. **Biological safety manual** Disponível em:
<<http://www.ncsu.edu>>. Acesso em: 10 Ago. 2001.
47. NINFA, A. J.; BALLOU, D. P. **Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology**. Maryland: Fitzgerald Science Press, Inc. 1995.
48. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Instituto de Química. **Normas de Segurança para o Laboratório Químico**. Disponível em:
<http://www.chemkeys.com/bra/ag/segura_9/ndsd_4/ndsdi_4.htm>. Acesso em: 02 Dez. 1999
49. OLD, R.W.; PRIMROSE, S.B. **Principles of gene manipulation- an introduction to genetic engineering**. 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 1994.
50. OLIVEIRA, N.R. **Freqüência alélica dos lócus DYD390, DYS391, DYS393 em indivíduos brasileiros e sua aplicação à identificação humana**. Piracicaba, 2001. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia)- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

51. PERSING, D.H. **Diagnostic molecular microbiology, principles and applications.** Washington: American Society for Microbiology, 1993.
52. RADIAÇÃO UV.
Disponível em: <<http://www.hospvirt.org.br/enfermagem/port/radni.htm>>.
Acesso em: 15 Mar. 2001
53. ROSNAY, J. **Biokit - A Journey to life.** St.Louis: Sigma Chemical, 1992. p.34.
54. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual.** 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
55. SILVA, F. H. A. L, Equipamentos de contenção. *In:* TEIXEIRA, P. ; VALLE, S (Org.) **Biossegurança uma abordagem multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
56. SIMAS FILHO, F. **A prova na Investigação de paternidade.** 7. ed. Curitiba: Juruá, 1999. 270 p.
57. SIMAS, C. Biossegurança e arquitetura. *In* **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
58. SOUZA, M.M. **Biossegurança no laboratório clínico.** Teresópolis: Eventos, 1998.
59. SUZUKI, D.T.*et al.* **Introdução à genética.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.212.
60. STRYER, L. **Bioquímica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.74

61. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Comissão de biossegurança.**

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot09.htm>. Acesso em: 06 Out. 2001.

62. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Radioatividade e segurança.**

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot07.htm>. Acesso em: 15 Jan. 1999

63. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DOS ÍNDIOS - RS - 99610-000 GRANDE DO SUL. **Regras para descarte de lixo.**

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot02.htm>. Acesso em: 11 Nov. 2001. Radioatividade e segurança

64. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Produtos químicos de uso freqüente no laboratório.** Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot08.htm>. Acesso em: 11 Nov. 2001.

65. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Organismos geneticamente modificados.**

Disponível em: <<http://www.unifesp.br/admin/orgaos/comissoes/cibio/>>. Acesso em: 11 Nov. 2001.

66. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. **Níveis de Biossegurança.**

Disponível em: <<http://www.unifesp.br/admin/orgaos/comissoes/cibio/trabalhos.htm>>. Acesso em: 11 Nov. 2001.

67. UNIVERSITY OF MARYLAND. **Biosafety Manual for University of Maryland** Disponível em:
<[http://www.inform.umd.edu/CampusInfo/Departaments/Envirsafety/biosafet
y/rest/manual.pdf](http://www.inform.umd.edu/CampusInfo/Departaments/Envirsafety/biosafet
y/rest/manual.pdf)>. Acesso em: 15 Jan. 2001
68. UNIVERSITY OF WASHIGTON. **Fingerprint DNA**. Disponível em:
<<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>>. Acesso em:
10 Out. 2001.
69. UNIVERSITY OF TORONTO **Biosafety policies and procedures manual**
Disponível em: <<http://www.utoronto.ca/safety/BioManual>>. Acesso em: 09
Set. 2001.
70. ULTRAVIOLET RADIATION
Disponível em:
<[http://www.nas.nasa.gov/NAS/Education/TeacherWork/Ozone/UV.radiation.
html](http://www.nas.nasa.gov/NAS/Education/TeacherWork/Ozone/UV.radiation.
html)>. Acesso em: 15 Jan. 2001
71. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES CENTERS FOR
DISEASE CONTROL AND PREVENTION AND NATIONAL INSTITUTES
OF HEALTH. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories
(BMBL)** 4th Ed. Washington: U.S. Government Printing Office, 1999.
Disponível em: <[http://www.orcbs.msu.edu/biological/BMBL-
4/bmb1s1.htm](http://www.orcbs.msu.edu/biological/BMBL-
4/bmb1s1.htm)>. Acesso em: 11 Nov 2001.
72. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES PUBLIC HEALTH
SERVICE PRIMARY CONTAINMENT FOR BIOHAZARDS. **Selection,
Installation and Use of Biological Safety Cabinets Centers for Disease
Control and Prevention**. 1995. Disponível em:
<<http://www.orcbs.msu.edu/biological/bsc.htm>> . Acesso em: 15 Set. 1999.

73. TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org.) **Biossegurança uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
74. TORREIRA, R. P. **Manual de Segurança Industrial**. São Paulo: Margus Publicações, 1999.
75. WATSON, J. D. **A dupla hélice - um relato pessoal da descoberta da estrutura do ADN**. Lisboa: Gradativa publicações, 1994.
76. WILKIE, T. **Projeto Genoma: um conhecimento perigoso**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 1994. p.78.
77. WHITE, B. A. **Methods in molecular biology - PCR Protocols, Current methods and applications**. New Jersey: Human Press, 1993. vol.15.

GLOSSÁRIO DE TERMOS BIOLÓGICOS

Agente etiológico: é o fator cuja presença ou ausência é indispensável ao início ou a manutenção de um processo patogênico.

Água estéril: é aquela que sofreu tratamento físico com a finalidade de eliminar qualquer tipo de vida microbiana ali presente.

Artigo crítico: é todo o instrumental ou material pérfuro-cortante ou não que penetra em tecidos e ou entra em contato com sangue e secreções.

Artigo semi-crítico: é todo o instrumental que entra em contato com a pele ou mucosas íntegras.

Artigo não crítico: é todo artigo destinado apenas ao contato com a pele íntegra do paciente.

Assepsia: é o processo pelo qual se consegue impedir a penetração de germes patogênicos em local que não os contenha.

Contaminação: é a transferência do agente infeccioso para um organismo, objeto ou substância.

Desinfecção: é a destruição de forma vegetativa dos agentes infecciosos situados fora do organismo, mediante a aplicação direta de meios físicos ou químicos específicos.

Esterilização: é destruição ou a eliminação total de todos os microrganismos na forma vegetativa e esporulada.

Prions: proteína infecciosa, capaz de transmitir a partir de produtos animais, cadáveres humanos e órgãos usados em transplante infectados.

Validação: é a documentação correspondente de evidências que dão uma razoável garantia, segundo o nível atual da ciência, de que o processo em consideração realiza e/ou pode realizar aquilo para o que foi proposto.

GLOSSÁRIO DE TERMOS GENÉTICOS

Ácidos nucleicos: polinucleotídeos de ocorrência biológica onde os resíduos nucleotídeos estão unidos por ligações fosfodiéster. DNA e RNA.

Anticódon: seqüência específica de três nucleotídeos num RNA de transferência, complementar ao códon para um aminoácido do RNA mensageiro.

Alelo: uma das formas alternativas de um gene; genes situados no mesmo ponto (lócus) de cromossomos homólogos, que se emparelham durante a divisão celular, mas produzem efeitos diferentes nos mesmos processos orgânicos. Caso existam mais de dois alelos para um determinado lócus, são chamados de alelos múltiplos.

Autossomo: um cromossomo nuclear diferente dos cromossomos X e Y.

Auto-radiografia: quadro fotográfico que mostra a posição de substâncias radioativas em tecidos.

Alelos dominantes: são que determinam o fenótipo exibido em um heterozigoto com outro alelo recessivo.

Amplificação de gene: qualquer processo pelo qual são reproduzidas seqüências de DNA específicas desproporcionalmente maiores que a representação deles/delas nas moléculas de pai; durante desenvolvimento.

Bacteriófago: um vírus cujo anfitrião é uma bactéria; capaz de se multiplicar em uma célula bacteriana. Comumente chamado de fago.

Blotting: técnica bioquímica na qual macromoléculas(DNA, proteínas), são separadas em géis de agarose ou poliacríamida,são transferidas e imobilizadas em uma membrana de papel ou náilon para futuras análises.

Bioprints: variante do método VNTR de JEFFREYS, onde em substituição aos reagentes radioativos utiliza-se um corante (biotina). Após a fixação do material genético na membrana gelatinosa, as bandas cromossômicas são marcadas com este corante. O resultado é fotografado para posteriores análises.

