

PROTÓCOLOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS DE ROTINA

Aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia

Organizadoras

Valéria Louzada Leal

Betina Brixner

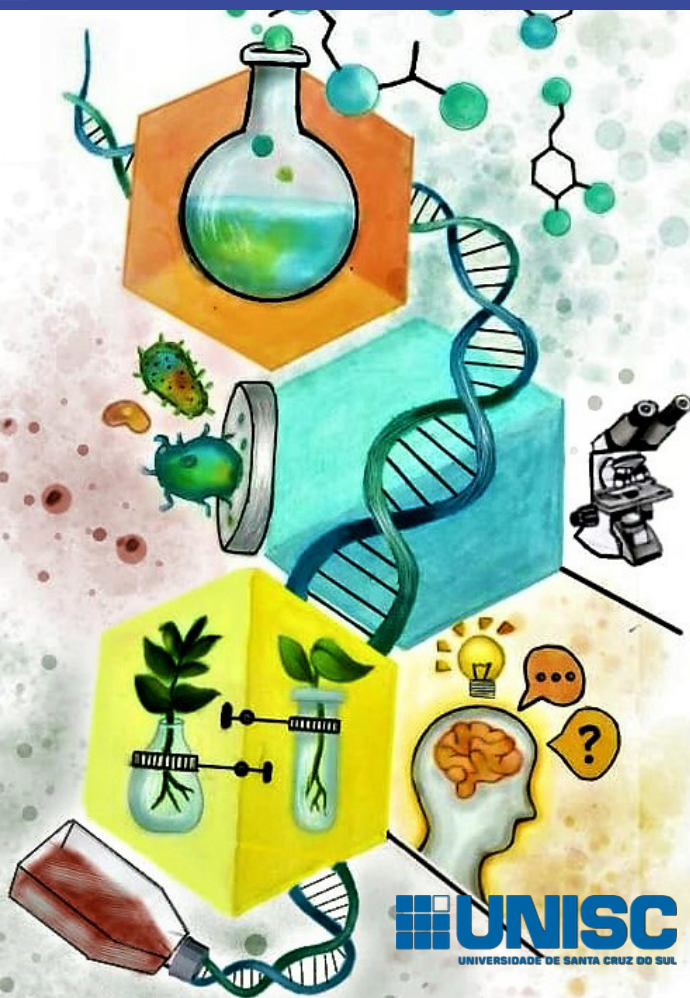
Lia Gonçalves Possuelo

Chana de Medeiros da Silva

Jane Dagmar Pollo Renner

Ilustração

Letícia Clauhs



PROTÓCOLOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS DE ROTINA

Aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia

Organizadoras

Valéria Louzada Leal

Betina Brixner

Lia Gonçalves Possuelo

Chana de Medeiros da Silva

Jane Dagmar Pollo Renner

Ilustração

Letícia Clauhs

1ª edição



Produção editorial

Tikinet

Revisão

Douglas Mattos | Tikinet

Capa, projeto gráfico e diagramação

Maurício Marcelo | Tikinet

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

L435

Leal, Valéria Louzada, Org. e Outros

Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia /Organização de Valéria Louzada Leal, Betina Brixner, Lia Gonçalves Possuelo, Chana de Medeiros da Silva e Jane Dagmar Pollo Renner. Prefácio de Arnaldo Zaha e Andreia Valim. Ilustração de Letícia Clauhs - São Paulo: Tiki Books; Santa Cruz do Sul: UNISC, 2019.

224 p.; Il.

ISBN: 978-85-66241-17-4

1. Medicina Laboratorial. 2. Protocolo Laboratorial. 3. Técnica Laboratorial. 4. Pesquisa Laboratorial. 5. Análise Laboratorial. 6. Biologia Molecular. 7. Microbiologia. 8. Cultivo Celular. 9. Farmacognosia. I. Título. II. UNISC. III. Leal, Valéria Louzada, Organizadora. IV. Brixner, Betina, Organizadora. V. Possuelo, Lia Gonçalves, Organizadora. VI. Silva, Chana de Medeiros da, Organizadora. VII. Renner, Jane Dagmar Pollo, Organizadora. VIII. Clauhs, Letícia, Ilustradora. IX. Zaha, Arnaldo. X. Valim, Andreia.

CDU 614

CDD 616

Catalogação elaborada por Regina Simão Paulino – CRB 6/1154

Financiamento:



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO
ECONÔMICO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA



PRÓ-SAÚDE

CURRÍCULO DOS AUTORES

Alexandre Rieger, biólogo, doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1901964645757514>.

Betina Brixner, farmacêutica, doutoranda em Promoção da Saúde pela Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5162351746470225>.

Bianca Rodrigues Bochi, estudante do Ensino Médio na Escola Estadual de Ensino Médio Ernesto Alves de Oliveira, Santa Cruz do Sul, RS. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7127176489834506>.

Bruna Roberta Toillier, bióloga pela Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7015400167323706>.

Carolina Fagundes Bilião, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0962745530811863>.

Chana de Medeiros da Silva, farmacêutica, doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8812396233035043>.

Dandara Costa Fanfa, acadêmica do curso de Biomedicina na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0782352173284488>.

Djulia Rafaella Kist, acadêmica do curso de Biomedicina na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6469666812553885>.

Elisângela Luzia dos Santos, acadêmica do curso de Enfermagem na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5455096298642672>.

Fabricio Weiss, engenheiro ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4957658974510482>.

Gabriela Baierle, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3270593966952493>.

Greice Graziela Moraes, farmacêutica, doutoranda em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal de Santa Maria. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1837939620379100>.

Jane Dagmar Pollo Renner, farmacêutica e bioquímica, doutora em Biologia Celular e Molecular pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4839962004718850>.

Jennifer Julich, química industrial e engenheira química pela Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2765751715328920>.

Letícia Clauhs, acadêmica do curso de Biomedicina na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0210328403735226>.

Lia Gonçalves Possuelo, bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9903194013924888>.

Luiza Christmann Machado, estudante do Ensino Médio na Escola Estadual de Ensino Médio Ernesto Alves de Oliveira, Santa Cruz do Sul, RS. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5816122175211574>.

Mariële Kliemann, nutricionista, mestre em Genética e Toxicologia Aplicada pela Universidade Luterana do Brasil. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1622462282206977>.

Nayanna Dias Bierhals, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1808122324350904>.

Pâmela Silveira Pedroso, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1263459071834306>.

Silvio Augusto Ortolan, farmacêutico pela Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4614576303394399>.

Valéria Louzada Leal, bióloga, mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4087345725173705>.

Vanessa Caroline Hermes, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1809700233462544>.

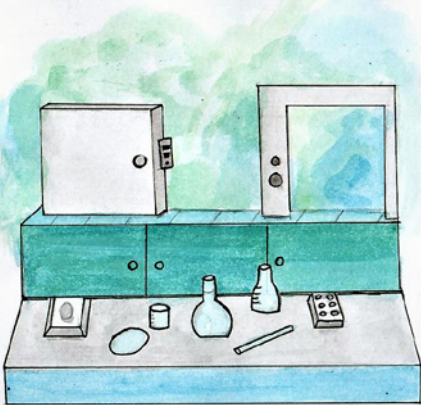
Vitória Gabriela Barboza da Silva, acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul. Link do currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3332581513441209>.

Sumário

CAPÍTULO 1: BIOSSEGURANÇA	II
1. Riscos ambientais.	12
2. Mapa de risco	20
3. Equipamentos de segurança.	22
4. Descarte de resíduos	26
5. O que fazer em caso de acidentes?	35



CAPÍTULO 2: CONCEITOS, TÉCNICAS E BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS.....	41
1. Vidrarias, equipamentos e demais instrumentos de rotina.....	42
2. Principais conceitos e técnicas	58
3. Identificação e correto armazenamento de materiais.....	68
4. Organização do ambiente e revisão de protocolos ...	70
5. Cálculos básicos e preparo de soluções	71



CAPÍTULO 3: BIOLOGIA MOLECULAR.....	85
1. Técnicas em biologia molecular.	90
2. Protocolos em biologia molecular	99





CAPÍTULO 4: MICROBIOLOGIA.....	131
1. Bactérias	133
2. Fungos.....	154

CAPÍTULO 5: CULTIVO CELULAR DE ORIGEM ANIMAL	175
1. Alguns conceitos	177
2. Boas práticas.....	178
3. Principais técnicas em cultivo celular	181



CAPÍTULO 6: FARMACOGNOSIA	201
1. Compostos bioativos obtidos das plantas	203
2. Preparação de extratos vegetais.....	203

Prefácio

O livro *Protocolos e Técnicas Laboratoriais de Rotina* é constituído de seis capítulos que abordam temas como biossegurança, boas práticas laboratoriais e as aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia. O livro aborda temas essenciais para aqueles que atuam em laboratório, como regras básicas de biossegurança, tipos de materiais e equipamentos utilizados em laboratórios, e preparo de soluções. Além disso, aborda técnicas básicas e avançadas na área de biologia molecular, microbiologia, cultivo de células animais e farmacognosia.

Na área de biologia molecular, aborda duas técnicas muito utilizadas, a reação em

cadeia da polimerase (PCR) – tanto a PCR convencional como a PCR em tempo real – e a técnica de sequenciamento do DNA. No tópico de microbiologia, são abordados temas básicos relacionados às características de bactérias e fungos, bem como os métodos de cultivo, testes de susceptibilidade a drogas e formas de armazenamento dos microrganismos. No tema de cultivo de células animais, são apresentadas as regras básicas que devem ser seguidas para se conseguir cultivar de forma correta as células animais. Finalmente, no tópico de farmacognosia, são apresentadas as técnicas relacionadas à exploração de extratos vegetais para isolamento e purificação de produtos com atividade biológica.

A obra está redigida de forma clara e simples, facilitando o entendimento dos temas. As ilustrações complementam de forma importante os textos e auxiliam o leitor na compreensão dos diferentes tópicos abordados. Essas características tornam este livro muito importante, podendo

auxiliar na formação de estudantes do ensino médio, graduandos e pós-graduandos. Além disso, o livro será muito útil como material de apoio para profissionais que atuam em laboratórios públicos e privados com foco em pesquisa ou análises laboratoriais rotineiras.

Arnaldo Zaha

Professor titular do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Andreia Valim

Professora adjunta do Departamento de Biologia e Farmácia,
Universidade de Santa Cruz do Sul.

Biossegurança

1

Autores

Betina Brixner

Fabício Weiss

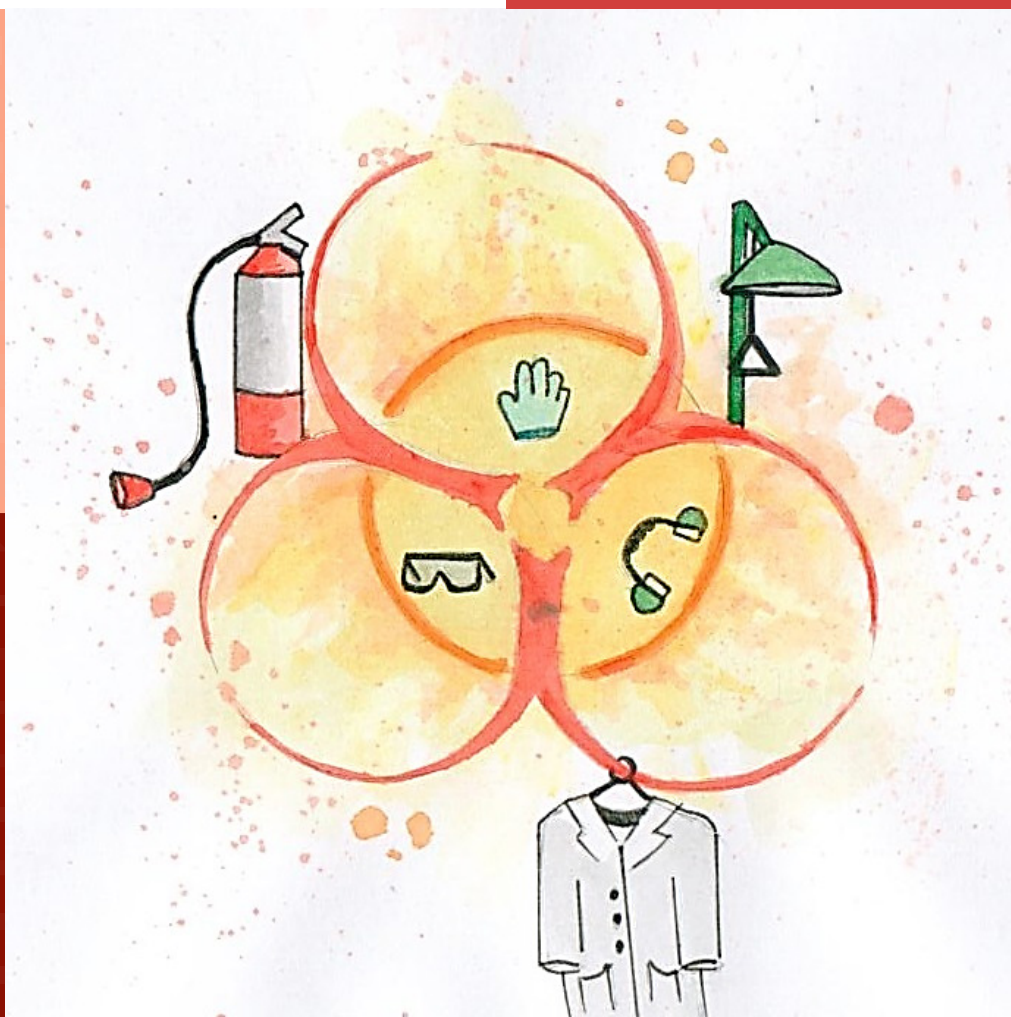
Jennifer Julich

Mariéle Kliemann

Valéria Louzada Leal

Ilustração

Letícia Clauhs



O conceito de **biossegurança** começou a ser formatado na década de 1970, nos Estados Unidos, a partir da manifestação da comunidade científica sobre o potencial risco que a manipulação genética poderia oferecer, bem como com a discussão dos efeitos da engenharia genética sobre a vida da sociedade.

No Brasil, o termo foi legalmente definido como um conjunto de medidas de segurança em processos envolvendo organismos geneticamente modificados e questões relativas a pesquisas científicas com células-tronco embrionárias, descritos na Lei da Biossegurança nº 11.105/2005. Entretanto, novas questões começaram a ser incorporadas à definição de biossegurança, como os riscos químicos, físicos, radioativos, ergonômicos, éticos, ambientais, entre outros. Dessa forma, de modo geral, o termo apresenta-se como um conjunto de medidas destinadas a

prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos gerados pelos agentes biológicos, químicos, físicos e ergonômicos inerentes a uma determinada atividade, minimizando assim os possíveis efeitos negativos sobre a saúde humana, animal e vegetal, o meio ambiente e a qualidade do trabalho realizado.

I. RISCOS AMBIENTAIS

Saber identificar os riscos ambientais é de suma importância. Com esse reconhecimento, pode-se articular estratégias para prevenir, controlar ou eliminar os perigos ao qual o trabalhador está exposto. A Norma Regulamentadora (NR) 9 do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) estabelece a necessidade de implementação de programa de prevenção de riscos ambientais, identificando quais são os riscos potenciais à saúde do trabalhador, os quais serão discutidos a seguir (BRASIL, 1978).

Riscos físicos

Em ambiente laboratorial há diferentes tipos de risco físico, que diversas vezes não são levados em consideração. Estes podem prejudicar a saúde do trabalhador por doenças ocupacionais desenvolvidas após longos períodos em exposição, bem como podem não estar diretamente ligados ao funcionário exposto, dependendo, por exemplo, da propagação mecânica do ar para causar danos à saúde; por isso, muitas vezes seus efeitos também podem ser sentidos por pessoas indiretamente expostas. Esse grupo é identificado pela **cor verde**. São exemplos de riscos físicos:



Figura 1. Risco físico: ruído alto

Ruidos

Sons que podem causar sensações desagradáveis para as pessoas que os ouvem. Em altos níveis, estão ligados a casos de perda auditiva, além de aumento dos batimentos cardíacos, fadiga, irritação e estresse.



Figura 2. Risco físico: queimadura

Calor

Quantidade de energia que o corpo deve eliminar para alcançar um equilíbrio térmico. Em excesso e em situações de descuido, pode ocasionar quadros de desidratação, choque térmico e queimadura.

Frio

Perda de calor do corpo quando exposto a baixas temperaturas. Devido à hipotermia, pode ocorrer casos de vasoconstrição periférica, diminuição do fluxo sanguíneo, e queda de pressão arterial e frequência cardíaca, levando à sonolência, redução da atividade cerebral e perda da consciência, podendo chegar a um estado de coma, ou até mesmo óbito.

Umidade

Quando o ambiente de trabalho se encontra com intensa umidade, podendo ocasionar patologias dérmicas e perda de calor corporal.

Radiações ionizantes

Radiações eletromagnéticas capazes de fazer com que os elétrons se desprendam de átomos e moléculas, alterando sua estrutura (ionização). São decorrentes de materiais radioativos, como os raios alfa, beta e gama, e de alguns equipamentos, como o raio X. Os raios beta e gama têm a capacidade de penetrar no corpo humano, podendo levar o trabalhador a quadros anêmicos e de câncer e a modificações genéticas.

Radiações não ionizantes

Radiações eletromagnéticas em que não é possível ionizar átomos através da energia, pois refletem ou ultrapassam as moléculas. O risco está diretamente relacionado à intensidade e ao tempo de exposição do trabalhador a essas radiações. São exemplos os raios infravermelhos, micro-ondas, ultravioleta e laser. Exposição crônica a radiações não ionizantes pode levar a queimaduras e, segundo alguns estudos, aumentar o risco de câncer em crianças e adultos.



Figura 3.
Risco físico: radioatividade

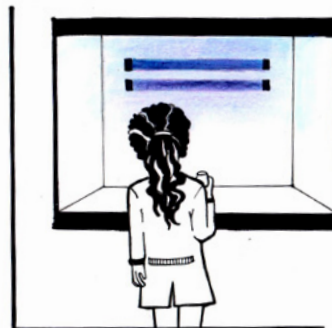


Figura 4. Risco físico:
luz ultravioleta (UV)

Riscos químicos

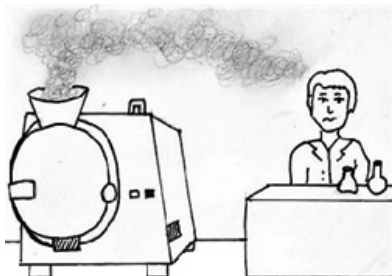


Figura 5. Risco químico: moagem emitindo poeira

Neste grupo encontram-se substâncias, compostos ou produtos químicos que possam causar danos à saúde do trabalhador, seja pelo contato com a pele, por ingestão ou pela via respiratória. Este grupo é identificado pela **cor vermelha**. São exemplos de riscos químicos:

Poeiras

Partículas sólidas dispersas no ar por ação mecânica. Estão relacionadas com casos de pneumoconioses, alergias e irritação na via respiratória.

Fumos

Partículas sólidas dispersas no ar, oriundas de gases condensados devido a alguma queima. Podem causar pneumoconioses e intoxicação por metais pesados.

Névoas

Partículas líquidas dispersas no ar por intermédio de quebra mecânica. Podem promover efeitos diversos de acordo com a natureza do produto, como irritação dos olhos, pele e via respiratória.

Neblinas

Pequenas partículas líquidas dispersas no ar, produzidas pela condensação de gases oriundos de processos térmicos. Estão relacionadas com casos de irritação dos olhos, pele e via respiratória.

Gases

Elementos ou substâncias em estado gasoso. Podem causar asfixia (gás carbônico, por exemplo), ou até mesmo serem tóxicos (amônia, por exemplo).

Vapores

Elementos ou substâncias em estado gasoso devido a aquecimento prévio. Podem causar diferentes efeitos conforme a natureza do produto químico, como irritação e queimaduras.