Característica: qualquer propriedade de fenotípica detectável de um organismo.

Corpúsculo de Barr: o único cromossomo X condensado visto nos núcleos de células somáticas de mamíferos fêmeas.

cDNA: DNA complementar empregado na clonagem do DNA, usualmente é sintetizado pela transcriptase reversa e é complementar a um certo mRNA.

Centrômero: região de um cromossomo especializada que serve como ponto de ligação para o fuso mitótico ou meiótico. A posição do centrômero determina se o cromossomo é considerado um aerocêntrico, metacêntrico ou telocêntrico.

Clone: réplicas criadas geneticamente a partir de seqüências de DNA. Os descendentes de uma única célula.

Códon: uma sucessão de três nucleotídeos no mRNA que especifica um aminoácido.

Consangüinidade: relação genética. Indivíduos consangüíneos têm um antepassado comum pelo menos em algumas gerações que o precedem.

Crossing over: troca de material genético entre dois cromossomos emparelhados durante meiose.

Citogenética: o estudo de cromossomos.

Códon degenerado: um códon que especifica o mesmo aminoácido como outro códon.

Cromossomos homólogos: cromossomos que se emparelham durante meiose; cada homólogo é uma duplicata de um cromossomo do pai e da mãe.

DNA microssatélite: DNA que contém múltiplas repetições e *tandem* de uma unidade representada por uma seqüência de 1 a 4 pb.

DNA mitocondrial: o DNA do cromossomo circular presente nas mitocôndrias. 5 a 10 cópias por organela.

DNA satélite: DNA que contém múltiplas repetições em *tandem* de uma unidade representada por uma seqüência relativamente grande (da ordem de centenas de pb.).

Endonuclease: enzima que quebra o fosforodiéster interno em uma molécula de DNA. Enzima capaz de hidrolisar ligações fosfodiéster internas de um ácido nucléico em pontos outros que as ligações terminais.

Exons: segmento de gene eucariótico que codifica uma porção do produto final do gene; uma porção permanece depois do processamento pós-transcricional e é traduzida em uma proteína ou incorporada na estrutura de um RNA.

Eletroforese: o processo pelo qual ácidos nucleicos (DNA ou RNA) ou proteínas são separados por tamanho de acordo com movimento das moléculas carregadas em um campo elétrico.

Fenótipo: características observáveis de um organismo produzidas pelo genótipo do organismo que interage com o ambiente.

Genealogia: um diagrama da hereditariedade de características particulares por muitas gerações de uma família.

Gene: uma unidade hereditária que ocupa uma certa posição em um cromossomo; uma unidade que tem um ou mais efeitos específicos no fenótipo.

Genoma: todos os genes contidos em um único gameta; o conteúdo de DNA de um indivíduo que inclui todos os 44 autossomos, dois cromossomos sexuais, e o DNA mitocondrial.

Genótipo: constituição genética de um organismo.

Genes contíguos: genes fisicamente íntimos em um cromossomo que quando agem em conjunto expressam um fenótipo.

Heterozigoto: tendo dois alelos que são diferentes para um determinado gene.

Homozigoto: tendo alelos idênticos a um ou mais loci em segmentos de cromossomo homólogos.

HLA: (*Human Leucocyte Antigen*) Designa região do cromossomo número seis, que determina os genes de histocompatibilidade principal.

Hibridação de DNA: é a ligação entre fitas simples de DNA/DNA ou DNA/RNA, por complementariedade de suas bases nitrogenadas, para formar uma cadeia de fita dupla.

Íntron: Uma seqüência de nucleotídeos em um gene que é transcrita mas excisada antes que o gene seja traduzido.

Impressão digital: uma técnica para identificar a seqüência dos ácidos nucleicos ligados a uma proteína que tem capacidade de se ligar a DNA ou a RNA.

Ligase: enzima que funciona em reparos de DNA.

Mapa genético: (também conhecidos como de ligação) diagrama mostrando a seqüência relativa e a posição de genes específicos ao longo de uma molécula do cromossomo. Refletem a localização relativa de genes marcadores genéticos dentro de um intervalo da seqüência de nucleotídeos que compõem uma molécula de DNA.

Mitose: divisão nuclear.

Morna: mensageiro RNA; um RNA molecular isso funciona durante tradução para especificar a seqüência de aminoácidos em um polipeptídio nascente.

Multifatorial: uma característica influenciou em sua expressão por muitos fatores, genético e ambiental.