Além dos riscos químicos acima citados, há também aqueles comumente relacionados a substâncias, compostos ou produtos químicos, cujos efeitos possuem relação com a natureza do composto. Podem ser classificados como inflamáveis, explosivos, corrosivos, cáusticos, irritantes, alergênicos, carcinogênicos e outros.



Figura 6. Risco químico: produto químico em estado gasoso

Riscos biológicos

Estão relacionados com a manipulação ou exposição a agentes biológicos, cuja contaminação do trabalhador pode ocorrer através da via respiratória, da pele ou por ingestão. Bactérias, fungos, parasitas, vírus, protozoários, entre outros, são exemplos de microrganismos responsáveis por diversas patologias. A manipulação desses microrganismos sem os devidos equipamentos de segurança individual e/ou coletiva podem ocasionar infecções, tétano, hepatite, tuberculose, gripe, micoses, diarreia, entre outros sintomas, além de possível transmissão para outros indivíduos. Este grupo é identificado pela **cor marrom**. A NR 32 do MTE (BRASIL, 2005b) classifica esse risco em duas categorias de exposição:



Figura 7. Risco biológico: manipulação de microrganismos

Exposição com intenção deliberada

Quando há necessidade de manipular agentes biológicos para exercer sua função. Muito comum em atividades de pesquisa e em laboratórios de microbiologia, análises clínicas e biotecnologia. Nesta categoria, os riscos de contaminação são controlados, pois se conhecem as características dos microrganismos manipulados, e são adotadas medidas para reduzir os riscos de exposição a eles.

Exposição com intenção não deliberada

Ocorre devido a alguma atividade laboral que não exija a manipulação direta de microrganismos, tal como acontece em atendimentos de saúde, consultórios de odontologia e médicos.

Este grupo engloba qualquer situação no ambiente de trabalho que possa originar algum desconforto ao trabalhador, seja por motivos fisiológicos, psicológicos, pela realização de atividades com movimento repetitivo, postura incorreta, ou ainda extensas jornadas de trabalho, estado de grande estresse mental e outros. Este grupo é identificado pela **cor amarela**.

Para que haja esse tipo de risco, o trabalhador não necessita se envolver em graves acidentes, porém, podem ocorrer quadros de dor, cansaço, ansiedade, tendinite, lombalgia de esforços, dores nas costas, problemas de coluna, lesões musculares, alterações no sono e na vida social, entre outros.

Riscos ergonômicos



Figura 8. Risco ergonômico: postura incorreta

Riscos mecânicos

São os acidentes de trabalho que acontecem em virtude de más condições físicas do local e/ou por utilização incorreta de máquinas, utensílios, equipamentos e outras tecnologias. Podem ser nocivos ao trabalhador, levando a ferimentos, fissuras, fraturas, escoriações e queimaduras, prejudicando assim sua saúde ocupacional. Este grupo é identificado pela **cor azul**. A seguir, alguns exemplos de riscos mecânicos:

Arranjo físico

Se inadequado, pode estar relacionado com casos de acidente e desgaste físico excessivo.

Máquinas sem proteção

Equipamentos sem proteção ou dispositivos de segurança, como travas, podem ocasionar graves acidentes.

Instalações elétricas

Quando inadequadas ou deficientes pode gerar risco de curto circuito, choque elétrico, incêndio e queimaduras.

Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Quando inadequado ou na ausência de seu uso, pode ocasionar acidentes e expor o trabalhador a doenças.

Sinalização deficiente

Identificação inadequada ou ausente de equipamentos que apresentam risco, ausência de áreas delimitadas e insuficiência de informações para segurança no trabalho.

2. MAPA DE RISCO

Trata-se de uma representação gráfica, uma ilustração da planta baixa do local de trabalho, demonstrando os fatores que são capazes de causar malefícios à saúde do trabalhador. O mapa de risco é representado por círculos coloridos, pelos quais é possível verificar o risco e sua intensidade (Figura 9).

A construção de um mapa de risco auxilia na conscientização dos perigos existentes para os trabalhadores. Por meio de informações organizadas e educativas representadas em figuras, a visualização e identificação dos riscos existentes no ambiente de trabalho ocorre de maneira rápida e dinâmica. A Figura 10 representa um exemplo de mapa de risco.

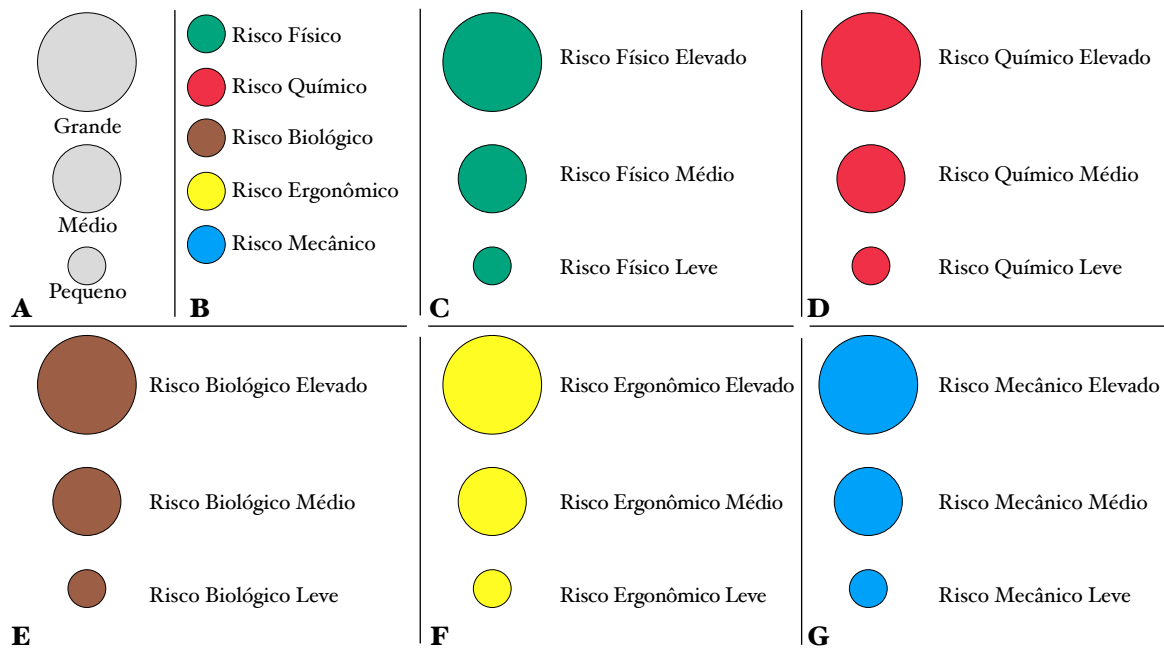


Figura 9. Simbologia de um mapa de risco

Legenda: (A) Tabela de gravidade; (B) Classificação de cores conforme cada grupo de risco; (C) Simbologia de cores e gravidade para os riscos físicos; (D) Simbologia de cores e gravidade para os riscos químicos; (E) Simbologia de cores e gravidade para os riscos biológicos; (F) Simbologia de cores e gravidade para os riscos ergonômicos; (G) Simbologia de cores e gravidade para os riscos mecânicos.

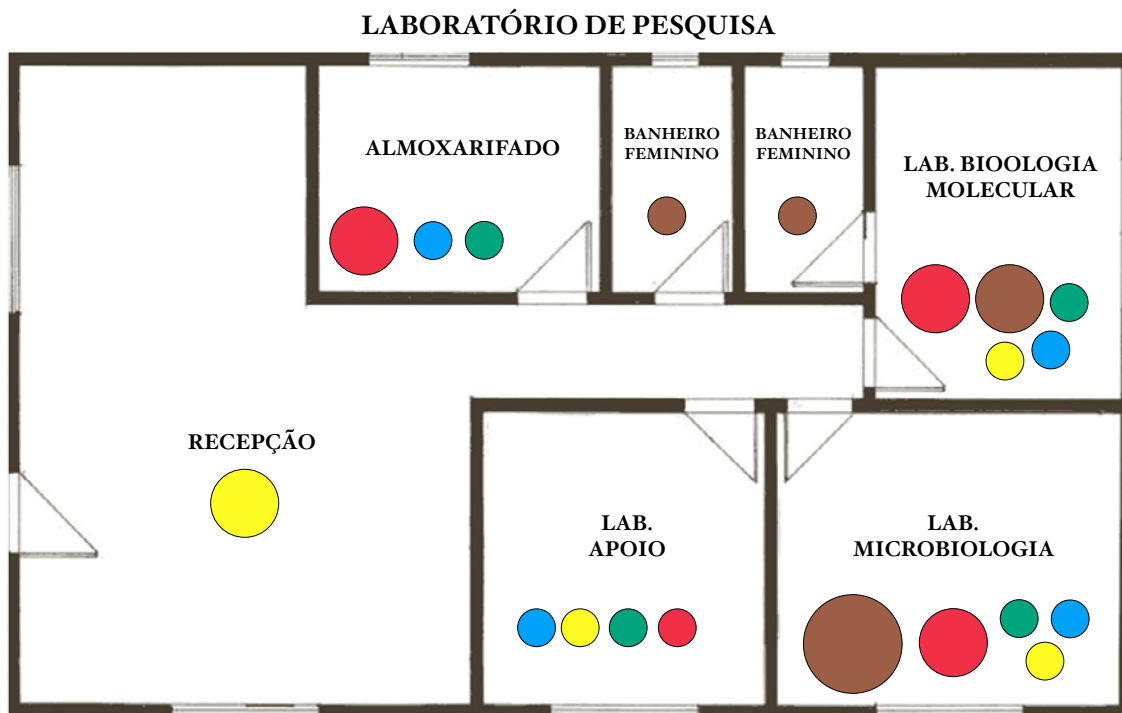


Figura 10. Exemplo de um mapa de risco

Legenda: Recepção (riscos ergonômicos médios); Almojarifado (riscos químicos médios e riscos mecânicos e físicos leves); Banheiros feminino e masculino (riscos biológicos leves); Laboratório (Lab.) de biologia molecular (riscos químicos e biológicos médios e riscos físicos, mecânicos e ergonômicos leves); Lab. de microbiologia (riscos biológicos elevados, riscos químicos médios e riscos físicos, mecânicos e ergonômicos leves). Imagem meramente ilustrativa.

3. EQUIPAMENTOS DE SEGURANÇA

As barreiras de contenção são equipamentos constituídos de materiais especiais, com o propósito de proteger os trabalhadores contra possíveis riscos químicos, físicos e biológicos.

Existem duas classificações para as barreiras de contenção. As **barreiras de contenção primárias** possuem a função de proteger o trabalhador no laboratório pelo uso de **equipamentos de proteção individual (EPI)** e de **equipamentos de proteção coletiva (EPC)**, pela adoção e uso de boas práticas de laboratório, bem como pela realização de vacinas. As **barreiras de contenção secundárias** incluem desde o projeto de construção e layout das

instalações, à análise de fluxo e práticas laboratoriais.

O uso dos equipamentos de proteção individual e coletiva é essencial para a prevenção de acidentes, sendo preconizado pelas NR 4, NR 6 e NR 9 do MTE (BRASIL, 1978a, 1978b, 1978c). É um dever do empregador fornecer o equipamento de proteção condizente com a atividade realizada por seu empregado, bem como capacitá-lo sobre seu uso, manutenção e guarda, sendo obrigação do empregado portá-los e utilizá-los conforme orientação, bem como mantê-los em condições de uso ou, quando necessário, substituí-los.

Diante disso, podemos citar os seguintes equipamentos classificados como **EPI** (Figura 11):

Jaleco

Deve ser de algodão, mangas compridas e de comprimento que possa cobrir a parte superior das pernas, devendo ser usado sempre fechado. O uso é restrito ao ambiente de laboratório, ou seja, não é permitido seu uso em área externa como, por exemplo, lanchonetes, salas de estudo, salas de reunião, na via urbana e em transportes públicos.

Sapatos

Devem ser totalmente fechados. Portanto, chinelos, tênis, sandálias ou sapatilhas não são permitidos, evitando, assim, acidentes com respingos ou derramamento de produtos químicos e impactos de objetos diversos.

Luvas

Devem ser usadas sempre durante a manipulação de material biológico potencialmente infectante, de químicos e em processos de higienização de materiais. Importante conhecermos os diferentes tipos de luvas disponíveis no ambiente laboratorial: **a)** látex: para procedimentos em geral, exceto para solventes orgânicos; **b)** cloreto de vinila (PVC) e látex nitrílico: para produtos químicos, principalmente ácidos, cáusticos e solventes; **c)** fibra de vidro com polietileno reversível: para proteção contra materiais cortantes; **d)** fio de kevlar tricotado: para manuseio de materiais em altas temperaturas, de até 250 °C; **e)** térmicas de nylon: para manipulação de materiais em baixas temperaturas, até -35 °C; e **f)** borracha: para serviços gerais de limpeza e descontaminação. Todas as luvas devem possuir formato anatômico adequado, bem como proporcionar conforto e destreza.

Protetores respiratórios

Devem ser usados para a proteção do aparelho respiratório e das vias aéreas contra respingos, gases, fumaças, névoas, fumos, materiais biológicos e demais partículas suspensas no ar. De modo geral, máscaras e respiradores são os protetores respiratórios mais adequados e devem ser escolhidos de acordo com o trabalho executado.

Protetores oculares

Seu uso é obrigatório em toda área de risco, como por exemplo, na manipulação de material biológico e produtos químicos, conforme a indicação do fabricante. Além disso, existem óculos específicos para a proteção contra radiação ultravioleta e contra gases e vapores. Estes equipamentos protegem os olhos contra respingos, vapores e impactos.

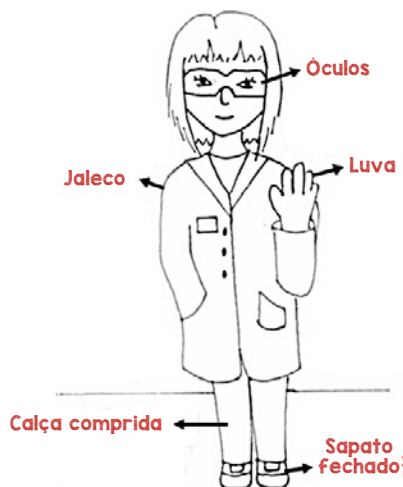


Figura 11.
Exemplo do uso de EPIs

Se liga!

Dependendo do tipo de trabalho a ser realizado, outros EPI poderão ser necessários, como mangas de proteção, capacetes, protetores auriculares, entre outros.

Todos os EPI devem apresentar Certificado de Aprovação e serem utilizados dentro do prazo de validade.

Os EPC são itens ou sistemas destinados à proteção e promoção da segurança e saúde em todo o ambiente de trabalho.

Podemos citar alguns exemplos de EPC (Figura 12): chuveiro de emergência, lava-olhos, cabines de segurança biológica, capelas de fluxo, extintores de incêndio, kit para derramamento biológico, químico ou radioativo (composto por roupa

de proteção, máscara contra gases, óculos e protetor facial, botas de borracha, toucas, luvas, soda cáustica ou bicarbonato de sódio para neutralizar ácidos, areia para cobrir álcalis, entre outros itens para recolhimento do material), sprinkler (borrifador de água instalado no teto), sinalizadores de segurança, corrimão de escadas, entre muitos outros.



Figura 12. Exemplo de alguns EPC existentes em ambientes laboratoriais

4. DESCARTE DE RESÍDUOS

Para a correta realização do gerenciamento e descarte de resíduos, deve-se seguir, entre outras legislações, a **Norma Brasileira da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR) 10.004/2004**, que dispõe sobre a classificação e descarte de resíduos sólidos; a **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 222/2018** (BRASIL, 2018), que regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS); a **Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 358/2005**, que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos RSS; e a **Resolução da Agência Nacional de Transportes Terrestres (ANTT) nº 5.232/2016** (BRASIL, 2016), que regulamenta o transporte terrestre de produtos perigoso, orientando quanto à correta classificação dos produtos nas diversas classes e subclasses de risco. Destaca-se ainda o cumprimento da **NR 32 do MTE** (BRASIL, 2005b), que estabelece

as diretrizes básicas para a implementação de medidas de proteção à segurança e à saúde dos trabalhadores dos serviços de saúde, bem como daqueles que exercem atividades de promoção e assistência à saúde em geral.

Normalmente, a área ambiental é a encarregada pela orientação de setores institucionais quanto à destinação final e ambientalmente correta de resíduos. Entretanto, cada setor deve ser responsável pelo cumprimento das diretrizes e pelo correto encaminhamento de seus resíduos, contribuindo para a redução de danos à saúde de seus colaboradores, assim como a redução de danos ao ambiente.

4.1. ABNT NBR 10.004/2004

A NBR 10.004/2004 classifica os resíduos sólidos e semissólidos quanto aos seus riscos potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, para que possam ser gerenciados adequadamente. De modo geral, os resíduos sólidos e semissólidos são classificados em dois grupos (Figura 13):

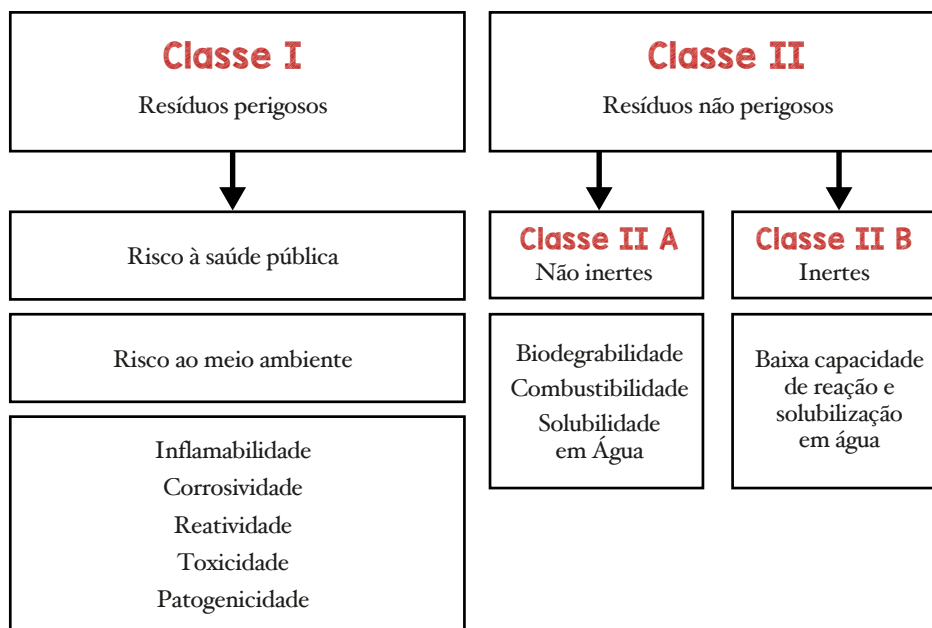


Figura 13. Classificação da NBR 10.004/2004 de forma genérica

- **Classe I (perigosos):** aqueles que apresentam risco à saúde pública e ao meio ambiente, apresentando pelo menos uma das seguintes características: inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade ou patogenicidade. Exemplos: produtos químicos, serragem utilizada para absorção de produtos químicos/óleos, papéis ou plásticos contaminados com graxas/óleos, óleos minerais e lubrificantes, EPI contaminados etc.
- **Classe II (Não perigosos):** todos aqueles não classificados como classe I. Esses ainda podem ser classificados como classe II A (não inertes) ou classe II B (inertes):
 - Classe II A (não inertes):** aqueles resíduos não perigosos, mas que apresentam propriedades como biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água. Exemplos: papeis e matérias orgânicas.
 - Classe II B (inertes):** aqueles resíduos não perigosos que, quando submetidos

a um contato dinâmico e estático com água destilada ou deionizada, à temperatura ambiente, não têm nenhum de seus constituintes solubilizados a concentrações superiores aos padrões de potabilidade de água, excetuando-se aspecto, cor, turbidez, dureza e sabor. Exemplos: aço, sucatas de ferro e entulhos.

4.2. RDC nº 222/2018 e Resolução Conama nº 358/2005

Essas resoluções dispõem sobre as boas práticas de gerenciamento dos RSS e sobre o tratamento e a disposição final desses resíduos, respectivamente. De modo geral, os RSS podem ser classificados em cinco grupos (Figura 14):



Figura 14. Representação geral sobre a RDC N° 222/2018

- **Grupo A:** resíduos com presença ou possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção, não podendo serem reciclados, reutilizados ou reaproveitados, inclusive para alimentação animal. Sua identificação deve ser com o símbolo de risco biológico, em rótulo de fundo branco,

desenho e contornos pretos, acrescido da expressão “Infectante”. O grupo A ainda pode ser dividido em cinco subgrupos:

subgrupo A1: culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos; meios de cultura e instrumentos utilizados para transferência, inoculação ou mistura

de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética; bolsas de sangue e de hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação; sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos. Esses resíduos devem ser submetidos a tratamento para redução ou eliminação da carga microbiana, sendo somente então encaminhados para aterros sanitários licenciados ou local devidamente licenciado para essa finalidade;

subgrupo A2: carcaças; peças anatômicas; vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações; cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anatomopatológico ou confirmação diagnóstica. Resíduos classificados neste subgrupo que contenham microrganismos com alto risco de transmissibilidade, alto potencial de letalidade ou que representem risco caso sejam disseminados no meio ambiente, devem ser submetidos a tratamento para redução ou eliminação da carga microbiana, sendo então descartados como resíduos do subgrupo A1;

subgrupo A3: peças anatômicas (membros) de ser humano e produtos de fecundação sem sinais vitais que não tenham valor científico ou legal e não tenham requisição pelo paciente ou seus familiares devem ser destinados para sepultamento, cremação, incineração ou outra destinação licenciada pelo órgão ambiental competente;

subgrupo A4: kits de linhas arteriais e endovenosas e dialisadores; filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares; sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agentes com elevado risco individual ou para comunidade; resíduos de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere esse tipo de resíduo; recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde que não contenham sangue ou líquidos corpóreos na forma livre; peças anatômicas (órgãos e tecidos), incluindo a placenta, e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anatomopatológicos ou de confirmação diagnóstica; cadáveres, carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não

submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos; bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão. Esses resíduos devem ser submetidos a tratamento para redução ou eliminação de possível carga microbiana, sendo então descartados como resíduos do subgrupo Ar; e

subgrupo A5: órgãos, tecidos e fluidos orgânicos de alta infectividade oriundos de casos suspeitos ou confirmados, bem como quaisquer materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, suspeitos ou confirmados, e que tiveram contato com órgãos, tecidos e fluidos de alta infectividade. Esses resíduos devem ser submetidos a tratamento específico orientado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

- **Grupo B:** resíduos contendo produtos químicos que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e mutagenicidade; produtos farmacêuticos; resíduos de saneantes, desinfetantes; resíduos contendo metais pesados; reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por eles; efluentes de processadores de imagem (reveladores e fixadores); efluentes dos equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas; demais produtos considerados perigosos. Sua identificação deve

ser realizada por meio de símbolo e frase de risco associados à periculosidade do resíduo químico (por exemplo, explosivo, inflamável, corrosivo, radioativo, infectante, tóxico). Quando não submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem, devem ser submetidos a tratamento e disposição final específicos.

- **Grupo C:** rejeitos radioativos provenientes de laboratório de pesquisa e ensino na área da saúde, laboratório de análise clínica, serviço de medicina nuclear e radioterapia. O gerenciamento dos rejeitos deste grupo deve obedecer ao Plano de Proteção Radiológica do Serviço, às Normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear e demais normas aplicáveis. Em relação ao descarte, os rejeitos radioativos não podem ser considerados resíduos até que atinjam níveis de inocuidade permitidos para sua eliminação. Somente após alcançados esses limites os rejeitos radioativos podem ser considerados resíduos das categorias biológica, química ou de resíduo comum, seguindo então as determinações do grupo ao qual pertencem. É representado pelo símbolo internacional de presença de radiação ionizante, em rótulo de fundo amarelo, acrescido da expressão “Radioativo”.

- **Grupo D:** resíduos que não apresentam risco biológico, químico ou radiológico à saúde pública ou ao meio ambiente, como: papéis de uso sanitário e fralda; absorventes higiênicos; peças descartáveis de vestuário; restos alimentares; luvas e demais equipamentos

de procedimentos que não entraram em contato com sangue ou líquidos corpóreos; resíduos provenientes das áreas administrativas; resíduos de varrição, flores, podas e jardins; forrações de animais de biotérios sem risco biológico associado; pelos de animais e demais resíduos recicláveis ou não-recicláveis sem contaminação biológica, química e radiológica associada. Quando possível podem ser encaminhados para reutilização, recuperação, reciclagem, compostagem, logística reversa ou aproveitamento energético, desde que atendendo às normas legais de higienização e descontaminação, assim como à Resolução Conama nº 275/2001, que estabelece o código de cores para os diferentes tipos de resíduos, sendo: azul – papel/papelão; vermelho – plástico; verde – vidro; amarelo – metal; preto – madeira; marrom – resíduos orgânicos; cinza – resíduo geral não reciclável ou misturado, ou contaminado não passível de separação. Resíduos sólidos inservíveis (rejeitos) devem ser encaminhados para aterro sanitário de resíduos sólidos urbanos devidamente licenciado. Os efluentes líquidos podem ser lançados em rede coletora de esgotos, desde que atendam às normas ambientais e às diretrizes do serviço de saneamento.

- **Grupo E:** resíduos perfurocortantes ou escarificantes, como lâminas de barbear; agulhas; scalpels; ampolas de vidro; brocas; limas endodônticas; fios ortodônticos cortados; próteses bucais metálicas inutilizadas; pontas diamantadas; lâminas de bisturi;

lancetas; tubos capilares; lâminas e lamínulas; espátulas; utensílios de vidro quebrados no laboratório (como pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri). Devem ser identificados pelo símbolo de risco biológico, com rótulo de fundo branco, desenho e contorno preto, acrescido da inscrição de “Perfurocortante”, e descartados em recipientes rígidos, providos com tampa, resistentes à punctura, ruptura e vazamento. Quando contaminados por agentes biológicos, químicos e substâncias radioativas, devem ter seu manejo de acordo com cada classe de risco associada.

4.3. Resolução ANTT 5.232/2016

Muitas instituições de ensino e pesquisa não realizam o tratamento de resíduo em suas instalações, destinando-os para tratamento externo. Dessa forma, é necessário transportar o resíduo entre a fonte geradora e a empresa que realiza o tratamento. Nesse caso, a fonte geradora deve obedecer à Resolução ANTT 5.232/2016 (BRASIL, 2016). Esse documento aprova as instruções complementares ao Regulamento Terrestre do Transporte de Produtos Perigosos, considerando as diretrizes de demais órgãos reguladores. Também apresenta instruções quanto à classificação e armazenamento, e documentos relacionados ao transporte terrestre de produtos e/ou resíduos perigosos. (Figura 15).

<p>Classe 1 Explosivos</p>				
<p>Subclasse</p>	<p>I.1, I.2 e I.3</p>	<p>I.4</p>	<p>I.5</p>	<p>I.6</p>
<p>**Local para indicação da subclasse; *Local para indicação do grupo de compatibilidade</p>				
<p>Classe 2 Gases</p>				
<p>Subclasse</p>	<p>2.1</p>	<p>2.2</p>	<p>2.3</p>	
<p>Classe 3 Líquidos inflamáveis</p>				
<p>Classe 4 Sólidos inflamáveis; substâncias sujeitas à combustão espontânea; substâncias que, em contato com água, emitem gases inflamáveis</p>				
<p>Subclasse</p>	<p>4.1</p>	<p>4.2</p>	<p>4.3</p>	

Figura 15. Ilustrações indicativas de cada classe de risco de acordo com a ANTT

Fonte: Resolução ANTT 5.232/2016.

Classe 5
Substâncias
oxidantes e
peróxidos
orgânicos

Subclasse



5.1



5.2

Classe 6
Substâncias
tóxicas e
substâncias
infectantes

Subclasse



6.1



6.2

Classe 7
Material
radioativo

Subclasse



7.1



7.2



7.3

NBR: Nível Máximo de Radiação na superfície externa do embalado (mSv/h) | **I**: $\text{NMR} \leq 0,005$; **II**: $0,005 < \text{NMR} \leq 0,5$; e, **III**: $0,5 < \text{NMR} \leq 2$.

Classe 8
Substâncias
corrosivas



Classe 9
Substâncias e artigos
perigosos diversos,
incluindo substâncias
que apresentam risco
para o meio ambiente



Se liga!

Para melhor compreensão
e classificação, as diretri-
zes devem ser lidas na
íntegra.

Figura 15. continuação

É de responsabilidade de cada setor armazenar, identificar e encaminhar à área ambiental os produtos/resíduos perigosos, para que esta, então, encaminhe ao correto destino. Destaca-se que para correta classificação e armazenamento deve-se considerar as informações contidas nas Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ), bem como a lista de compatibilidade entre produtos químicos, apresentada pela ABNT NBR 14.619/2003.

De modo geral, a Resolução ANTT 5.232/2016 (BRASIL, 2016) classifica os produtos/resíduos perigosos em nove classes, sendo que as soluções ou substâncias devem ser alocadas de acordo com o risco ou o mais sério dos riscos por elas apresentados (Figura 15). A ordem numérica das classes e subclasses não corresponde ao grau de risco. São elas:

■ **Classe I:** Explosivos.

subclasse I.1: substâncias e artigos com risco de explosão em massa;

subclasse I.2: substâncias e artigos com risco de projeção, mas sem risco de explosão em massa;

subclasse I.3: substâncias e artigos com risco de fogo e com pequeno risco de explosão ou de projeção, ou ambos, mas sem risco de explosão em massa;

subclasse I.4: substâncias e artigos que não apresentam risco significativo;

subclasse I.5: substâncias muito insensíveis, com risco de explosão em massa; e,

subclasse I.6: artigos extremamente insensíveis, sem risco de explosão em massa.

Você já ouviu falar da FISPQ?

Quando se trata de acidentes com substâncias químicas, é muito importante conhecê-las. Para isso, existe um documento chamado **FISPQ** (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos, como mencionado anteriormente), que todo laboratório deve ter. Esse documento é normalizado pela ABNT conforme a **NBR nº 147254**, e pode ser fixado em um ponto de fácil visualização e acesso. Nele se encontram informações como a identificação da substância ou mistura; composição e informações sobre os ingredientes; propriedades físicas e químicas; formas de armazenamento, manuseio, transporte e descarte; classe de risco; medidas de primeiros socorros em caso de acidentes; medidas para combate a incêndio; medidas para controle em caso de vazamentos ou derramamentos; informações toxicológicas e ecológicas, entre outras. As informações contidas nesse documento auxiliam de forma muito efetiva a elaborar programas de segurança, além de reduzir os danos causados em caso de acidentes, uma vez que apresentam as ações mais adequadas considerando as características do produto.

- **Classe 2:** Gases.
 - subclasse 2.1:** gases inflamáveis;
 - subclasse 2.2:** gases não-inflamáveis, não-tóxicos; e,
 - subclasse 2.3:** gases tóxicos.
- **Classe 3:** Líquidos inflamáveis.
- **Classe 4:** Sólidos inflamáveis, substâncias sujeitas à combustão espontânea; e substâncias que, em contato com água, emitem gases inflamáveis.
 - subclasse 4.1:** sólidos inflamáveis, substâncias autorreagentes e explosivos sólidos insensibilizados;
 - subclasse 4.2:** substâncias sujeitas à combustão espontânea; e,
 - subclasse 4.3:** substâncias que, em contato com água, emitem gases inflamáveis.
- **Classe 5:** Substâncias oxidantes e peróxidos orgânicos.
 - subclasse 5.1:** substâncias oxidantes; e,
 - subclasse 5.2:** peróxidos orgânicos.
- **Classe 6:** Substâncias tóxicas e substâncias infectantes.
 - subclasse 6.1:** substâncias tóxicas; e,
 - subclasse 6.2:** substâncias infectantes.
- **Classe 7:** Material radioativo.
- **Classe 8:** Substâncias corrosivas.
- **Classe 9:** Substâncias e artigos perigosos diversos, incluindo substâncias que apresentem risco para o meio ambiente.

5. O QUE FAZER EM CASO DE ACIDENTES?

De modo geral, pode-se dizer que existe uma relação entre acidentes e tempo de trabalho. Observa-se maior número de acidentes entre indivíduos que trabalham há pouco tempo em um ambiente, pela falta de experiência, e entre indivíduos que trabalham há muito tempo em um local, devido ao excesso de confiança. Em laboratórios de pesquisa, essa falta de experiência ou excesso de confiança devem ser muito bem observados, uma vez que esses ambientes são um “prato cheio” para os acidentes, pois reúnem produtos químicos, substâncias radioativas, irritantes, tóxicas, abrasivas, microrganismos e outros. A manipulação desses materiais sem o cumprimento das normas de biossegurança é uma das causas que contribui para a ocorrência dos acidentes.

Todo aquele que trabalha e/ou utiliza um laboratório deve ter responsabilidade e evitar atitudes que possam acarretar acidentes e possíveis danos para si e/ou para os demais.

Entretanto, sabe-se que acidentes podem acontecer. De modo geral, algumas atitudes podem ser tomadas em caso de acidentes, sempre com muita cautela e uso de equipamento de segurança.

As ações descritas a seguir são genéricas! Cada situação deve ser avaliada individualmente, devendo ser conduzida de maneira mais adequada para aquele momento.

Derramamento de produto químico

- interrompa o trabalho imediatamente e saia do local;
- verifique se não houve algum tipo de contato entre o produto químico e seu corpo;
- alerte o funcionário responsável e os demais usuários do laboratório, identificando a área com alerta de risco;
- consulte a FISPQ do produto, na qual consta todas as informações importantes e orientações em caso de acidente;
- solicite a devida limpeza. Caso possa realizá-la, utilize a máscara adequada (assim como demais EPI) e o devido material absorvente;
- verifique e corrija a causa do problema (frasco trincado, tampa solta etc.).

Derramamento de material biológico:

- interrompa o trabalho imediatamente;
- alerte o funcionário responsável e os demais usuários do laboratório, identificando a área com alerta de risco;
- isole a área;
- cubra a área de derramamento completamente com material absorvente, aplique solução de hipoclorito de sódio (água sanitária concentrada comercial 2,5%) e guarde 30 minutos;
- inicie o procedimento de limpeza utilizando EPI e material absorvente descartável (toalhas de papel, compressas de gaze, panos de limpeza) para a absorção do líquido derramado.

Se liga!

Os resíduos da limpeza, ou papeis e demais materiais impregnados, devem ser descartados como resíduos químicos de acordo com sua classe de risco.

Se liga!

Se o derramamento contiver vidro quebrado ou outros objetos, esses devem ser descartados sem contato manual direto. Para isso, utilize folhas rígidas, pás de lixo plásticas ou pinças. Lembrando que esses materiais deverão ser descartados juntamente com os objetos, num recipiente apropriado para material com risco biológico e à prova de perfurações.

Se o derramamento ocorrer dentro de algum equipamento (dentro de uma centrífuga, por exemplo), este deve permanecer fechado durante pelo menos meia hora a fim de permitir que o material assente. Após esse tempo, inicia-se a descontaminação.

Todo material descartável utilizado na descontaminação precisa ser esterilizado antes de ser descartado.

Se liga!

Para cada tipo de incêndio existe um extintor específico.

Se liga!

Muitas instituições possuem **Serviço Especializado em Segurança e Medicina do Trabalho (SESMT)**, uma **brigada de incêndio** e uma **Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (Cipa)**. Geralmente, esses são funcionários habilitados para prestar socorro em caso de sinistros e acidentes. Por convenção, eles utilizam o cordão do crachá de coloração vermelha e verde, respectivamente. **Sempre os acione e os comunique em qualquer situação de incêndio e/ou acidentes!**

Princípio de incêndio:

- alerta sobre o incêndio;
- não tente ser herói! Chame ajuda imediatamente;
- se tiver acesso, desligue o quadro de energia elétrica;
- se souber usar o extintor, use-o. Se não souber, não arrisque!
- evacue o local;
- se possível feche todas as portas, isolando o foco de incêndio do restante das instalações;
- evacue as instalações utilizando as escadas e as saídas de emergência. Não utilize elevadores!
- entre em contato com a brigada de incêndio da instituição e com os bombeiros.

Respingo de produto químico na região dos olhos:

- Não tente neutralizar o produto;
- lave a região abundantemente no lava-olhos, por pelo menos 15 minutos, com os olhos abertos;
- consulte a FISPQ do produto, na qual consta todas as informações importantes e orientações em caso de acidente;
- encaminhe-se imediatamente ao pronto-socorro, comunicando o tipo de produto químico utilizado.

Respingo em qualquer outra região do corpo:

- retire a roupa que cobre o local atingido;
- não tente neutralizar o produto;
- lave a região abundantemente com água, na pia ou no chuveiro de emergência, por pelo menos 15 minutos;
- consulte a FISPQ do produto, na qual consta todas as informações importantes e orientações em caso de acidente;
- encaminhe-se imediatamente ao pronto-socorro.

Queimaduras:

- Por calor: lave a região abundantemente com água corrente para resfriamento do local (observe a força da água para não lesionar ainda mais a área).
- Por substâncias químicas: remova o excesso de produto do local e então lave abundantemente; feito isso, encaminhe-se imediatamente ao pronto-socorro.

Cortes:

- lave o local com água abundantemente;
- cubra o ferimento com gaze e atadura;
- encaminhe-se imediatamente ao pronto-socorro.

Telefones úteis em situações de emergências

Bombeiros: 193

SAMU: 192

Brigada Militar: 190

Além disso, sempre mantenha em algum local visível de seu laboratório os números de telefone do SESMT, da brigada de incêndio, da Cipa ou de algum outro funcionário treinado para essas situações.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14.619**: transporte terrestre de produtos perigosos: incompatibilidade química. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10.004**: resíduos sólidos: classificação. 2. ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14.725-4**: produtos químicos: informações sobre segurança, saúde e meio ambiente. Parte 4: Ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ). Rio de Janeiro: ABNT, 2009.
- ARAÚJO, S. A. de. **Manual de biossegurança**: boas práticas nos laboratórios de aulas práticas da área básica das ciências biológicas e da saúde. Natal: UnP, 2009. Disponível em: <http://bit.ly/31Y9Kjy>. Acesso em: 8 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 4: serviços especializados em engenharia de segurança e em medicina do trabalho. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 6 jul. 1978a. Disponível em: <https://bit.ly/2XmtFpq>. Acesso em: 5 abr. 2018.

- BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 6: equipamento de proteção individual – EPI. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 6 jul. 1978b. Disponível em: <https://bit.ly/2ZELSVB>. Acesso em: 5 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 9: programa de prevenção de riscos ambientais. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 6 jul. 1978c. Disponível em: <http://bit.ly/2X8nCZE>. Acesso em: 5 abr. 2018.
- BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Lei da Biossegurança. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, p. 1, 28 mar. 2005a. Disponível em: <https://bit.ly/1iAXZ4h>. Acesso em: 4 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. Norma Regulamentadora nº 32: segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 16 nov. 2005b. Disponível em: <http://bit.ly/2XeQcco>. Acesso em: 7 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério dos Transportes. Agência Nacional de Transportes Terrestres. Resolução ANTT nº 5232, de 14 de dezembro de 2016. Aprova as Instruções Complementares ao Regulamento Terrestre do Transporte de Produtos Perigosos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 16 dez. 2016. Disponível em: <https://bit.ly/2XONQkx>. Acesso em: 12 dez. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as boas práticas de gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, n. 61, 29 mar. 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2XzroMM>. Acesso em: 26 nov. de 2018.
- BRUNO, A. N. **Biotecnologia I**: princípios e métodos. Porto Alegre: artmed, 2014.
- CIPA – COMISSÃO INTERNA DE PREVENÇÃO DE ACIDENTE. Mapa de risco. *In*: PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS. Cipa: Comissão Interna de Prevenção de Acidentes. Belo Horizonte, [2008?]. Disponível em: <http://bit.ly/2ROkjRL>. Acesso em: 8 abr. 2018.
- COMISSÃO NACIONAL PERMANENTE DA NR 32. **Riscos biológicos**: guia técnico: os riscos biológicos no âmbito da Norma Regulamentadora nº 32. Brasília, DF: 2008. Disponível em: <http://bit.ly/2Xw2mgi>. Acesso em: 7 abr. 2018.
- CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 275, de 25 de abril de 2001. Estabelece o código de cores para os diferentes tipos de resíduos, a ser adotado na identificação de coletores e transportadores, bem como nas campanhas informativas. **Diário Oficial da**

União: seção 1, Brasília, DF, p. 80, 19 junho 2001. Disponível em: <https://bit.ly/zwqcebu>. Acesso em 13 dez. 2018.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, p. 63-65, 4 maio 2005. Disponível em: <http://bit.ly/2NgKm5i>. Acesso em: 14 dez. 2018.