Mutação: processo pelo qual genes sofrem uma mudança estrutural.

PCR (*polymerase chain reaction*): técnica de ampliação enzimática de pequenos fragmentos de DNA.

Portador: um heterozigoto individual para um único gene recessivo.

Polimerase: qualquer enzima que catalisa a formação de DNA ou RNA usando um *primer* de iniciação e um DNA como fita molde.

Primer: pequeno segmento de DNA ou RNA que anelado à fita simples de DNA, permite que a enzima polimerase do DNA sintetize a segunda fita do DNA formando a dupla hélice.

Recessivo: um gene que é fenotipicamente manifesto no estado homozigoto mas é mascarado na presença de um alelo dominante.

RFLP: polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição(RFLPs): Variações, entre os indivíduos de uma população, no comprimento de certos fragmentos de restrição no interior dos quais ocorrem certas seqüências genômicas. Estas variações resultam de raras mudanças na seqüência que criam ou destroem sítios de restrição no genoma.

Seqüência básica: um conjunto de bases orgânicas encontradas no DNA e RNA; a adenina forma um par básico com timina (ou uracil) e guanina com citosina.

Sonda de DNA: qualquer bioquímico identifica ou isola um gene, um produto de gene, ou uma proteína.

Sonda: uma fita simples de DNA ou RNA que tenha sido marcada (quimicamente ou radioativamente) e é usada para identificar genes ou fragmentos de DNA de interesse, por meio da complementaridade da seqüência de bases.

Sequenciamento: método utilizado para determinar uma seqüência de nucleotídeos em um fragmento de DNA.

STR: (*short tandem repeats* ou *small tandem repeats*) pequenas repetições aleatórias. Pequenos segmentos de DNA onde existe polimorfismo genético. Encontra-se na forma de lócus genéticos, existindo diversas especificidades, sendo que cada indivíduo apresenta no máximo dois alelos por lócus. A herança se processa de forma mendeliana, onde um alelo provém do pai e o outro da mãe.

Técnica da impressão digital do DNA: um método empregado para determinar diferenças em seqüências de aminoácidos entre proteínas relacionadas; baseia-se na presença de seqüências repetidas de *tandem* simples que se encontram difundidas ao longo de todo o genoma humano.

Transdução: a transferência de material genético bacteriano de uma bactéria para outro que usa um fago como um vetor.

Transferase: enzimas que catalisam a transferência de grupos funcionais entre o doador e moléculas de receptor.

Transcrição: a formação de uma molécula de RNA em um modelo de DNA base emparelhando complementar.

Tradução: a formação de uma cadeia de polipeptídio na seqüência específica de um aminoácido dirigida pela informação genética levada pelo mRNA.

Translocação: uma aberração do cromossomo que resulta em uma mudança em posição de um segmento cromossomal dentro do genoma, mas não muda o número total de presente de genes.

Varição genética: uma discrepância de fenótipo de uma característica em uma população atribuída a heterogeneidade genética.

VNTR: (*variable number of tandem repeats*) Tipo de polimorfismo do DNA criado por pequenas seqüências de DNA repetidas em *tandem* e hipervariáveis, utilizado em DNA fingerprinting par testes de paternidade e identificação de indivíduos.

Vetor: uma molécula de DNA auto-reproduzível que transfere um segmento de DNA entre células do anfitrião.

GLOSSÁRIO DE TERMOS QUÍMICOS

Aerossóis: partículas sólidas ou líquidas dispersas por um longo período de tempo no ar.

Ácido: são compostos constituídos de hidrogênio e um ou mais elementos e que, em presença de alguns solventes ou água, reage com a produção de íons hidrogênio (H⁺).

Agentes Oxidantes: são agentes químicos que desprendem oxigênio e favorecem a combustão.

Barreira Química: são dispositivos ou sistemas que protegem o operador do contato com substâncias químicas irritantes, nocivas, tóxicas, corrosivas, líquidos inflamáveis, substâncias produtoras de fogo, agentes oxidantes e substâncias explosivas.

Base: são substâncias capazes de liberar íons hidroxilo (OH⁻), quando em reação.

Carcinogenicidade: é a capacidade específica que uma substância química tem de produzir câncer ou tumores em animais de laboratório e no homem. A indução de câncer pelas substâncias químicas ocorre através de uma série complexa de reações individuais. Existem duas seqüências. Numa primeira fase, a célula normal se transforma numa célula neoplásica, através da ativação do metabólito químico carcinogênico, havendo uma combinação do DNA com o carcinogênico

final. Numa segunda fase, a partir da célula neoplásica, ocorre o crescimento, surgindo o câncer.

Dose-Resposta: é a relação entre o grau de resposta do sistema biológico e a quantidade de tóxico administrada; muito usada em toxicologia experimental.

Efeito Reversível e Irreversível: a reversibilidade ou irreversibilidade de um efeito tóxico é determinada pela capacidade que um tecido ou um órgão tem de se regenerar. Por exemplo: o fígado tem uma grande capacidade de regeneração e muitas lesões são reversíveis. O sistema nervoso central é constituído de células diferenciadas que não se dividem e não se regeneram; assim, lesões a este sistema são geralmente irreversíveis. Efeitos cancerígenos de substâncias químicas são também exemplos de efeitos tóxicos irreversíveis.

Enzima: é uma proteína secretada por células que atua como um catalisador para induzir alterações químicas em outras substâncias. As enzimas, através das reações de oxidação, redução e hidrólise, possibilitam a biotransformação dos agentes.

Exposição: é o contato do organismo com uma determinada substância tóxica. Estão relacionadas à exposição: as diversas vias de penetração das substâncias, a frequência, a duração e a dose.

Equipamentos de Proteção Individual – EPI: são equipamentos, de uso estritamente pessoal, utilizados para prevenir e/ou minimizar acidentes (botas, luvas, protetores faciais, etc.). É regulamentado pela Portaria 3214-NR-6 do

Ministério do Trabalho de 08/06/78, que prevê a distribuição gratuita desses equipamentos, competindo ao trabalhador usá-los e conservá-los.

Equipamentos de Proteção Coletiva – EPC: são equipamentos de uso coletivo, utilizados para prevenir e/ou minimizar acidentes (extintores de incêndio, lava-olhos, etc.).

Fumos: são partículas sólidas geradas pela condensação de compostos metálicos, geralmente após volatilização de metais fundidos. Menor que 0,5 micras de diâmetro.

Fumaças: partículas de carvão e fuligem.

Hipersensibilidade: é um aumento da reatividade individual a agentes exógenos. Alguns organismos desenvolvem reações alérgicas e lesões ao contato com uma substância química, mesmo na presença de baixas doses.

Idiossincrasia: é uma reação anormal a uma substância química, determinada geneticamente, em forma de uma extrema sensibilidade a baixas doses ou uma extrema insensibilidade a altas doses do agente químico.

Interação Química: o uso crescente de substâncias químicas nas diversas atividades pelo homem aumenta a possibilidade da interação de efeitos dos agentes tóxicos.

Líquidos Inflamáveis: são agentes químicos que, a uma temperatura igual ou inferior a 93°C, desprendem vapores inflamáveis.

Mutagenicidade: é a capacidade de uma substância química em induzir mudanças ou mutações no material genético das células (cromossomos) que podem ser transmitidas durante a divisão celular. Se as mutações ocorrem no óvulo ou no espermatozóide, no momento da fertilização, a resultante combinação do material genético pode não ser viável e a morte pode ocorrer no estágio inicial de divisão celular na gênese do embrião. A mutação no material genético pode não afetar a fase inicial da embriogênese, mas resultar em morte do feto no período posterior de desenvolvimento, surgindo o aborto. As mutações podem resultar em anomalias congênitas. Acredita-se que o evento inicial de carcinogênese das substâncias seja uma mudança nesse material genético.

Névoa: gotículas resultantes da dispersão de líquidos com mais de 0,5 micras de diâmetro.

Neblina: são partículas líquidas em suspensão no ar, formadas pela passagem rápida do ar nos líquidos ou pela condensação de umidade atmosférica em torno de moléculas de gases ou vapores. As neblinas difundem-se em maior extensão que os fumos. Menor que 0,5 micras de diâmetro.

Ponto de Auto-Iguição: é a temperatura mínima em que ocorre uma combustão, independente de uma fonte de calor.

Ponto de Combustão: é a menor temperatura em que vapores de um líquido, após inflamarem-se pela passagem de uma chama piloto, continuam a arder por 5 segundos, no mínimo.

Ponto de Fulgor: é a menor temperatura em que um líquido libera suficiente quantidade de vapor para formar uma mistura com o ar passível de inflamação, pela passagem de uma chama piloto. A chama dura no máximo 1 segundo.