CRPG – CENTRO DE REABILITAÇÃO PROFISSIONAL DE GAIA. *Fatores de risco ergonômico*. Vila Nova de Gaia: CRPG, 2008. Disponível em: <http://bit.ly/2YiCLnF>. Acesso em: 8 abr. 2018.

FRANCHETTI, S. M. M. **Manual de segurança e regras básicas em laboratório**. São Paulo: Unesp, 2002.

IFSC – INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Introdução à engenharia de segurança:** mapa de risco. Florianópolis: IFSC, 2016. Disponível em: <http://bit.ly/2RETXBo>. Acesso em: 08 abr. 2018.

IMS – INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE. **Manual de biossegurança:** biossegurança para laboratórios de ensino e pesquisa. Vitória da Conquista: Ufba, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2Yj6eOr>. Acesso em: 5 abr. 2018.

MATTOS, U. O.; QUEIROZ, A. R. Mapa de Risco. *In:* TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança:** uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996. p. 111-122.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV: IOC, 2009. Disponível em: <http://bit.ly/2RCXPCS>. Acesso em: 12 abr. 2018.

MÜLLER, I. C.; MASTROENI, M. F. Tendência de acidentes em laboratório de pesquisa: controlando riscos em laboratórios. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v. 7, ed. 33, p. 101-108, 2004. Disponível em: <http://bit.ly/2X8BKgO>. Acesso em: 8 abr. 2018.

PEIXOTO, N. H. **Segurança do trabalho**. 3. ed. Santa Maria: UFSM: Colégio Técnico Industrial de Santa Maria, 2011. Disponível em: <http://bit.ly/2ZLQa8i>. Acesso em: 5 abr. 2018.

SILVA, F. H. A. L. Barreiras de contenção. *In:* ODA, L. M.; ÁVILA, S. M. (org.). **Biossegurança em laboratório de saúde pública**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998.

SKRABA, I.; NICKEL, R.; WOTKOSKI, S. R. Barreiras de contenção: EPIs e EPCs. *In:* MASTROENI, M. F. **Biossegurança aplicada a laboratório e serviços de saúde**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 7-48.

CONCEITOS, TÉCNICAS E BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS

2

Autores

Alexandre Rieger

Betina Brixner

Bianca Rodrigues Boch

Gabriela Baierle

Jennifer Julich

Luiza Christmann Machado

Nayanna Dias Bierhals

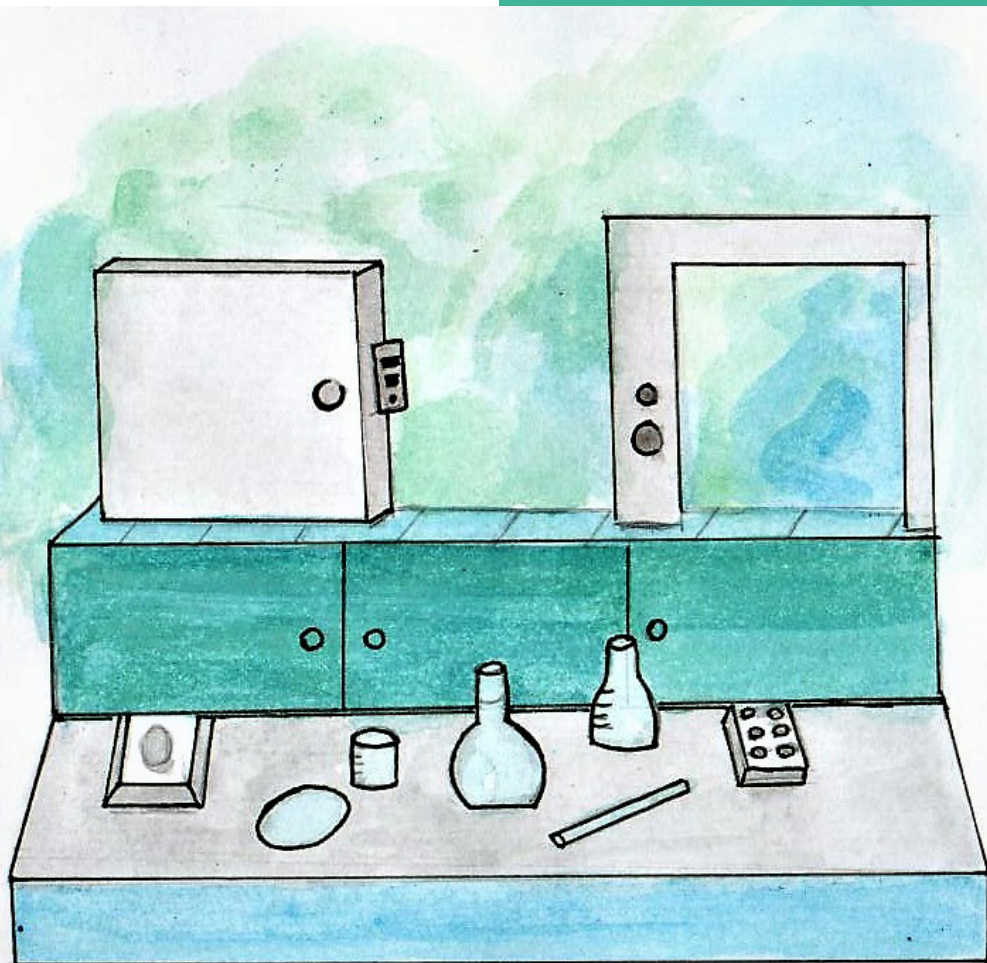
Pâmela Silveira Pedroso

Valéria Louzada Leal

Vanessa Caroline Hermes

Ilustração

Letícia Clauhs



Reconhecer os principais instrumentos, equipamentos e vidrarias utilizados em práticas laboratoriais, e conhecer suas aplicações e formas de manuseio são questões fundamentais que podem garantir análises e resultados de qualidade. Somam-se a isso o bom planejamento dos experimentos e a organização e limpeza dos materiais e do ambiente de trabalho que, além dos benefícios já citados, também vão ao encontro de questões relacionadas a biossegurança e evitam desperdícios. Neste capítulo serão apresentados alguns dos principais

utensílios, conceitos, técnicas e práticas laboratoriais.

I. VIDRARIAS, EQUIPAMENTOS E DEMAIS INSTRUMENTOS DE ROTINA

Para o desenvolvimento de atividades em laboratórios é necessário a utilização de vidrarias, equipamentos e instrumentos específicos para auxiliar nos experimentos e garantir qualidade. Apresentamos a seguir um quadro ilustrando alguns dos utensílios mais utilizados e comuns a várias práticas, bem como suas aplicações na rotina laboratorial.

Vidrarias



Figura 1. Balão de fundo chato



Figura 2. Balão de fundo redondo



Figura 3. Balão volumétrico

Balão de fundo chato

Recipiente para conter líquidos ou soluções, ou mesmo para fazer reações com desprendimento de gases. Utilizado também em destilações químicas e aquecimentos sob refluxo, podendo ser apoiado sob superfícies planas.

Balão de fundo redondo

Utilizado principalmente em sistemas de refluxo e evaporação a vácuo, apropriado para manta aquecedora ou acoplado a evaporador rotativo.

Balão volumétrico

Utilizado para preparar soluções e medir com precisão um volume único e fixo, descrito no balão.

Bastão de vidro

Utilizado para facilitar a homogeneização e agitação de substâncias e, ainda, auxiliar na transferência de líquidos de um recipiente a outro.

Béquer

De uso geral em laboratório, serve para dissolver substâncias, efetuar reações químicas, aquecer líquidos etc.



Figura 4. Béquer

Bureta

Vidraria volumétrica que apresenta uma escala de graduação bastante rigorosa ao longo de sua extensão. É um instrumento similar à pipeta graduada e apresenta uma torneira na extremidade inferior. Muito utilizada na transferência de volumes líquidos para outros recipientes, quando se necessita maior precisão.

Dessecador

Para armazenamento de substâncias em atmosfera com baixo índice de umidade. Muito utilizado para secagem e resfriamento de material. Como sua atmosfera interna deve conter baixo teor de umidade, em seu interior são colocados agentes secantes, como sílica gel.



Figura 5. Dessecador

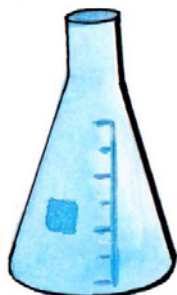


Figura 6. Erlenmeyer

Erlenmeyer

Para armazenamento e condicionamento de substâncias. Tem a vantagem de permitir a agitação manual, e seu afunilamento superior reduz o risco de perda de material.

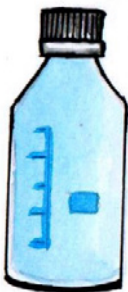


Figura 7. Frasco tipo Schott

Frasco tipo Schott

Frasco graduado, com tampa em rosca e área para rotulagem. É ideal para preparação, transporte e conservação de amostras e/ou reagentes.



Figura 8. Funil analítico

Funil analítico

Utilizado na transferência de líquidos e em processos de filtração de misturas heterogêneas.

Funil de Büchner

Feito de porcelana, com vários orifícios (como uma peneira). Utilizado junto com o Kitasato para filtração a vácuo.



Figura 9. Funil de Büchner

Kitasato

Vidraria acessória em processos que necessitam vácuo. Geralmente utilizado junto com o funil de Büchner em processos de filtração a vácuo, é o recipiente de coleta do fluido que se pretende separar da fase sólida.



Figura 10. Kitasato

Pipeta de Pasteur

Utensílio de plástico ou vidro utilizado para transferência de pequenos volumes líquidos. Não apresenta graduação precisa, podendo ser utilizada de modo semiquantitativo pela contagem de gotas.



Figura 11. Pipeta de Pasteur



Figura 12. Pipeta graduada

Pipeta graduada

Utilizada para medição de pequenos e variados volumes líquidos, uma vez que apresenta escala de graduação. Apresenta no topo a descrição de sua capacidade máxima.



Figura 13. Pipeta volumétrica

Pipeta volumétrica

Utilizada para medição e transferência de volumes muito precisos de líquido. Cada pipeta volumétrica apresenta um volume único e específico, descrito no topo.



Figura 14. Placa de Petri

Placa de Petri

Recipiente de forma cilíndrica e achatada, composto por duas partes, podendo ser de vidro ou plástico. Utilizado principalmente em cultivos e técnicas de microbiologia.

Proveta

Recipiente em forma de um tubo cilíndrico, com graduação em toda sua extensão, utilizado para medição de volumes líquidos, porém com baixa precisão.

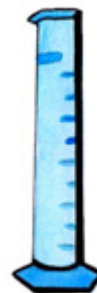


Figura 15. Proveta

Vidro relógio

Utensílio de tamanhos variados, utilizado para pesar pequenas quantidades de substância, bem como para auxiliar na evaporação de pequenas quantidades de solução e também para cobrir béqueres e demais recipientes.

Equipamentos e instrumentos

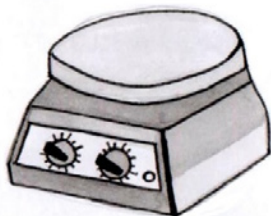


Figura 16. Agitador magnético com aquecimento



Figura 17. Agitador tipo vórtex

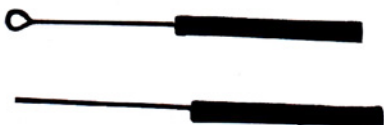


Figura 18. Alça e fio de platina

Agitador magnético com aquecimento

Equipamento para agitação e homogeneização de substâncias e/ou misturas líquidas, com ou sem controle de temperatura. Indispensável o uso de uma barra magnética no interior do recipiente em que o líquido se encontra, para que ocorra um campo magnético e, assim, a agitação.

Agitador tipo vórtex

Equipamento utilizado para homogeneização e agitação de amostras e/ou reagentes por movimento orbital e vibratório.

Alça e fio de platina

Instrumentos fabricados em platina e, portanto, altamente resistentes ao calor. Utilizados em práticas de microbiologia para transferência e/ou inoculação de culturas microbianas. A alça de platina pode apresentar calibrações diferentes, ou seja, diferentes diâmetros que permitam a coleta de um volume específico de produto.

Almofariz e pistilo

Geralmente fabricado em porcelana, é ideal para moagem e maceração de sólidos, bem como para mistura de vários ingredientes.



Figura 19. Almofariz e pistilo

Balança semianalítica e analítica

Equipamento de extrema importância nos laboratórios, utilizado para determinação mais precisa da massa de produtos/reagentes/amostras etc. A balança semianalítica apresenta precisão de até 0,001 g, enquanto a balança analítica apresenta maior precisão, de até 0,00001 g.

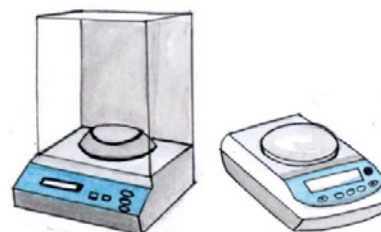


Figura 20. Balança analítica e semianalítica

Banho-maria

Utilizado para o aquecimento de substâncias que não podem ser expostas diretamente ao fogo. Utiliza água em temperatura regulável, aquecendo lentamente as substâncias.

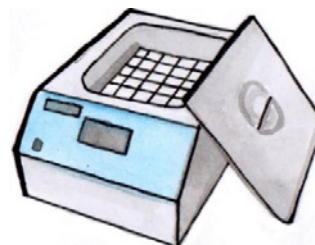


Figura 21. Banho-maria

Banho seco

Também conhecido como termobloco, tem a mesma função do banho-maria, porém não utiliza água. Consiste em um bloco de alumínio, que propicia aquecimento mais uniforme dos tubos.

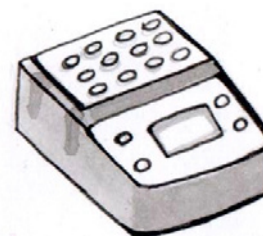


Figura 22. Banho seco

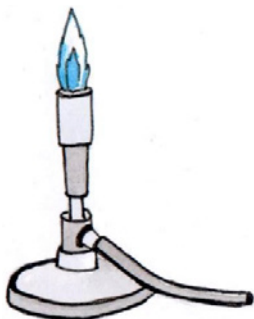


Figura 23. Bico de Bunsen

Bico de Bunsen

Equipamento fonte de calor, com fogo, utilizado para aquecer substâncias, preparar peças de vidro, esterilizar materiais etc. Apresenta em sua base uma válvula reguladora para entrada de ar e, consequentemente, regulação da temperatura da chama: quanto mais aberta a válvula, maior a entrada de ar e, assim, maior a energia da chama (chama azul = mais calor).

Cabine de segurança biológica

Equipamento que oferece proteção contra contaminações pelos produtos manipulados em seu interior. Também protege o usuário e o ambiente externo de contaminações oriundas do material que está sendo manipulado.

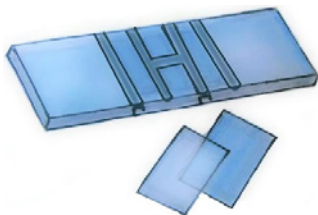


Figura 24. Câmara de Neubauer

Câmara de Neubauer

Dispositivo utilizado para realizar a contagem de partículas em suspensão, como células e microrganismos.

Capela de exaustão

Muito utilizada para manipulação de reagentes químicos e demais substâncias nocivas à saúde. Por meio de um sistema de exaustão, impede que essas substâncias se dissipem e contaminem o operador e o ambiente. Pode ser considerada um Equipamento de Proteção Coletiva. Dependendo do produto a ser manipulado, deve apresentar um sistema para neutralizar essa substância antes que seja enviada ao ambiente externo.

Centrífuga

Equipamento utilizado para separação de fases entre os elementos de uma mistura. A fase de maior densidade fica no fundo do tubo, e de menor densidade forma o sobrenadante, na parte superior. Todos os modelos apresentam diferentes rotores e adaptadores, que podem ser trocados dependendo do frasco em que se encontra a mistura, como tubos tipo Falcon, tubos de ensaio, microtubos, microplacas etc. Os diferentes modelos incluem:

Centrífuga refrigerada

com controle da temperatura no momento da centrifugação

Centrífuga de bancada

para centrifugação de amostras em menores volumes, com maiores possibilidades de troca de rotor e adaptador

Centrífugas piloto

para centrifugação de grandes volumes

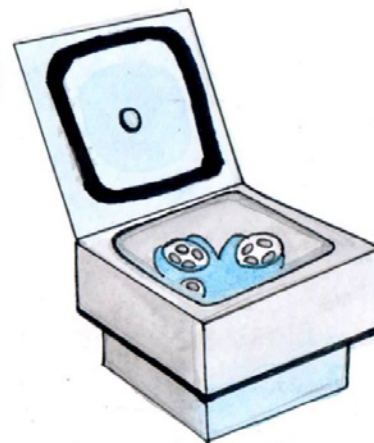


Figura 25. Centrífuga

Espátula

Geralmente fabricada em aço inox, apresenta uma das extremidades em forma de colher, e a outra é plana. Pode apresentar diferentes comprimentos e tamanhos (por exemplo, há microespátulas) e ser utilizada para as mais diversas finalidades, como: transferência de sólidos, principalmente em processos de pesagem; raspagem e mistura de substâncias/reagentes etc.



Figura 26. Espátula



Figura 27. Espectrofotômetro

Espectrofotômetro

Equipamento que mede a quantidade de luz absorvida ou transmitida por determinada substância diluída em um solvente.

O espectrofotômetro permite identificar e quantificar diferentes substâncias, uma vez que cada composto químico absorve, transmite ou reflete a luz de acordo com o comprimento de onda aplicado.

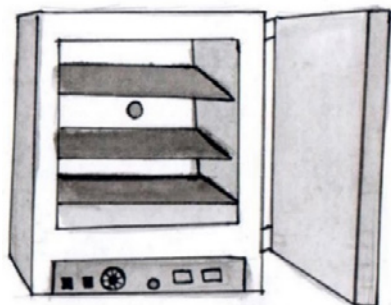


Figura 28. Estufa

Estufa

Equipamento com controle de temperatura para secagem e esterilização de materiais (neste último caso, é necessária uma temperatura mais elevada). Podem apresentar circulação natural de ar ou circulação forçada, sendo este último sistema ideal para trabalhos com amostras com alta umidade e que precisam de secagem de alta performance, com distribuição uniforme da temperatura.

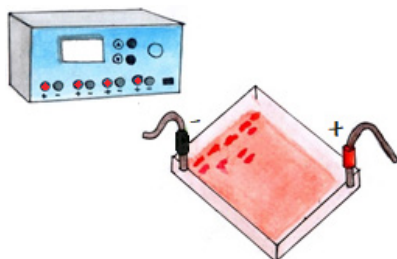


Figura 29. Fonte e cuba

Fonte e cuba para eletroforese

Instrumentos utilizados em práticas de biologia molecular, como na separação de moléculas de DNA e proteínas, assim como na separação e purificação de demais moléculas, considerando seus tamanhos, cargas e conformações.

Garrafa para cultivo celular

Frasco desenvolvido especialmente para o cultivo celular, ergonomicamente projetado para evitar contaminações, porém mantendo condições ideais para o crescimento das células. Apresenta superfície interna estéril e adequada para o cultivo de células aderentes e não aderentes.

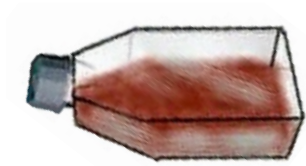


Figura 30. Garrafa para cultivo celular

Incubadora com agitação

Equipamento utilizado em experimentos que necessitam temperatura controlada e agitação constante, como análises bioquímicas, cultura para crescimento de microrganismos etc.

Manta aquecedora

Utilizada para um aquecimento controlado e uniforme de substâncias/reações, principalmente aquelas com solventes e outros produtos inflamáveis, que ficam em balões de vidro. Apresenta tamanhos variados, dependendo do volume do balão a ser utilizado.



Figura 31. Manta aquecedora



Figura 32. Micropipeta multicanal e monocal

Micropipeta

Dispositivo para sucção e dispensação de volumes muito pequenos e precisos de líquidos (normalmente de 0,1 μL até 1.000 μL , ou até 5.000 μL). O volume desejado deve ser primeiramente ajustado, mas sempre respeitando o volume mínimo e máximo de cada micropipeta, assim como deve-se utilizar a ponteira adequada para cada volume. Podemos encontrar dois tipos de micropipeta:

Monocal

com apenas um canal

Multicanal

com oito ou doze canais, pelos quais é possível aspirar o mesmo volume simultaneamente

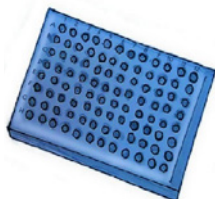


Figura 33. Microplaca

Microplaca

Placa constituída de múltiplos poços, que podem ser utilizados como pequenos tubos de ensaio, otimizando as reações, uma vez que requerem pequenas quantidades de reagentes e amostras. Apresenta características diferentes, que variam de acordo com a técnica utilizada. Pode ser empregada em técnicas de microbiologia, cultivo celular, biologia molecular, imunologia etc.



Figura 34. Microscópio

Microscópio

Equipamento amplamente utilizado nas mais diversas áreas para a observação de estruturas não visíveis a olho nu. Atualmente existem diferentes tipos: microscópio óptico, microscópio trinocular, microscópio de fluorescência, microscópio eletrônico de varredura, microscópio eletrônico de transmissão, microscópio invertido etc.

Microtubo

Recipiente para pequenos volumes de reagentes e/ou produtos, de 0,2 a 2,5 mL. Apresenta tampa acoplada e fundo cônico, sendo ideal para processos de centrifugação em mini ou microcentrífugas.



Figura 35. Microtubo

pHmetro

Equipamento indicador da acidez, neutralidade ou alcalinidade de amostras, a partir da determinação do potencial de hidrogênio (pH). Constituído de um eletrodo conectado a um potenciômetro que, submerso na amostra, detecta milivolts que são transformados para uma escala de pH.

Pipetador

Dispositivo que, acoplado às pipetas graduadas ou volumétricas, auxilia na sucção e transferência de líquidos. Existem, basicamente, dois tipos de pipetador:

Manual

do tipo pera e do tipo roldana, em que há a sucção e dispensação manual do líquido

Automático

com controle da velocidade de sucção e dispensação

Pisseta

Recipiente plástico utilizado para lavagem e enxague de material de laboratório, produzindo jatos de produtos como água destilada, álcool, água sanitária, detergente líquido, entre outros.

Se liga!

Utilize cada utensílio para sua finalidade específica. Dependendo do experimento, outros utensílios poderão ser requisitados. Certifique-se do uso correto de cada um.

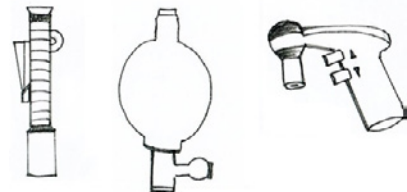


Figura 36. Pipetador manual tipo roldana, pipetador manual tipo pera e pipetador automático

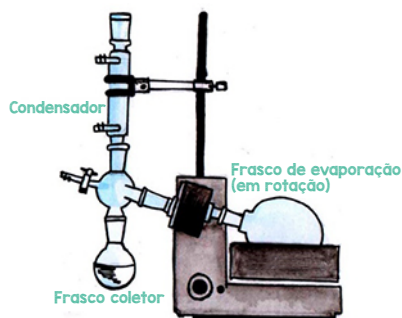


Figura 37. Rotaevaporador



Figura 38. Strip de microtubos

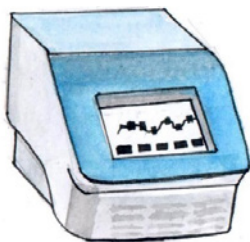


Figura 39. Termociclador

Rotaevaporador

Sabendo-se que as substâncias apresentam diferentes pontos de ebulição, esse equipamento utiliza o processo de destilação (evaporação, pelo calor, e condensação) para separar misturas homogêneas, principalmente para remoção de solventes voláteis de soluções.

Strips

Microtubos em tira, geralmente de 0,2 mL e com tampa óptica, ideais para realização da técnica de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) em tempo real.

Termociclador

Equipamento utilizado em práticas de biologia molecular e genética, no qual se é possível programar os ciclos de temperatura necessários para que ocorra a PCR. Ou seja, esse equipamento automatiza a amplificação *in vitro* dos fragmentos de DNA. Existe o termociclador para PCR convencional e para PCR em tempo real.

Transiluminador

Equipamento com luz ultravioleta, utilizado principalmente em práticas de biologia molecular e genética, para visualização dos fragmentos de DNA/RNA corados com corantes fluorescentes e obtidos a partir da separação pela técnica da eletroforese.

2. PRINCIPAIS CONCEITOS E TÉCNICAS

Além de conhecer os principais instrumentos, equipamentos e vidrarias de um laboratório, bem como suas aplicações, existe ainda uma série de conceitos e técnicas comuns a várias rotinas laboratoriais.

2.1. Principais conceitos

Desinfecção: processo que elimina parcialmente a carga microbiana depositada sobre as superfícies e demais materiais e objetos, eliminando principalmente bactérias na forma vegetativa, e alguns tipos de fungo e vírus. Pode ser realizada com métodos físicos por ação térmica, como a pasteurização, ou químicos, pelo uso de produtos químicos, como álcool, água clorada, peróxido de hidrogênio, entre outros.

Esterilização: processo que tem maior poder letal sobre os microrganismos, destruindo-os ou removendo-os completamente, podendo ser considerado como complementar à desinfecção. Pode -se alcançar a esterilização com diversos métodos, como:

- **radiação ultravioleta:** gerada artificialmente por lâmpadas de vapor de mercúrio, que emitem ondas de pequeno comprimento e alta energia. Ao penetrarem nas células dos microrganismos, essas ondas são absorvidas, alterando seu código genético e impossibilitando sua reprodução,

tornando-os inativos como resultado de um dano fotoquímico ao ácido nucleico;

- **vapor:** para esse tipo de esterilização utiliza-se um equipamento chamado de autoclave, que usa a ação combinada de temperatura, pressão e umidade, formando um vapor saturado que se difunde para dentro da membrana celular dos microrganismos, produzindo alterações químicas e, assim, destruindo todos os possíveis organismos vivos, até mesmo os esporos mais resistentes;

- **calor seco:** não apresenta a característica de penetração na célula microbiana como o calor úmido (vapor), e por isso exige temperaturas muito elevadas e maior tempo de exposição. Dessa forma, deve ser considerado apenas para materiais que não podem ser submetidos ao calor úmido. A esterilização por calor seco se dá através de flambagem, incineração, estufas e raios infravermelhos;

- **filtração:** processo normalmente empregado sempre que se deseja eliminar os microrganismos de soluções termolábeis ou gases. Esse processo difere das demais técnicas de esterilização porque não envolve a destruição dos microrganismos, mas os remove por meio da passagem por filtros com poros suficientemente pequenos, capazes de excluir a maioria deles. Em virtude disso, torna-se necessário uma segunda filtração, seguida da primeira, usando um filtro ainda menor.

Vale destacar que sempre se deve levar em consideração a compatibilidade entre o processo escolhido e a matéria-prima do objeto/solução/reagente ou superfície que se deseja desinfetar e/ou esterilizar.

Ambos os processos são de suma importância em ambientes de pesquisa e podem ser realizados antes e após cada experimento, garantido assim sua qualidade, bem como a saúde do pesquisador e demais usuários.

Água de laboratório: a água é uma das principais matérias-primas e solventes utilizados nos laboratórios, independentemente da prática empregada. Dessa forma, a água utilizada deve ser de qualidade e devidamente escolhida conforme sua necessidade. A água também pode ser de diferentes tipos:

- **água deionizada:** para produção dessa água, ela deve passar por um equipamento chamado de deionizador ou desmineralizador, no qual, por meio de uma coluna composta por resinas trocadoras de íons, ocorre a remoção cátions (+) e ânions (-). Assim, a água deionizada apresenta muito baixa condutividade elétrica devido à remoção das cargas. Porém, não se eliminam substâncias orgânicas. A água deionizada é empregada no preparo de soluções químicas em que há necessidade de solubilização de sais e íons, tais como as soluções tampão e em diluições de ácidos e bases;

- **água destilada:** é obtida pelo processo de destilação. A água é inicialmente aquecida até entrar em ebulição. Então, seu vapor entra em contato com uma superfície resfriada e condensa, obtendo-se assim o produto destilado. Durante esse processo, algumas substâncias são volatilizadas e há desnaturação (inativação) dos microrganismos. Muito utilizada em processos de biologia molecular e biotecnologia;

- **água ultrapura:** água de extrema pureza, livre íons, microrganismos e demais partículas. Obtida por meio de equipamentos que apresentam um conjunto de processos, como resinas de troca iônica, filtros para retenção de partículas e microrganismos, osmose reversa, radiação ultravioleta, entre outros. É utilizada na produção de soluções e reagentes para biologia molecular, meios de cultura em microbiologia, análises cromatográficas, cultivo celular etc.

Existem águas ultrapuras que, por passarem por mais alguns processos, apresentam características ainda mais únicas, livres de qualquer contaminante, como águas livres de DNA e RNA, águas livres de DNase e RNase (enzimas capazes de degradar DNA e RNA), águas livres de pirogênicos e endotoxinas (restos e vestígios de microrganismos ou de seus metabolismos). Essas geralmente são compradas prontas, e requerem sistemas de purificação muito mais caros.

2.2. Principais técnicas

2.2.1. Aferição de volumes líquidos

A correta aferição de volumes líquidos pode ser a chave para o sucesso de seu experimento. A fim de garantir a correta leitura desses volumes, o cuidado com as vidrarias volumétricas é indispensável, uma vez que a expansão e a contração provocadas pela variação de temperatura interferem na exatidão do objeto. Além disso, outro ponto crítico é a leitura do menisco.

Menisco nada mais é do que a curvatura que um líquido apresenta em sua superfície devido à tensão superficial existente entre a interface ar e líquido. O menisco pode ser côncavo (curva para baixo) ou convexo (curva para cima) (Figura 40). Em um menisco côncavo, as moléculas do recipiente atraem fortemente as moléculas dos líquidos (adesão), enquanto em um menisco convexo existe uma maior força de atração entre as moléculas do próprio líquido (coesão).

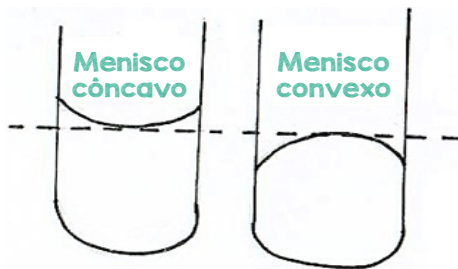


Figura 40. Meniscos

Alguns recipientes de laboratório, como as pipetas graduadas e volumétricas, provetas, balões e buretas, apresentam uma escala de graduação, e neles o volume desejado deve ser ajustado a partir da comparação do nível do líquido, a partir de seu menisco, com as linhas de calibração existentes no recipiente. A seguir vão algumas considerações para a correta aferição de volumes líquidos:

1º O ajuste do menisco sempre deve ser feito com o recipiente volumétrico na posição vertical, sempre apoiado em uma superfície plana e com os olhos do operador na altura do menisco, evitando assim o erro de paralaxe, fenômeno que ocorre pela observação errada da escala de graduação do instrumento, causada por um desvio óptico devido ao ângulo de visão do observador.

2º Para líquidos com maior força de adesão (**menisco côncavo**), o ajuste deve ser feito de maneira que o ponto inferior do menisco tangencie horizontalmente a borda superior da linha de calibração.



Figura 41. Como ajustar o volume de um líquido observando um menisco côncavo

Para líquidos com maior força de coesão (**menisco convexo**), o ajuste deve ser feito de maneira que o ponto superior do menisco tangencie horizontalmente a borda superior da linha de calibração.



Figura 42. Como ajustar o volume de um líquido observando um menisco convexo

Se liga!

Cuide para não ocorrer formação de bolhas.

Não se recomenda a retirada de volumes. Para alcançar o menisco, ao aproximar-se da linha de calibração, adicione líquido vagarosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, pisseta ou até mesmo escorrendo o líquido pelas paredes do recipiente com o auxílio de um bastão de vidro.

No caso de pipetas graduadas ou volumétricas, sugere-se aspirar o líquido uma primeira vez até ultrapassar a linha de calibração (com cuidado para não entrar líquido no pipetador) e dispensar. Em seguida, aspirar novamente, lentamente, até alcançar o volume desejado.

2.2.2. Técnicas de pipetagem com micropipetas

Como citado anteriormente, micropipetas são dispositivos utilizados quando se necessitam volumes muito pequenos e precisos, como de 1 μL , ou seja, um milionésimo de litro (1/1.000.000). A qualidade do equipamento, sua manutenção e calibração periódicas, bem como o conhecimento e a destreza do operador durante o manuseio são fatores fundamentais que garantem análises e resultados de qualidade.

A seguir vão algumas definições, procedimentos e dicas para uma pipetagem correta:

1º A amplitude de volumes medidos pelos micropipetadores varia entre os modelos e os fabricantes. De modo geral, micropipetadores ajustáveis são denominados pelo seu volume máximo, como, por exemplo:

Tabela 1. Volume dos micropipetadores

Pipeta	Volume medido
P ₂	0,1 a 2 μL
P ₂₀	2 a 20 μL
P ₁₀₀	10 a 100 μL
P ₂₀₀	20 a 200 μL
P ₁₀₀₀	100 a 1.000 μL
P ₅₀₀₀	1.000 a 5.000 μL

2º Nunca gire o calibrador de volume acima dos limites superiores e inferiores de volume do micropipetador.

3º Utilize ponteiros de qualidade, sempre limpas, muito bem secas e adequadas para a faixa de volume da micropipeta escolhida.

4º Ajuste lentamente o volume desejado com o dispositivo giratório, observando o alinhamento exato no display indicativo do volume (volúmetro).

5º Encaixe a micropipeta na ponteira com movimentos circulares.

6º Sempre mantenha o ângulo de imersão da ponteira no líquido o mais vertical possível.

7º Respeite a profundidade de imersão da ponteira no líquido, de modo a não imergir demais, evitando que gotículas na parede externa da ponteira interfiram no volume desejado, e garantindo que a ponta da ponteira permaneça imersa durante toda aspiração.

8º Pressione o embolo de maneira lenta e constante, tanto na aspiração quanto na dispensação.

9º Realize uma “pré-lavagem” da ponteira com o mesmo líquido a ser utilizado (aspirar e dispensar algumas vezes o líquido antes de iniciar o procedimento).

Além desses cuidados básicos, outro ponto muito importante é o ajuste do volume. Mas antes é fundamental conhecer as unidades de medidas e suas conversões. As unidades de medidas de líquidos mais utilizadas em práticas laboratoriais são o mililitro (mL) e o microlitro (µL), sendo:

Tabela 2. Conversões entre litro, mililitro e microlitro

$1.000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$
$1 \text{ mL} = 0,001 \text{ L}$
$1 \text{ mL} = 1.000 \text{ µL};$
$1.000.000 \text{ µL} = 1 \text{ L};$
$1 \text{ µL} = 0,000001 \text{ L}$

A partir desse conhecimento, podemos ajustar o volume no micropipetador, atentando-nos para:

1º Reconheça o micropipetador e o volume que ele pode pipetar (P2, P20, P100 etc.).

2º Reconheça a respectiva ponteira que pode ser utilizada.

3º Ajuste o volume: o volume a ser medido é visualizado a partir do visor (volúmetro). Ele geralmente apresenta três casas, que devem ser lidas de cima (dígito mais significativo) para baixo (dígito menos significativo). Na base do visor há também um marcador (pequena seta) que é utilizado para ajustar volumes intermediários mais exatos (Figura 43).

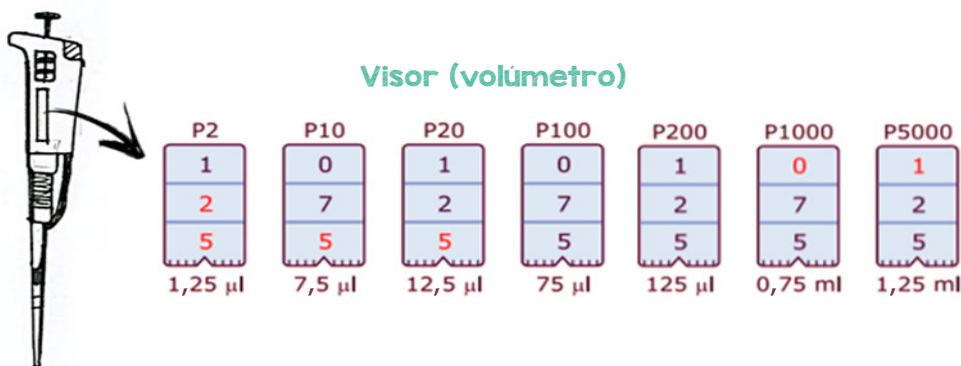


Figura 43. Exemplo de como ajustar os volumes em micropipetas observando o volúmetro

Fonte: adaptado de *Manual de operação da Pipetman P* (ANALÍTICA, 2007).

Em micropipetadores P1000 e P5000, a primeira casa (superior) é vermelha, e isso significa que o volume ajustado deve ser multiplicado por 10 para de fato se ter o volume correto. Por exemplo: ao ajustar 050 em uma micropipeta P1000, significa que o volume necessário é de 500 µL, pois $050 \times 10 = 500$. Ou ainda, 175 em uma micropipeta P5000 significa que o volume necessário é de 1.750 µL (ou 1,75 mL), pois $175 \times 10 = 1.750$. A partir disso também é possível saber o menor valor a ser medido nessas micropipetas, pois 010 em uma micropipeta P1000 é igual a 100 µL (010×10) e essa micropipeta mede somente a partir de 100 µL.

Micropipetadores P100 e P200 são os mais fáceis de visualizar e para compreender os volumes, sendo que 200 em uma

micropipeta P200 significa 200 µL, 100 significa 100 µL, 050 significa 50 µL e 020 significa 20 µL (seu menor volume). O mesmo vale para uma micropipeta P100: 100 significa 100 µL, 075 significa 75 µL e 010 significa 10 µL (seu menor volume).

Já os micropipetadores de menor volume, P2, P10 e P20, apresentam as últimas casas vermelhas, representando o decimal do volume, ou seja, o número depois da vírgula. Por exemplo: em uma micropipeta P2 ajustar 200 significa 2 µL (seu maior volume), 145 significa 1,45 µL e 010 significa 0,1 µL (seu menor volume). Em uma micropipeta P10 ajustar 100 significa 10 µL e 075 significa 7,5 µL. Por fim, em uma micropipeta P20 ajustar 200 significa 20 µL (seu maior volume), 125 significa 12,5 µL e 010 significa 1 µL (seu menor volume).