Poeiras: são partículas sólidas que podem se apresentar em suspensão no ar, geradas de materiais orgânicos ou inorgânicos, como rochas, minérios, metais, carvão, madeira, produzidos por desintegração, trituração, pulverização e impacto. Elas não se difundem no ar, sedimentam-se sob a influência da gravidade. Maior que 0,5 micras de diâmetro.

Reação Alérgica: é uma reação adversa a uma substância química resultante de uma sensibilização prévia do organismo àquela substância ou a uma estrutura similar. A reação alérgica pode ser imediata ou retardada. Exemplos: rinite, asma, dermatite.

Substâncias Corrosivas: são agentes químicos que causam destruição de tecidos vivos e/ou materiais inertes.

Substâncias Explosivas: são agentes químicos que pela ação de choque, percussão, fricção, produzem centelhas ou calor suficiente para iniciar um processo destrutivo através de violenta liberação de energia.

Substâncias Irritantes: são agentes químicos que podem produzir ação irritante sobre a pele, olhos e trato respiratório.

Substâncias Nocivas: são agentes químicos que por inalação, absorção ou ingestão, produzem efeitos de menor gravidade.

Substâncias Tóxicas: são agentes químicos que, ao serem introduzidos no organismo por inalação, absorção ou ingestão, podem causar efeitos graves e/ou mortais.

Substâncias Produtoras de Fogo: são agentes químicos sólidos, não explosivos, facilmente combustíveis, que causam ou contribuem para a produção de incêndios.

Suscetibilidade ou Sensibilidade: é uma característica específica e inerente de um indivíduo em apresentar uma reatividade ou resposta na presença de um determinado agente ou antígeno.

Teratogenicidade: é a capacidade que uma substância tem de desenvolver uma malformação no embrião (feto) em desenvolvimento. A influência das substâncias químicas depende da fase da reprodução durante a qual a exposição à substância ocorre. As malformações ocorrem no primeiro trimestre da gestação. O feto é suscetível entre o 20º e o 40º dia de gestação. Exemplos de substâncias com potencial teratogênico: mercúrio, chumbo, cádmio, solventes, inseticidas (pesticidas), agrotóxicos, monóxido de carbono, álcool, fumo, talidomida.

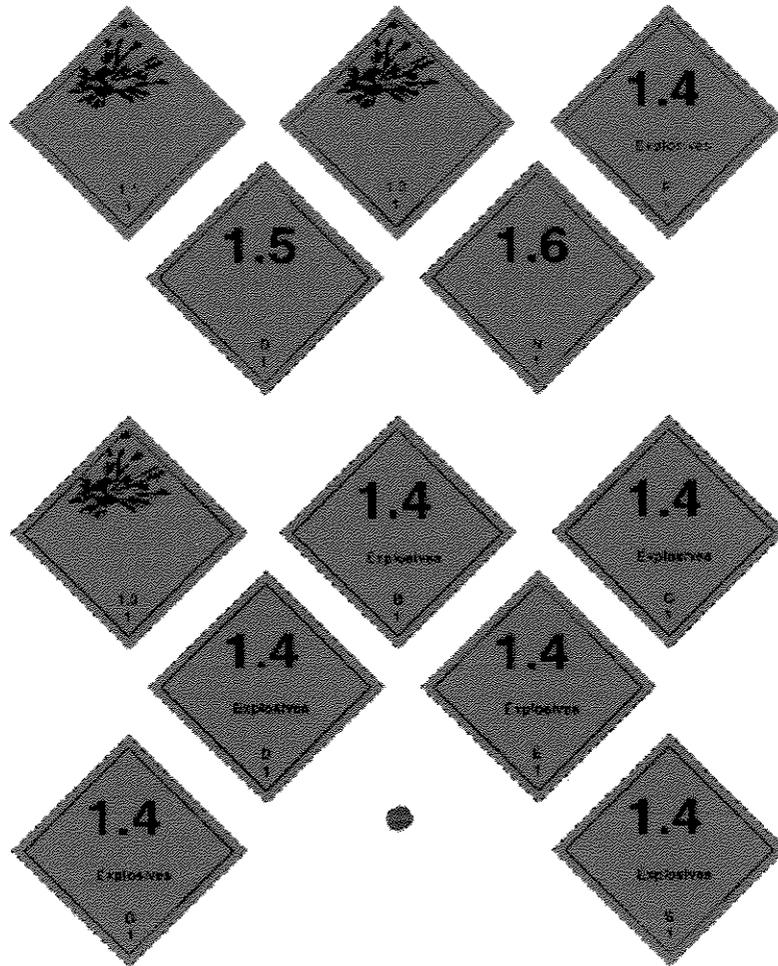
Toxicidade: é a capacidade latente, inerente, que uma substância química possui. É a medida do potencial tóxico de uma substância. Não existem substâncias químicas atóxicas (sem toxicidade). Não existem substâncias químicas seguras, que não tenham efeitos lesivos ao organismo.