Nota: para diminuir o volume, chegue vagarosamente ao valor desejado e não ultrapasse sua posição. Para aumentar o volume, ultrapasse o volume desejado girando cerca de 1/3 de volta o calibrador de volume, e então diminua vagarosamente o volume até chegar ao desejado, não ultrapassando o medidor.

A partir desses conhecimentos prévios, podemos seguir com as técnicas de pipetagem. As mais utilizadas são a **pipetagem direta** e a **pipetagem reversa**:

Pipetagem direta: técnica mais usual de pipetagem, indicada para a maioria das soluções líquidas. Utiliza o segundo estágio como etapa para a dispensa total do líquido (Figura 44).

1º Preparação: após ajustar o volume desejado e encaixar a ponteira, segure a micropipeta em posição vertical e pressione o embolo lentamente até a posição do primeiro estágio.

2º Aspiração: imerja a ponteira no líquido e solte lentamente o embolo até sua posição de repouso (aguardar um segundo para que o líquido se acomode dentro da ponteira).

3º Transferência: encoste a ponta da ponteira na parede interna do outro recipiente, a um ângulo de 10° a 45°, e pressione lentamente o embolo até a posição do primeiro estágio.

4º Esgotamento: encoste a ponta da ponteira em outra região da parede interna do recipiente e pressione o embolo até a posição do segundo estágio.

5º Repouso: solte lentamente o embolo até a posição de repouso.

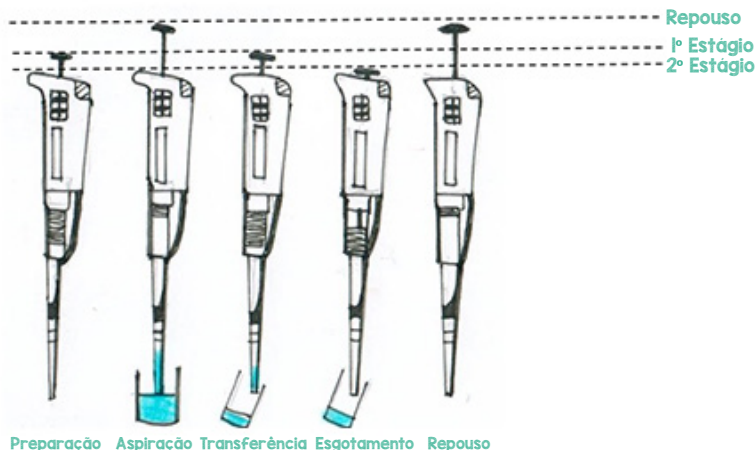


Figura 44. Pipetagem direta

Pipetagem reversa: técnica indicada para líquidos de difícil manipulação, como líquidos voláteis e viscosos, reduzindo erros na transferência de volumes. Diferentemente da pipetagem direta, essa técnica utiliza o segundo estágio como etapa para a aspiração do líquido.

Como a etapa de preparação já inicia com o embolo no segundo estágio, um volume adicional de líquido é somado ao volume ajustado na micropipeta, compensando assim perdas por gotejamento ou evaporação. Entretanto, deve-se observar que o volume total (preenchido pelo primeiro e segundo estágios) não pode ultrapassar a capacidade máxima da ponteira. Recomenda-se sempre ajustar o volume para no máximo 80% da capacidade da ponteira. Ex.: para uma ponteira de 100 µL, pipetar no máximo 80 µL (deixando espaço para o volume adicional oriundo do segundo estágio).

1º Preparação: após ajustar o volume desejado e encaixar a ponteira, segure a micropipeta em posição vertical e pressione o embolo lentamente até a posição do segundo estágio.

2º Aspiração: imerja a ponteira no líquido e solte lentamente o embolo até sua posição de repouso (aguardar um segundo para que o líquido se acomode dentro da ponteira).

3º Transferência: encoste a ponta da ponteira na parede interna do outro recipiente, a um

ângulo de 10° a 45°, e pressione lentamente o embolo até a posição do primeiro estágio.

Nota: caso você continue pipetando uma mesma amostra, mantenha o embolo na posição do primeiro estágio e siga com a etapa de aspiração.

4º Descarte: se precisar trocar de ponteira, descarte o volume adicional em outro recipiente, pressionando o embolo até o segundo estágio.

5º Repouso: soltar lentamente o embolo até sua posição repouso.

Como são muito utilizadas em técnicas de biologia molecular e genética, que exigem muitos cuidados quanto a contaminações, recomenda-se limpar a superfície externa sempre antes e após o manuseio das micropipetas. Para isso, pode-se utilizar papel toalha umedecido com álcool 70%, seguido de exposição a luz ultravioleta por 15 minutos. Além disso, outros cuidados básicos devem ser observados, como guardar a micropipeta sempre na posição vertical, preferencialmente com o volume ajustado em seu máximo; nunca virar a pipeta quando houver ponteira com líquido; evitar aspirações do líquido para dentro da pipeta; realizar a devida limpeza interna e calibrações conforme orientações do fabricante.

2.2.3. Técnicas de pesagem

Assim como a correta aferição de volumes, a determinação de massas é procedimento fundamental em diversos experimentos laboratoriais. As balanças semianalíticas e analíticas são os instrumentos utilizados e, devido a sua sensibilidade e precisão, requerem conhecimento e cuidados na sua manipulação. Existem alguns cuidados básicos que devem ser observados:

- certifique-se de que a balança esteja bem nivelada;
- dependendo da precisão da balança, recomenda-se a utilização de mesas antivibratórias ou recortes no entorno da balança, evitando que a vibração da superfície interfira nos resultados;
- balanças são muito sensíveis a variações de temperatura, correntes de ar e variações da rede elétrica; dessa forma, certifique-se do melhor local para sua instalação e evite a transferência de local;
- ligue a balança e aguarde cerca de 30 minutos para seu uso, garantido sua estabilização;
- posicione o objeto a ser pesado bem no centro do prato de pesagem;
- no caso de substâncias, nunca as deposite diretamente sobre o prato de pesagem. Para isso, utilize o recipiente mais adequado, devendo este estar muito bem seco e previamente tarado;

- nunca ultrapasse o limite máximo de peso da balança (nesse caso, deve-se considerar a soma de peso do recipiente e da substância);
- realize movimentos suaves e manuseie os objetos ou as substâncias sempre com luvas, ou com utensílios mais adequados, como pinças, espátulas etc.;
- certifique-se de que os materiais a serem pesados estejam à temperatura ambiente;
- após o uso, realize a devida limpeza e cubra a balança, evitando o acúmulo de poeira;
- realize as devidas manutenções e calibrações.

Além desses cuidados, recomenda-se a leitura do manual, uma vez que a operação varia entre modelos e fabricantes. Entretanto, os métodos mantêm-se os mesmos: **pesagem por adição** e **pesagem por diferença**, sendo o primeiro mais comumente utilizado.

Pesagem por adição: de modo geral, independentemente da marca e modelo da balança, a pesagem por adição segue os seguintes passos:

- 1º Certifique-se da ausência de vibrações e correntes de ar.
- 2º Ligue, zere e aguarde a estabilização da balança.

3º Posicione o recipiente bem no centro do prato de pesagem.

4º Realize a tara do recipiente (procedimento que desconta sua massa), zerando a balança.

Nota: caso a balança apresente “portinhhas”, realize a tara com elas fechadas.

5º Com o auxílio de uma pinça ou espátula, vá adicionando vagarosamente a substância a ser pesada.

Nota: nessa etapa deve-se cuidar para que o material não caia sobre o prato de pesagem (fora do recipiente) e não ultrapasse o peso desejado, bem como que não ultrapasse o limite de carga de balança.

6º Realize a leitura no display da balança.

Nota: caso a balança apresente “portinhhas”, realize a leitura com elas fechadas.

2.2.4. Correta limpeza e descontaminação de vidrarias e secagem

Além de realizar corretamente os procedimentos relacionados diretamente com os experimentos, como a pesagem, pipetagem, manuseio de equipamentos e vidrarias, a

correta limpeza e descontaminação de materiais também são indispensáveis para obtenção de resultados confiáveis e de qualidade.

Resíduos químicos, biológicos e demais sujidades podem levar à contaminação de amostras e reagentes, bem como interferir no volume ou peso finais. Dessa forma, deve-se realizar lavagem e descontaminação com técnicas que levem em consideração o tipo de sujeira e o tipo de material do utensílio:

Lavagem convencional: para limpeza e desinfecção.

1º Realize o devido descarte da amostra/reagente.

2º Enxague com água corrente.

3º Lave com sabão ou detergente neutro e uma esponja ou pano macio (evite o uso de materiais ou substâncias abrasivos).

4º Remova o sabão completamente com água corrente. Para esse processo, recomenda-se encher 1/3 do recipiente com água corrente e agitar bem, garantindo que a água passe por toda a parte interna do recipiente. Repita esse procedimento no mínimo três vezes, ou até que se elimine toda a espuma.

5º Finalize enxaguando com água destilada, de duas a três vezes.

Se liga!

A lavagem deve ser realizada imediatamente após o uso. Caso não seja possível, recomenda-se deixar a vidraria de molho em água ou, se necessário, em outra substância.

Em alguns casos, recomenda-se enxaguar com água sanitária ou álcool 70% antes do último enxague com água destilada.

Esterilização: para descontaminação de utensílios contaminados com material biológico.
1º Realize o devido descarte da amostra/reagente.

2º Autoclave o utensílio.

Nota: muitas vezes é necessário primeiro autoclavar o material para, então, descartá-lo; vidrarias volumétricas não devem ser expostas a esse processo.

3º Siga com a lavagem convencional.

Secagem:

- A secagem de vidrarias e utensílios volumétricos deve ser feita à temperatura ambiente e protegida, de forma a não permitir o depósito de poeira.

- Imediatamente após estarem secos, os materiais devem ser guardados.
- Aparatos não volumétricos podem ser secos em estufa (cerca de 60 °C, por 24 horas).

Ainda em relação à limpeza, bancadas e pisos devem ser limpos diariamente, assim como utensílios e instrumentos utilizados. Recomenda-se uma limpeza mensal mais pesada, que deve incluir teto, paredes, janelas e bancadas sob os equipamentos (sempre com ajuda e com cuidado para não desestabilizar equipamentos).

3. IDENTIFICAÇÃO E CORRETO ARMAZENAMENTO DE MATERIAIS

Boas práticas laboratoriais também exigem a correta identificação e armazenamento dos materiais de laboratório. A fim de garantir maior segurança aos usuários e maior organização do ambiente, algumas regras devem ser estabelecidas e cumpridas de maneira fidedigna, a saber:

- Todos os materiais de um laboratório, sejam eles armazenados em armários, geladeiras, freezer ou demais ambientes, devem estar facilmente identificados. Essa identificação é, geralmente, feita com uma etiqueta fixada na embalagem. É importante que nessa etiqueta conste: [1] o que é o item; [2] composição; [3] concentração; [4] nome do responsável; [5] nome do professor responsável; [6] data de produção; e [7] data para descarte (validade) (Figura 45).

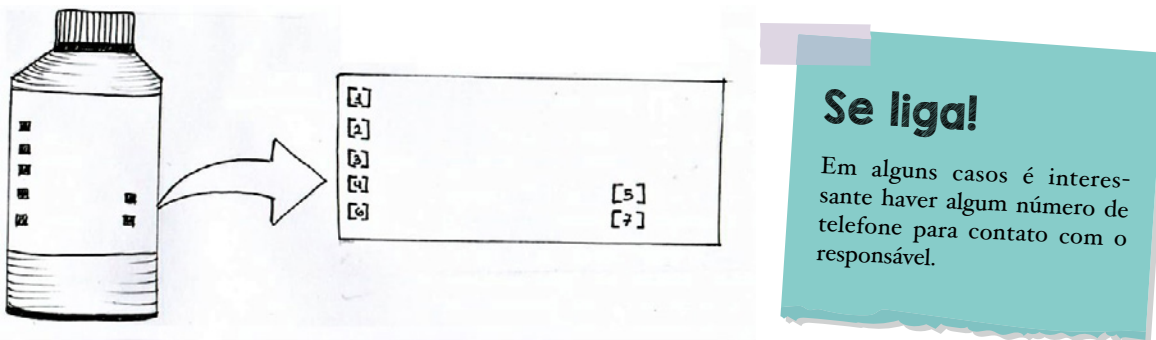


Figura 45. Modelo de etiqueta para identificação de soluções

- Materiais não identificados não devem ser acumulados no laboratório e devem ser descartados imediatamente após sua identificação, seguindo a metodologia para descarte de material de laboratório. Caso não seja possível sua identificação, o descarte deve seguir diretrizes de descarte de material “não identificado”. Para isso, consulte o funcionário técnico dos laboratórios. Ainda sobre materiais não identificados, os usuários deverão ter ciência de que poderão ser descartados.
- Não se deve armazenar reagentes/soluções/amostras em vidrarias volumétricas de laboratório, como béqueres, balões volumétricos, provetas e erlenmeyeres, pois as diferentes temperaturas em que serão armazenadas podem influenciar na dilatação do vidro, perdendo assim sua função volumétrica. Além disso, ao armazenar reagentes/soluções/amostras nessas vidrarias, elas poderão fazer falta em demais experimentos. Existem frascos específicos para armazenar esses materiais.
- Verifique se o seu reagente/solução/amostra é compatível com o material do frasco a ser armazenado e se as substâncias armazenadas são compatíveis entre si. Além disso, verifique se o frasco é adequado para ser armazenado sob baixas ou altas temperaturas.
- Verifique sempre o correto fechamento de embalagens e demais recipientes, evitando assim a contaminação ou deterioração de amostras ou reagentes. Além disso, respeite orientações das embalagens quanto à temperatura de armazenamento e demais condições.
- Verifique se seu reagente/solução/amostra necessita ser armazenado protegido da luz. Para isso, utilize frascos âmbar.
- Caso esteja utilizando um reagente ou solução de uso comum a mais de um laboratório, comunique quando estiver

acabando, ou organize uma rotina para que aquele que utilizou a última porção do reagente já prepare mais dele, identificando-o da maneira correta.

- Ao final de seu projeto/pesquisa, comprometa-se com o correto descarte de seus materiais ou, se for o caso, organize e passe todas as informações referentes a eles para o próximo usuário.

4. ORGANIZAÇÃO DO AMBIENTE E REVISÃO DE PROTOCOLOS

Visando a segurança do pesquisador, da pesquisa e do ambiente de trabalho, é fundamental que se mantenha uma boa organização do laboratório, bem como das atividades a serem realizadas.

Para isso, como citado no capítulo anterior, reagentes, soluções e amostras devem ser devidamente identificados e armazenados. Assim como os equipamentos, que também devem ser devidamente utilizados, limpos e guardados após o uso. Além disso, destaca-se a revisão e cumprimento de protocolos.

Organização do ambiente: é importante observar algumas ações em relação à organização do ambiente antes de iniciar qualquer experimento.

- Se o laboratório for de uso compartilhado, reserve o equipamento/material com antecedência.
- Faça uma lista dos materiais, reagentes e equipamentos necessários para o experimento.
- Caso seu experimento necessite de água destilada/deionizada, por exemplo, certifique-se de que o laboratório dispõe da quantidade necessária. Ou, se for o caso, se o seu material se encontra autoclavado e seco.
- Verifique se todos os materiais e equipamentos se encontram disponíveis no laboratório; caso contrário, converse com o técnico do laboratório sobre como poderia ser resolvida a situação e a possibilidade de conseguir emprestado de outro laboratório. Se necessário, encomende somente a quantidade de que for precisar.
- Higienize a bancada antes de iniciar qualquer experimento. Também utilize luvas enquanto estiver trabalhando, para evitar contaminação do experimento e de si próprio.
- Organize a bancada mantendo somente os materiais que irá utilizar. Se for utilizar os materiais e equipamentos por mais dias, coloque um aviso com “experimento em andamento”, por exemplo, e sua identificação.
- Após o uso, desligue, limpe, feche e guarde todo o material utilizado.
- Mantenha as vidrarias o menor tempo possível de molho ou secando em estufas. Lembre-se que elas poderão ser necessárias para demais experimentos.
- Observe e mantenha o correto armazenamento de vidrarias e demais materiais dentro dos armários.

Além de manter boa organização do ambiente de trabalho, **a revisão e o**

cumprimento de protocolos também são ações de planejamento que garantem o bom andamento do experimento, assim como evitam desperdícios, acidentes e eventuais surpresas.

Nunca inicie um experimento sem o seu devido planejamento! Para isso, utilize protocolos. Estes podem ser obtidos com outro pesquisador do laboratório, de um livro de protocolos ou pela seleção de métodos publicados em artigos científicos. Após sua obtenção, deve-se:

- ler, interpretar e avaliar o protocolo;
- certificar-se se há os reagentes necessários e se os equipamentos estão disponíveis e, se preciso, reserve os equipamentos e encomende os reagentes que faltam;
- caso você esteja fazendo o experimento pela primeira vez, siga exatamente o protocolo;
- se for necessário, mude o protocolo baseado em sua experiência com ele e reescreva-o;
- após a execução do protocolo e comprovação de seu bom andamento, mantenha-o disponível em seu laboratório para demais usuários.
- **Somente após tudo ter sido planejado e organizado, inicie seu experimento!**

5. CÁLCULOS BÁSICOS E PREPARO DE SOLUÇÕES

O preparo de reagentes e soluções com composição e concentrações conhecidas é uma etapa crítica de qualquer experimento. Agora que você já conhece as principais

técnicas e métodos de aferição e pesagem de volume e massa, chegou a hora de conhecer os principais cálculos utilizados para o preparo de reagentes e soluções. Antes, é importante compreender alguns dos principais conceitos:

Soluto: substância que será dissolvida em um solvente, com o propósito de fazer uma solução.

Solvente: substância na qual o soluto será dissolvido; seu estado físico permanece preservado após a dissolução do soluto.

Solução química: é uma mistura homogênea do soluto e do solvente.

Concentração: massa do soluto presente em um volume conhecido de uma solução.

Solução estoque: solução mais concentrada, utilizada para preparar uma nova solução menos concentrada.

Diluição: adição de um volume de solvente em uma solução já existente, a fim de diminuir a concentração da solução inicial.

Molaridade: número de moles do soluto dissolvido por litro em uma solução.

Molalidade: número de moles do soluto dissolvido em um quilo de solução.

Apresentamos a seguir uma descrição rápida e direta dos principais cálculos utilizados no preparo de soluções e demais metodologias analíticas:

Concentração comum

A concentração comum se refere à relação existente entre a quantidade do soluto (massa do que será dissolvido) e o volume da solução. O Sistema Internacional de Medidas (SI) atribui à concentração comum a unidade g/L (gramas por litro, g L⁻¹), demonstrando assim a quantidade de soluto presente em cada litro da solução. Porém, você ainda pode expressá-la em outras unidades de massa e volume, como g/m³, mg/L, kg/mL. Matematicamente, ela é expressa pela fórmula:

$$C = \frac{m}{v}$$

Sendo: C = concentração comum (g/L);
m = massa do soluto (g); e v = volume da solução (L).

Vale lembrar que o “C” representa a concentração **comum**, pois ainda existem outras maneiras de demonstrar e calcular tipos concentração, como concentração molar, concentração em ppm (partes por milhão), concentração por título ou porcentagem em massa, concentração em volume etc.

Exemplo

Quantos gramas de um soluto devem ser utilizadas para preparar 500 mL de uma solução a uma concentração de 80 g/L?

$$C = 80 \text{ g/L}$$

$$m = ?$$

$$v = 500 \text{ mL} \rightarrow 1 \text{ L} \text{ --- } 1.000 \text{ mL}$$

$$v \text{ --- } 500 \text{ mL}$$

$$v = 0,5 \text{ L}$$

Aplicando a fórmula:

$$C = \frac{m}{v} \rightarrow 80 = \frac{m}{0,5} \rightarrow 80 \times 0,5 = m \rightarrow 40 = m$$

Ou seja, você deve diluir 40 g do soluto em 500 mL de solvente, para obter uma solução a uma concentração de 80 g/L.

Concentração molar

Representa a quantidade do soluto, em número de mol (quantidade de matéria), dissolvida em um volume de solução, em litros. Também é conhecida por molaridade, entretanto, devido à semelhança e possíveis confusões com o termo molalidade, recomenda-se utilizar os termos concentração molar, concentração em mol/L ou ainda concentração em quantidade de matéria.

É o tipo de concentração mais utilizado nos laboratórios, sendo recomendado pelo SI, facilitando, assim, as informações entre laboratórios nacionais e internacionais. É representada pela letra “M” e expressa em **mol/L** (mols por litro, mol L^{-1}). Caso o volume da solução esteja em outra unidade de medida, como mL, cm^3 , entre outros, é necessário converter em litro antes de realizar o cálculo.

Para calcular a concentração molar, utilizamos a seguinte fórmula:

$$M = \frac{m}{MM \cdot v}$$

Sendo: M = concentração molar (mol/L); m = massa do soluto (g); MM = massa molecular (g/mol); e v = volume da solução (L).

Você pode calcular a massa molecular (ou molar) de uma molécula pela soma das massas atômicas de cada átomo que compõe respectiva molécula. Para isso, você deverá ter em mãos uma tabela periódica. Ou ainda, você pode obtê-la a partir da embalagem do produto, na qual, normalmente, a massa molecular é expressa pelo símbolo MM (massa molecular) ou PM (peso molecular).

Exemplo I

Qual será a concentração molar de uma solução de 250 mL na qual foram diluídos 27 g de NaCl?

$M = ?$

$m = 27 \text{ g}$

$MM = 58,44 \text{ g/mol} \rightarrow 22,99 \text{ g/mol (Na)} + 35,45 \text{ g/mol (Cl)}$

$v = 250 \text{ mL} \rightarrow 1 \text{ L} \text{ ---- } 1.000 \text{ mL}$

$v \text{ ---- } 250 \text{ mL}$

$v = 0,25 \text{ L}$

Se liga!

Uma solução de 5 M apresenta uma concentração molar de 5 mol/L, uma vez que $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$.

Aplicando a fórmula:

$$M = \frac{m}{MM \cdot v} \rightarrow M = \frac{27}{58,44 \cdot 0,25} \rightarrow M = \frac{27}{14,61} \rightarrow M = 1,85$$

Ou seja, 250 mL de uma solução na qual foram diluídos 27 g de NaCl apresenta concentração molar igual a 1,85 mol/L (ou 1,85 M).

Exemplo 2

Quantos gramas de soluto devo diluir para obter 50 mL de uma solução de EDTA sal dissódico a 0,125 mol/L?

$$M = 0,125 \text{ mol/L}$$

$$m = ?$$

$$MM = 372,24 \text{ g/mol (massa molecular do EDTA sal dissódico, conferido na embalagem)}$$

$$v = 50 \text{ mL} \rightarrow 1 \text{ L} \text{ --- } 1.000 \text{ mL}$$

$$v \text{ --- } 50 \text{ mL}$$

$$v = 0,05 \text{ L}$$

Aplicando a fórmula:

$$M = \frac{m}{MM \cdot v} \rightarrow 0,125 = \frac{m}{372,24 \cdot 0,05} \rightarrow 0,125 = \frac{m}{18,61} \rightarrow 2,33 = m$$

Ou seja, para preparar 50 mL de uma solução de EDTA a 0,125 mol/L, você vai precisar de 2,33 g de EDTA, completando o volume para 50 mL do solvente.

Diluição

Diluir uma solução nada mais é do que adicionar a ela um volume de solvente puro, ou ainda preparar uma nova concentração de solução a partir de uma solução estoque, uma vez que em práticas laboratoriais soluções estoque são frequentemente compradas e armazenadas em formas muito concentradas.

Ao diluir uma solução, a massa de seu soluto não se altera, porém seu volume e concentração sim. O volume da solução aumentará, pois será adicionada uma porção de solvente, e a concentração diminuirá. Veja que volume e concentração são grandezas inversamente proporcionais, ou seja, enquanto o volume aumenta, a concentração diminui

nas mesmas proporções. Você pode calcular a diluição de uma solução a partir da fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Sendo: C_i = concentração inicial;
 V_i = volume inicial; C_f = concentração final;
e V_f = volume final.

Lembrando que a concentração e o volume podem ser expressos em qualquer unidade de medida, porém sempre devem ser iguais, ou seja, C_i e C_f ambos na mesma unidade de medida, assim como V_i e V_f entre si. Caso necessário, antes da realização do cálculo da diluição, observe e transforme suas unidades de medida.

Exemplo

Um laboratório tem uma solução estoque de HCl a 3 mol/L. Qual o volume necessário para preparar 1.500 mL de uma nova solução do mesmo ácido a uma concentração de 1,4 mol/L?

$$C_i = 3 \text{ mol/L}$$

$$V_i = ?$$

$$C_f = 1,4 \text{ mol/L}$$

$$V_f = 1.500 \text{ mL}$$

Aplicando a fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \rightarrow 3 \cdot V_i = 1,4 \cdot 1.500 \rightarrow 3 \cdot V_i = 2.100 \rightarrow V_i = \frac{2.100}{3} V_i = 700$$

Ou seja, você vai precisar de 700 mL da solução inicial de HCl (3 mol/L), completando até o volume final de 1.500 mL com água ou outro solvente (através do ajuste do menisco em uma proveta ou balão volumétrico correspondente ao volume final da solução).

Ainda, para descobrir o volume de solvente a ser adicionado ao volume de solução inicial necessário, basta reduzir o valor encontrado (V_i) do volume final (V_f): $1.500 - 700 = 800$. Ou seja, você vai precisar dos 700 mL da solução inicial de HCl (3 mol/L) + 800 mL de água ou outro solvente.

Observe sempre as compatibilidades químicas e a ordem de adição dos reagentes (no caso de água, nunca a adicione diretamente ao ácido! Sempre ao contrário: adicione primeiramente uma porção de água, para então adicionar, vagarosamente, o volume necessário de ácido, e enfim completar com água novamente).

Soluções para corrigir pH

pH significa “potencial de hidrogênio” e está relacionado com a quantidade de íons de hidrogênio (H^+) presentes em uma solução ou em qualquer outro meio. De modo geral, quanto menor for o pH maior será a concentração de íons H^+ e menor será a concentração de íons OH^- , e vice-versa. Assim, o pH indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade das substâncias, sendo:

Tabela 3. Níveis de pH

pH	Característica
0 a 6,5	Ácido
6,5 a 7,5	Neutro
7,5 a 14	Básico/alcalino

Determinar o pH é um passo fundamental no preparo de qualquer solução na rotina laboratorial. Porém, muitas vezes o pH desejado não é o mesmo encontrado inicialmente e, por isso, deve ser feita sua correção utilizando soluções ácidas (quando deseja-se diminuir o pH) ou soluções alcalinas (quando deseja-se aumentar o pH). A seguir está o passo a passo para o preparo das soluções mais comumente utilizadas no ajuste de pH:

Preparo de solução alcalina: na prática, a solução alcalina mais comumente empregada para corrigir o pH é o hidróxido de sódio (NaOH). O volume e a concentração podem variar, conforme necessário, porém sugere-se preparar 100 mL a uma concentração de 1 mol/L.

O cálculo para a preparação vem a seguir. Lembrando que devemos considerar a massa molecular do NaOH (40 g/mol).

Você pode utilizar a fórmula da concentração molar: $M = \frac{m}{MM \cdot v}$, sendo $M = 1 \text{ mol/L}$; $MM = 40 \text{ g/mol}$; $v = 100 \text{ mL}$ (ou 0,1 L); e “m” é o que você deseja saber. Assim, temos:

$$1 = \frac{m}{40 \cdot 0,1} \rightarrow 1 = \frac{m}{4} \rightarrow 4 = m$$

Ou seja, você precisaria pesar 4 g de NaOH. No entanto, é importante lembrar que o NaOH é encontrado comercialmente com uma pureza igual a 97%, ou seja, você precisa pesar um pouco a mais, uma vez que este valor calculado seria para uma pureza de 100%. Nesse caso, você deve fazer uma regra de três invertida, uma vez que esse cálculo é inversamente proporcional, ou seja, quanto menor a pureza maior será o valor a ser pesado:

$$\begin{array}{l} \uparrow 4 \text{ g} \text{ --- } 100\% \text{ pureza} \\ \quad \text{x} \text{ --- } 97\% \text{ pureza} \\ \quad \text{x} \text{ --- } \mathbf{4,12 \text{ g de NaOH}} \downarrow \end{array}$$

Após todos os cálculos feitos, deve-se pesar a quantidade de NaOH encontrada e dissolvê-la em um béquer com mais ou menos 90 mL de água deionizada. Para obter um volume mais preciso, transfira a solução para um balão volumétrico de 100 mL e ajuste

o menisco. Posteriormente, é interessante transferir a solução para um vidro âmbar e armazenar em local seco, limpo e à temperatura ambiente, com a devida identificação.

Preparo de solução ácida: já a solução ácida mais comumente empregada para corrigir o pH é o ácido clorídrico (HCl). O volume e a concentração podem variar, conforme necessário, porém sugere-se preparar 100 mL a uma concentração de 1 mol/L.

Aqui você também pode utilizar a fórmula da concentração molar – lembrando de considerar a massa molecular do HCl (36,46 g/mol) –, sendo $M = 1 \text{ mol/L}$; $MM = 36,46 \text{ g/mol}$; $v = 100 \text{ mL}$ (ou 0,1 L); e “m” é o que você deseja saber. Assim temos:

$$1 = \frac{m}{36,46 \cdot 0,1} \rightarrow 1 = \frac{m}{3,646} \rightarrow 3,65 = m$$

Ou seja, você precisaria pesar 3,65 g de HCl. No entanto, o HCl é encontrado na forma líquida, e por isso deve-se transformar o valor encontrado em gramas para mililitros. Nesse caso deve-se considerar a densidade da substância, que no caso do HCl é igual a 1,19 g/mL (valor encontrado no frasco dos reagentes):

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \text{ --- } 1,19 \text{ g} \\ \quad \text{x} \text{ --- } 3,65 \text{ g} \\ \quad \text{x} = 3,07 \text{ mL de HCl} \end{array}$$

Ainda, sabe-se que esse valor seria ideal para um produto com 100% de pureza, porém a pureza do HCl é de 37% geralmente, conseqüentemente é necessário mais um cálculo (regra de três invertida).

$$\begin{array}{l} 3,07 \text{ mL} \text{ --- } 100\% \text{ de pureza} \\ x \text{ --- } 37\% \text{ de pureza} \\ x = 8,30 \text{ mL} \end{array}$$

Após todos os cálculos feitos, adicione 50 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL, e após, com uma pipeta volumétrica, adicione o volume encontrado de HCl. Lembre-se que, por ser um ácido, a água deve ser adicionada antes! Por fim, complete o volume até o menisco. Posteriormente, recomenda-se transferir a solução para um vidro âmbar, devidamente identificado, e armazenar em local seco, limpo e à temperatura ambiente.

Se liga!

Muitas vezes, apenas uma gota da solução já é suficiente para alterar em grande faixa o pH. Dessa forma, sugere-se corrigir o pH da solução utilizando uma pipeta de Pasteur, uma vez que esta adiciona pequenos volumes por vez.

De modo geral, para ajustar o pH, podemos seguir a regra apresentada no Quadro 1.

Os principais cálculos para o preparo de soluções já foram apresentados. A seguir estão protocolos mais diretos para o preparo de algumas das soluções mais utilizadas em rotinas laboratoriais.

Quadro 1. Balanceamento e mudança de pH

A solução está	Mas o pH final deve ser	Utilizar
Ácida	Básico/alcalino	Solução alcalina (NaOH)
Ácida	Neutro	Solução alcalina (NaOH)
Neutra	Básico/alcalino	Solução alcalina (NaOH)
Neutra	Ácido	Solução ácida (HCl)
Básica/alcalina	Neutro	Solução ácida (HCl)
Básica/alcalina	Ácido	Solução ácida (HCl)

Álcool 70% - 5 L

O álcool etílico 70% é muito utilizado na rotina laboratorial como solução desinfetante de superfícies. Isso porque a água presente na solução facilita sua entrada no microrganismo e, ao mesmo tempo, permite que a volatilização seja mais lenta, aumentando o tempo de contato com o microrganismo.

Como é uma solução muito utilizada, o ideal é preparar um volume maior e posteriormente dividi-lo entre os laboratórios.

Preparo: em um recipiente grande, adicione 3,77 L de álcool 92,9° e complete o volume até 5 L com água destilada.

Solução salina 0,85% - 1 L

A solução salina 0,85% é muito utilizada em rotinas de microbiologia, pois apresenta característica isotônica comparada à célula microbiana, evitando a ruptura dessas células.

Preparo: em um béquer dilua 8,5 g de NaCl (P.A.) em aproximadamente 900 mL de água deionizada. Transfira o volume para um balão volumétrico de 1 L e ajuste o menisco. Para autoclavar, transfira a solução para um vidro do tipo Schott com tampa.

Tampão PBS 1x - 1 L

A solução PBS (tampão fosfato salina, do inglês *phosphate-buffered saline*) também é muito utilizada em diversos protocolos como solução tamponante e estabilizante do pH.

Preparo: dilua 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 1,44 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), 0,24 g de Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) em 800 mL de água destilada/deionizada. Ajuste o pH em 7,4 com HCl. Transfira para um balão volumétrico de 1 L e ajuste o menisco.

Solução estoque EDTA 0,5 M pH 8,0 - 100 mL

O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*, de fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) é muito utilizado em protocolos em que há a manipulação de DNA, atuando como agente sequestrante (quelante) de íons que de alguma forma degradam DNA.

Preparo: em um béquer, pese 18,61 g de EDTA e dilua, com o auxílio de uma chapa e barra magnética, em cerca de 60 mL de água deionizada. Ajuste o pH com a solução de NaOH. Depois, transfira para um balão volumétrico de 100 mL e ajuste o menisco. Faça alíquotas e autoclave.

Nota: essa solução é muito difícil de dissolver, somente entrando em solução quando o pH já estiver próximo de 8,0.

Solução estoque TBE 5x - 1 L

Tris-borato-EDTA (TBE) é uma das soluções tamponantes utilizadas em protocolos da biologia molecular. Essa solução é composta pelo tris-base (*tris(hidroximetil)aminometano*, $C_4H_{11}NO_3$), elemento tampicante; pelo borato (ácido bórico, H_3BO_3), elemento para ajuste do pH e para manutenção da corrente; e pelo EDTA, elemento quelante.

Preparo: em um béquer, dissolva 54 g de tris-base + 27,5 g de borato em aproximadamente 900 mL de água deionizada com o auxílio de uma chapa e barra magnética. Depois, adicione 20 mL da solução EDTA 0,5 M pH 8,0. Transfira para um balão volumétrico de 1 L e ajuste o menisco.

RPM e RCF (ou força G)

Em etapas que envolvem o uso de centrífugas, os protocolos apresentam uma determinada unidade de medida indicativa para rotação das amostras, devendo esta ser corretamente ajustada para garantir adequada separação das partículas da solução e, conseqüentemente, bons resultados. As duas unidades de medida que as centrífugas podem apresentar para indicar os parâmetros da centrifugação são o RPM ou RCF, sendo:

RPM: rotações por minuto, indica a velocidade de rotação. Por exemplo: se a rotação indicada em uma centrífuga é de 300 RPM, significa que o objeto está fazendo 300 rotações por minuto em torno de um eixo fixo.

RCF: força centrífuga relativa, ou ainda, força G (força gravitacional), indica a força exercida durante a centrifugação. Por exemplo: se a RCF indicada em uma centrífuga é de 400 x g, significa que a força centrífuga aplicada sobre o objeto é 400 vezes maior que a força gravitacional da Terra.

Dessa forma, um outro cálculo muito importante na rotina laboratorial trata da conversão de RCF para RPM, ou vice-versa. Muitas vezes pode acontecer de seu protocolo indicar a rotação em RCF (ou “x g”), mas sua centrífuga apenas apresentar a configuração em RPM, ou vice-versa. Para ajudar a resolver essa questão, você pode usar a seguinte fórmula:

$$RCF \text{ ou Força } G = 1,12 \cdot R \cdot (RPM/1.000)^2$$

Sendo: R = raio do rotor, em milímetros. Essa medida muda de acordo com o rotor instalado no momento e geralmente encontra-se indicado nele. Caso contrário, busque essa especificação com o fabricante do equipamento. Se ainda assim não for possível obter a informação, você poderá calcular o raio do rotor da seguinte forma (Figura 46):

Centro do rotor

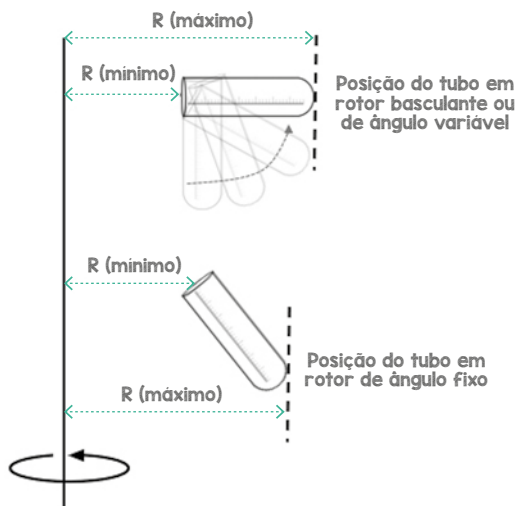


Figura 46. Maneiras de medir o raio do rotor de uma centrífuga

- **raio máximo:** medindo a partir de um ponto central do rotor da centrífuga até o fundo do tubo, posicionando a caçapa na posição mais horizontal possível (no caso de rotores basculantes ou de ângulo variável), ou a partir de um ponto central do rotor da centrífuga até a linha correspondente ao fundo do tubo (para rotores de ângulo fixo); ou
- **raio mínimo:** medindo a partir de um ponto central do rotor da centrífuga até o centro da tampa do tubo (no caso de rotores basculantes ou de ângulo variável, também

posicione a caçapa horizontalmente para atingir o centro da tampa do tubo).

É importante destacar que os rotores das centrífugas não podem ser trocados entre equipamentos, sendo cada rotor específico para uma centrífuga. Dessa forma, ao instalar um rotor, configure sua centrífuga para receber o rotor escolhido. Além disso, vale destacar que cada rotor apresenta uma rotação máxima, que irá depender de seu tamanho. Outras observações para a hora da centrifugação:

- preencha, preferencialmente, até 3/4 do tubo para centrifugação;
- a centrífuga deve estar sempre balanceada, ou seja, equilibrada. Para cada tubo posicionado na centrífuga, um outro tubo, com o mesmo peso, deve ser posicionado do lado oposto. Nunca balanceie a centrífuga retirando caçapas e/ou adaptadores, mas preenchendo os demais lugares;
- certifique-se da utilização de tubos apropriados para o rotor e/ou caçapas e adaptadores escolhidos, caso contrário eles podem romper;
- caso sua amostra precise ser centrifugada a uma determinada temperatura, primeiramente ambiente e estabilize a temperatura da centrífuga;
- permaneça por perto até a centrífuga atingir a velocidade selecionada;
- nunca abra a centrífuga antes da completa parada da rotação.