Risco: é a probabilidade do efeito tóxico inerente de uma substância química aparecer em um sistema biológico exposto. Os elementos para avaliação do risco são: propriedades físico-químicas da substância, vias de exposição, propriedades metabólicas, efeitos toxicológicos, resultados de exposição imediata e prolongada em animais e resultados de estudos no homem.

Vapores: são formas gasosas das substâncias que estão normalmente no estado sólido ou líquido, em possível equilíbrio com sua fase líquida, e que podem voltar para o seu estado natural por aumento ou diminuição da temperatura.

ANEXOS
Anexo I - Sinalização

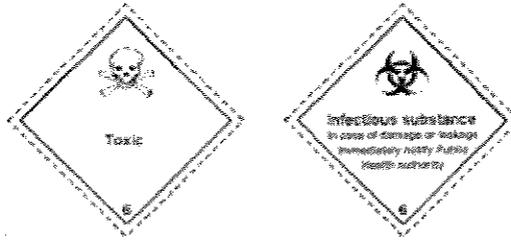
Classe 1 - Explosivos



Classe 2 - Gases Inflamáveis
Gases não Inflamáveis Comprimidos
Gases Tóxicos



Classe 6 - Tóxicos Infecciosos



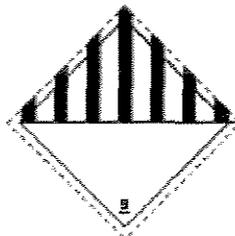
Classe 7 - Radiativos



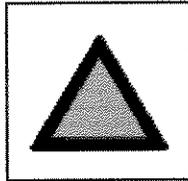
Classe 8 - Corrosivos



Classe 9 - Miscelânea



SINAIS DE SEGURANÇA SIMBÓLICOS



Aviso Geral
de Perigo



Cuidado
Risco de
Incêndio



Cuidado
Risco de
Explosão



Cuidado
Corrosivo



Cuidado
Substância
Venenosa



Cuidado
Radiação
Ionizante

ADVERTÊNCIA



Cuidado
Risco de
Choque
Elétrico



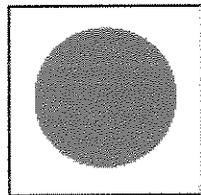
Cuidado
Metano



Cuidado
Risco
Biológico



Cuidado
Laser



Obrigatório
o Uso de
Óculos de
Segurança



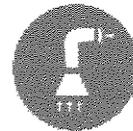
Obrigatório o
Uso de
Proteção
Respiratória



Obrigatório
o Uso de
Luvas



Obrigatório
o Uso de
Calçados de
Proteção
Contra
Líquidos



Obrigatório
o Uso de
exaustão



Obrigatório
o Uso de
Avental

OBRIGAÇÃO



Obrigatório
o Uso de
Proteção
Facial



Obrigatório o
Uso de
Insulfimento
de Ar



Obrigatório
o Uso de
Máscara

Anexo II - Toxicologia

Antídotos locais, modo de emprego e Intoxicações para quais estão indicados

Intoxicações	Antídotos	Modo de Emprego
Formaldeído	Acetato de Amônio	Sol. à 61,5%. Para lavagem gástrica
Álcalis	Ácido Acético	Sol. à 1%. Diluir em água 1:1. Vinagre: Diluir em água 1:4. Administrar via oral
Alcalóides, digitálicos, estricnina, sais de Al, P, Ag	Ácido Tânico	Sol. à 4% para lavagem gástrica
Alcalóides, fenóis e sais metálicos	Água Albuminosa	4 Claras de ovo + 1 litro de água. Para lavagem gástrica
Fósforo Branco, permanganato de potássio	Água Oxigenada	Sol. aquosa à 10%. Para lavagem gástrica
Sulfato ferroso	Bicarbonato de Sódio	Sol. à 5% para lavagem gástrica
Selênio	Bromobenzeno	0,25 - 1,0g na sol. de lavagem gástrica
Álcalis	Frutas Cítricas	Suco. Administrar V.O
Ácidos	Giz	Suspensão em água. V.O
Fluoretos, Fosfatos, irritantes gástricos	Hidróxido de Alumínio	5-8 ml do gel. Administrar via oral
Ácidos	Hidróxido de Cálcio	Sol. à 0,14%. Administrar via oral
Fluoretos, Oxalatos	Lactato de Cálcio	Sol. a 10%. para lavagem gástrica
Ácidos, arsenitos e arsenatos	Leite de magnésia	40g em 1 litro de água. Para lav. gástrica
Iodo	Maisena	80g em 1 litro de água. Para lavagem gástrica
Fisostigmina, estricnina, morfina	Permanganato de Potássio	Solução 1:10.000
Ácidos, Alumínio, Arsênico e Zinco	Óxido de Magnésia	Sol. aquosa à 0,25% Para lavagem gástrica
Para lavagem gástrica	Soro Fisiológico	Tóxicos em geral, sais de prata
Fósforo Branco	Sulfato de Cobre	Sol. a 1% para lavagem gástrica
Sais de Mercúrio	Sulfoxilato, formaldeído Sódico	Solução à 5% para lavagem gástrica
Paraquat	Terra de Fuller	30g em 1 litro de água para lavagem gástrica
Metais Pesados	Tiosulfato de Sódio	15g em 2 litros de água para lav. gástrica

MEDIDAS DE PRIMEIROS SOCORROS NAS INTOXICAÇÕES

CONDUTAS DE URGÊNCIA

I - Quando informado que ocorreu uma intoxicação:

1 - Administrar os primeiros socorros. Manter as funções vitais.

2 - Dar instruções para guardar o tóxico suspeito no recipiente original e colocar qualquer material vomitado num recipiente limpo. Levar os espécimes com o paciente para possível identificação.

3 - Providenciar transporte para um centro de tratamento de urgência, avisar o centro e manter o paciente consciente.

II - Diminuir a exposição do organismo ao tóxico. Retardar a absorção

III - Identificar o tóxico se possível, levar o recipiente original do produto tóxico para o médico, junto com a FISP - Ficha de Informação de Segurança do Produto (MSDS - Material Safety Data Sheet).

Qualquer pessoa pode realizar os procedimentos descritos abaixo. Se o paciente estiver com convulsão ou inconsciente ou ingeriu substâncias corrosivas (ácidos ou álcalis) ou derivados de petróleo (querosene, gasolina, thinner, fluído para isqueiro, etc.) os procedimentos descritos no parágrafo 2 Tóxico Ingerido NÃO DEVEM SER REALIZADOS.

TÓXICO INGERIDO

1 - Fazer o paciente ingerir um dos seguintes produtos para diluir o tóxico e retardar a absorção: leite, ovos batidos suspensão de farinha, maizena ou água morna e salgada.

a) até cinco anos de idade - até 250 ml

b) acima de cinco anos de idade - até 500 ml

2 - Estimular os vômitos excitando a faringe e parte da língua com o dedo. Se os vômitos não puderem ser provocados desta maneira dar uma colher de sopa de xarope de ipeca.

3 -Administrar um laxante - Uma colher de sopa de sulfato de sódio (Sal de Glauber) dissolvido em meio copo de água, por via oral.

4 - Conservar o corpo aquecido pela aplicação de cobertores. Evitar calor externo.

TÓXICO INALADO

1 -Levar imediatamente a vítima para local com ar fresco e desapertar as roupas

2 -Aplicar ressuscitação cardio respiratória, se necessário

3 -Manter o corpo aquecido enrolando o paciente em cobertor

4 -Não tentar o uso de antídotos químicos

CONTAMINAÇÃO DA PELE

1 -Lavar a pele com água corrente e retirar a roupa contaminada

2 -Limpar cuidadosamente a pele com água e sabão

3 -Não tentar o uso de antídotos químicos

CONTAMINAÇÃO DOS OLHOS

1 -Separar as pálpebras, lavar os olhos durante 15 minutos com água corrente

2 -Não tentar o uso de antídotos químicos

Fonte: <http://www.merck.com.br/quimica/sos/index.html>