REFERÊNCIAS

- ANALÍTICA. Manual de operação da Pipetman P. São Paulo: Nova Analítica LTDA, 2007. Disponível em: <http://bit.ly/3o7EiLi>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- BARKER, K. Na bancada: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BATISTA, E.; FILIPE, E.; LOURENÇO, H. Influência da leitura do menisco na calibração de equipamento volumétrico. Caparica: Instituto Português da Qualidade, 2006. Disponível em: <http://bit.ly/2XhRDBC>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- FOGAÇA, J. Diluição de soluções. In: REDE OMNIA. Brasil escola. Goiânia: Rede Omnia, 2011a. Disponível em: <http://bit.ly/2KYb1BL>. Acesso em: 9 jan. 2019.
- FOGAÇA, J. Concentração comum. In: REDE OMNIA. Mundo educação. Goiânia: Rede Omnia, 2011b. Disponível em: <http://bit.ly/2XNrNcW>. Acesso em: 9 jan. 2019.
- FOGAÇA, J. Concentração em mol/L. In: REDE OMNIA. Mundo educação. Goiânia: Rede Omnia, 2011c. Disponível em: <http://bit.ly/2xs6DJJ>. Acesso em: 9 jan. 2019.
- FOGAÇA, J. Concentração comum de soluções. In: REDE OMNIA. Brasil escola. Goiânia: Rede Omnia, 2017. Disponível em: <http://bit.ly/2XK8poA>. Acesso em: 9 jan. 2019.
- GAVETTI, S. M. V. C. Guia para utilização de laboratórios químicos e biológicos. São Paulo: Unesp, 2013. Disponível em: <http://bit.ly/2FMw6uX>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- GRAZIANO, K. U.; SILVA, A.; PSALTIKIDIS, E. M. (org.). Enfermagem em centro de material e esterilização. São Paulo: Manole, 2011.
- KASVI. Centrífugas: princípios básicos da técnica de centrifugação. In: KASVI. [Website da Kasvi]. São José dos Pinhais: Kasvi, 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2XNByI4>. Acesso em: 7 fev. 2019.
- LAMEB – LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE ESTUDOS EM BIOLOGIA I. A relação entre RPM e RCF ou força G. Florianópolis: Ufsc, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2Ys3VZv>. Acesso em: 7 fev. 2019.
- LABTEST. Infotec: uso correto de pipetas. Lagoa Santa: Labtest, 2010. Disponível em: <http://bit.ly/3o6uBiI>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- MOURA, J. A. S.; YOGUI, G. T. Limpeza e preparação de vidrarias para análise de compostos orgânicos. Procedimento operacional padrão. Revisão n. 1. Pernambuco: UFPE, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2XGoyEc>. Acesso em: 10 dez. 2018.

NICÉSIO, R. G. Centrifugação: conceito e aplicações. In: NICÉSIO, R. G.; MARQUES, L.; OLIVEIRA, R. I. S. Biomedicina Brasil. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: <http://bit.ly/2FQM8nn>. Acesso em: 7 fev. 2019.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. rev. Cold Spring Harbor: CSH Laboratory Press, 2001.

SP LABOR. Boas práticas em pipetagem: aspectos importantes envolvendo este procedimento. Presidente Prudente: SP Labor, 2013. Disponível em: <http://bit.ly/3ob2ajS>. Acesso em: 10 dez. 2018.

TITO, F. M. P.; CANTO, E. L. Química: na abordagem do cotidiano. 3. ed. São Paulo: Moderna, 2003.

BIOLOGIA MOLECULAR

3

Autores

Alexandre Rieger

Betina Brixner

Dandára Costa Fanfa

Djulia Rafaella Kist

Elisângela Luzia dos Santos

Jane Dagmar Pollo Renner

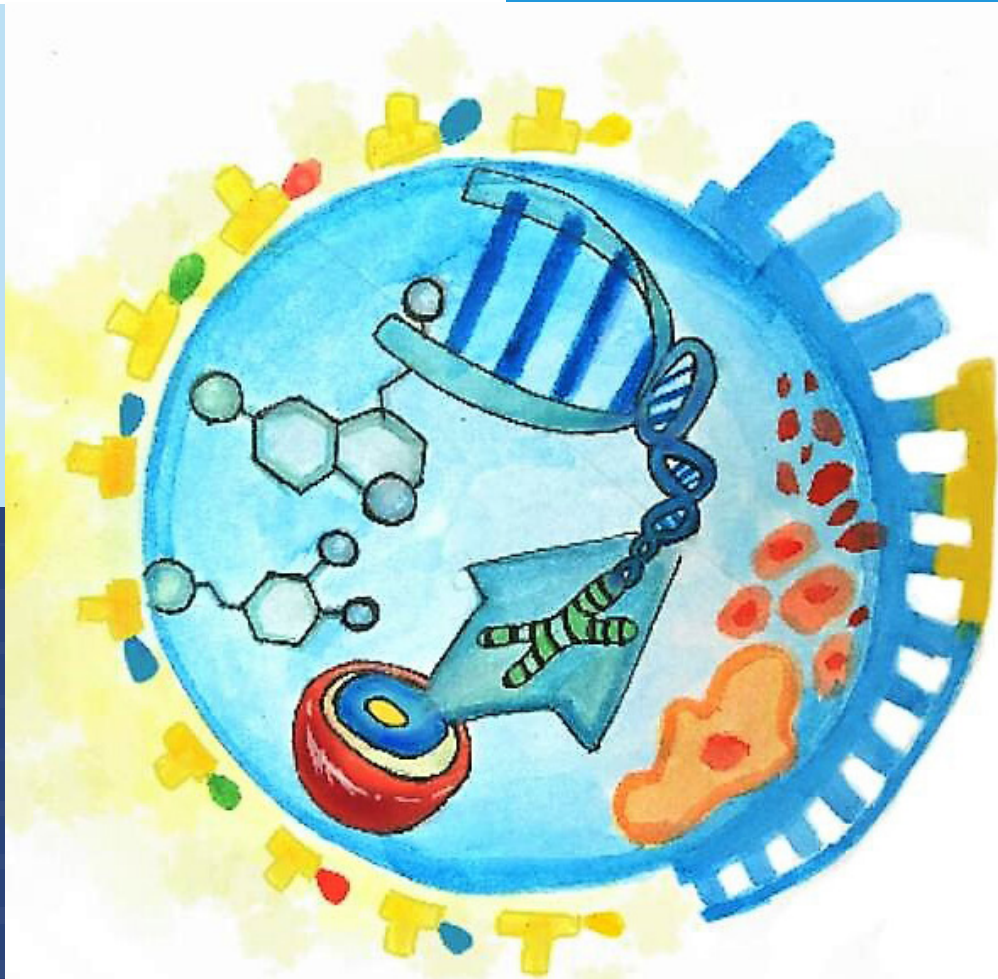
Lia Gonçalves Possuelo

Nayanna Dias Bierhals

Valéria Louzada Leal

Ilustração

Letícia Clauhs



A biologia molecular é uma área da ciência voltada ao estudo dos seres vivos em perspectiva molecular, ou seja, com foco na estrutura, função e expressão do material genético. Trata-se de uma área de estudo relativamente nova e muito ampla, abrangendo elementos da química, bioquímica, citologia, microbiologia e genética.

Pode-se dizer que o dogma central da biologia molecular é a molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) e como ocorrem sua síntese, fluxo de informações genéticas, expressão de produtos etc. Dessa forma, apresentamos uma breve contextualização sobre essa molécula.

O DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) é a molécula que reúne toda a informação genética de um organismo vivo, podendo ser encontrada no núcleo ou ainda em organelas, como as mitocôndrias e cloroplastos,

das células eucariotas, e em organismos procaríotos, de forma circular dispersa no citoplasma. Foi descoberta em 1869 pelo bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher. Entretanto, somente 84 anos depois (em 1953), James Dewey Watson e Francis Crick propuseram um modelo de sua estrutura, revolucionando a ciência. Vale destacar que as pistas que fundamentaram a descoberta de Watson e Crick vieram das observações do bioquímico austríaco Erwin Chagaff e da química Rosalind Franklin. Watson e Crick juntaram aos seus conhecimentos os dados obtidos por esses e outros pesquisadores, elaborando assim um modelo para a estrutura do DNA.

Esse modelo é aceito até os dias atuais e vem guiando todas as pesquisas nas áreas de biologia molecular, genética e biotecnologia. A seguir fazemos uma breve descrição da estrutura dessa molécula.

A estrutura do DNA

A estrutura base da molécula de DNA é constituída por inúmeras unidades de nucleotídeos, sendo estes constituídos por:

- uma base nitrogenada heterocíclica ligada ao carbono 1' da pentose (açúcar) através de uma ligação glicosídica- β ;
- a hidroxila ligada ao carbono 2' da pentose;
- um, dois ou três grupos fosfato (PO_4^-), ligados ao carbono 5' da pentose.

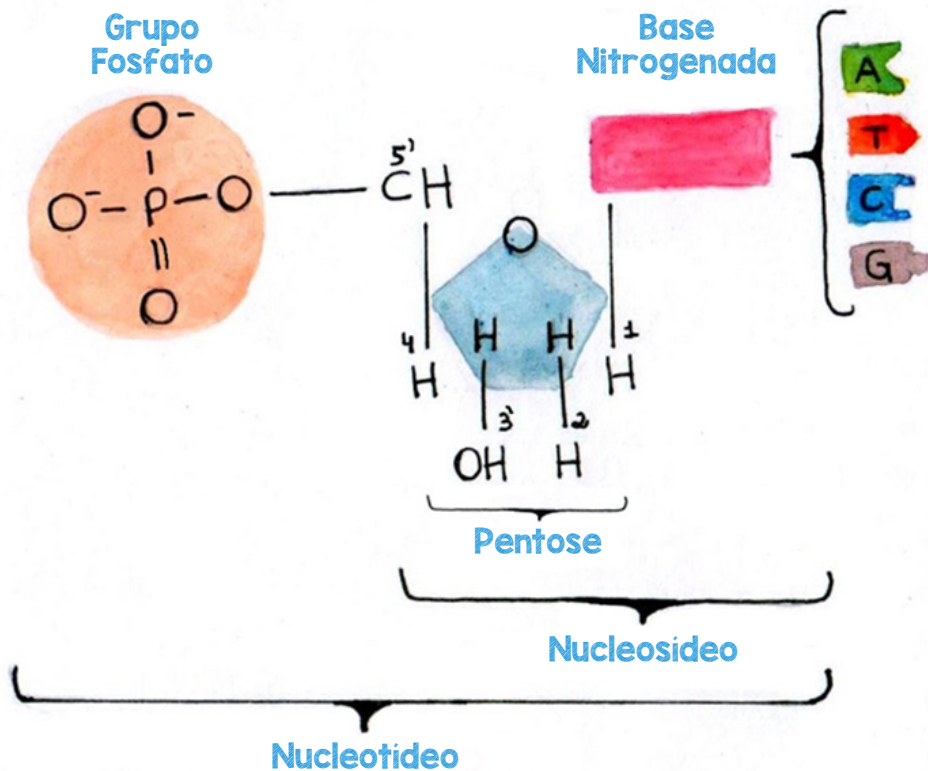


Figura 1. Nucleotídeo, a estrutura base de uma molécula de DNA

As bases nitrogenadas podem ser:

- pirimidinas (bases compostas por um anel): citosina (C) e timina (T); ou
- purinas (bases compostas por dois anéis): guanina (G) e adenina (A).

A adenina faz par com a timina, através de uma dupla ligação, formando o par de bases A=T. A guanina faz par com a citosina, através de uma tripla ligação, formando o par de bases G≡C. Assim, a

quantidade de adenina é igual à quantidade de timina, e a quantidade de citosina é igual à de guanina.

Na formação de uma molécula de DNA, um nucleotídeo liga-se ao outro através de ligações fosfodiéster entre o grupo fosfato e o grupo OH do carbono 3' do nucleotídeo adjacente, formando longas fitas. Essas ligações ocorrem em direções opostas entre as fitas – uma fita na direção 5'→3' e a outra na direção 3'→5', sendo, assim, antiparalelas.

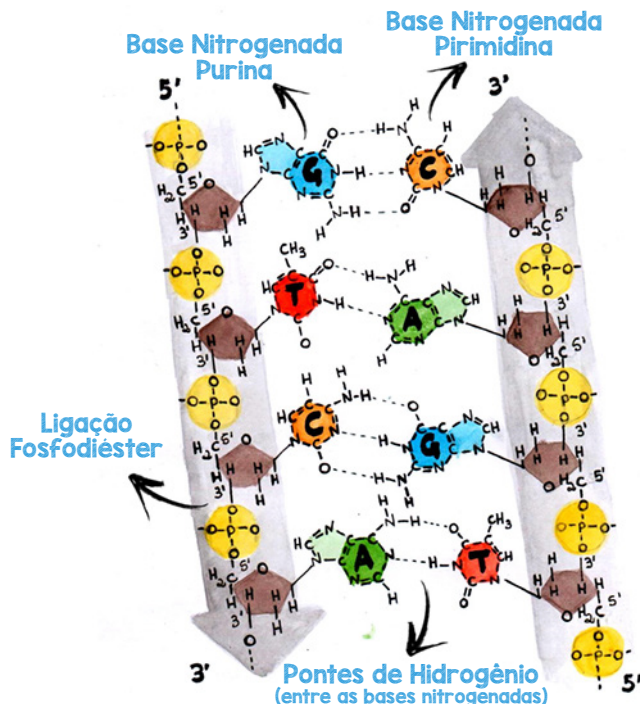


Figura 2. Estrutura de uma molécula de DNA

O modelo proposto por Watson e Crick mostrou que o DNA é uma dupla hélice, em que duas longas cadeias de nucleotídeos se ligam uma à outra através de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas de cada nucleotídeo. Essas ligações ocorrem sempre entre uma adenina e uma timina, e entre uma citosina e uma guanina, mantendo, assim, uma organização espacial (mesma distância entre as duas cadeias polinucleotídicas) e, consequentemente, estrutural (maior estabilidade ao DNA).

Essas longas cadeias nucleotídicas, unidas por pontes de hidrogênio, enrolam-se em torno do eixo imaginário. As desoxirriboses ficam voltadas ao meio externo em relação às bases nitrogenadas, como se fossem o corrimão de uma escada em formato de caracol, e expostas ao meio aquoso (hidrofílicas). As bases nitrogenadas ficam voltadas ao meio interno (hidrofóbicas) e, juntamente com as pontes de hidrogênio formadas com as bases da fita complementar, formam os “degraus” dessa escada imaginária.



Figura 3. Esquema da dupla hélice do DNA

I. TÉCNICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Diversas técnicas no campo da biologia molecular têm início no que foi apresentado até aqui, como, por exemplo, as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e PCR tempo real, sequenciamento de DNA, entre outras.

II. PCR convencional

A técnica da PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica muito utilizada para fazer a amplificação *in vitro* de um segmento específico de DNA. Foi descrita na década de 1980 por Kary Mullis e Fred Faloona, e é considerada até os dias atuais como uma técnica revolucionária, bastante eficiente e sensível, tendo aplicações nas áreas de biologia e medicina, incluindo clonagens de DNA, detecção de agentes infecciosos, diagnósticos médicos, análises forenses, entre outras.

A técnica da PCR apresenta, basicamente, o princípio da amplificação enzimática de um determinado segmento de DNA, gerando grande quantidade dessa região de interesse e permitindo que ela seja analisada. Esse processo de amplificação ocorre pela ação de uma enzima estável e resistente ao calor, a Taq DNA polimerase, assim chamada em homenagem à bactéria *Thermus aquaticus*, da qual essa enzima foi originalmente isolada.

Assim como outras enzimas DNA polimerases, a Taq polimerase faz *síntese de uma nova fita utilizando como molde um DNA fita simples* já existente. Entretanto, essa enzima somente inicia a síntese dessa nova fita complementar quando lhe é dado um *primer*, ou seja, uma curta sequência de nucleotídeos que fornece um ponto de partida para a Taq polimerase iniciar seu trabalho. Assim, em uma reação de PCR, o pesquisador pode definir a região a ser amplificada a partir da escolha do *primer*.

Com base nessa breve explicação, podemos dizer que os principais ingredientes para desenvolver essa técnica são a Taq DNA polimerase, *primers*, DNA molde e nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP). Conforme você verá mais adiante, outros ingredientes podem ser requisitados a fim de otimizar a reação, como água, solução tampão, glicerol e cloreto de magnésio ($MgCl_2$). Esses ingredientes serão então reunidos em um microtubo e inseridos em um equipamento chamado de termociclador. Esse equipamento é capaz de realizar repetidos ciclos de variação de temperatura, permitindo que a reação de PCR ocorra por meio da desnaturação do DNA molde ($-95\text{ }^{\circ}\text{C}$), hibridização dos *primers* ($-55\text{ }^{\circ}\text{C}$) e extensão da fita de DNA pela ação da enzima Taq DNA polimerase ($-72\text{ }^{\circ}\text{C}$).

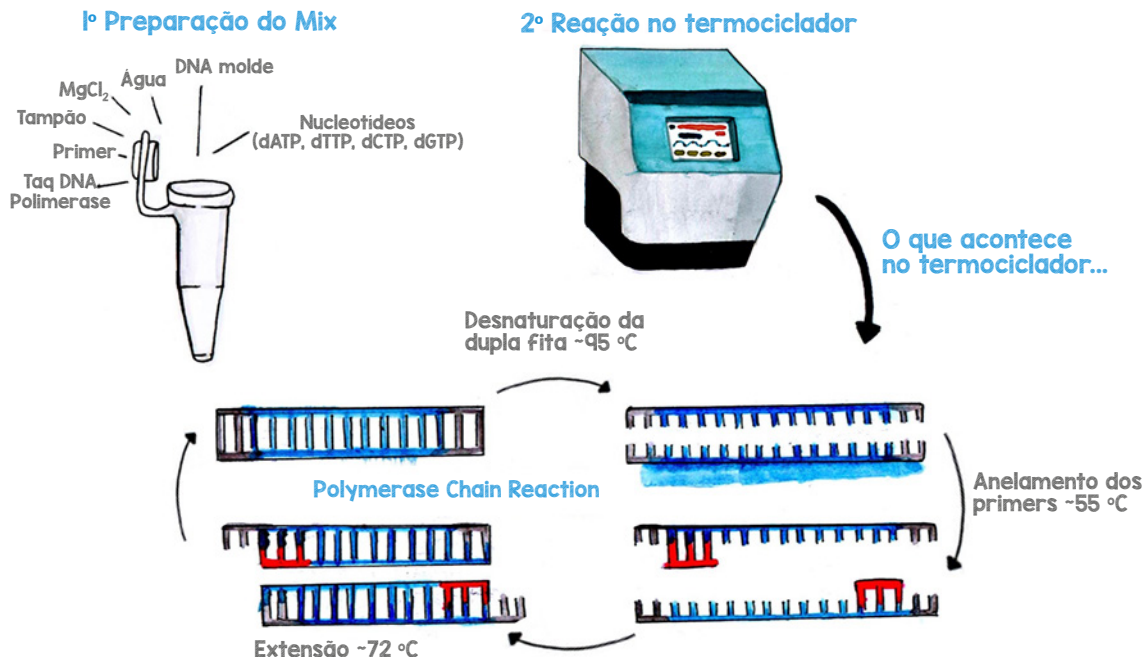


Figura 4. Reação de PCR

Assim, no decorrer dos vários ciclos, o segmento de DNA de interesse, limitado pelos *primers*, vai sendo amplificado de modo que passa a existir um acúmulo exponencial dessa região de interesse sintetizada. Por exemplo, se partirmos de uma única molécula de DNA molde, após 30 ciclos de desnaturação, hibridização

e extensão, teremos obtido cerca de 1,4 bilhão de cópias, idênticas à original dessa região específica que foi limitada pelos *primers*.

Ao final da técnica de PCR convencional, os resultados são visualizados por meio da eletroforese em gel (técnica apresentada na sessão 2.7).

Etapas básicas da PCR

1º Desnaturação (-95°C): aquecimento para que ocorra a separação das duplas fitas de DNA, resultando em dois moldes de fita simples para a próxima etapa

2º Anelamento (-55 a 65°C): resfriamento para que os *primers* se liguem às suas sequências complementares no DNA molde de fita simples

3º Extensão (-72°C): elevação da temperatura para que a Taq DNA polimerase estenda os *primers*, sintetizando novas duplas fitas de DNA a partir da incorporação dos nucleotídeos

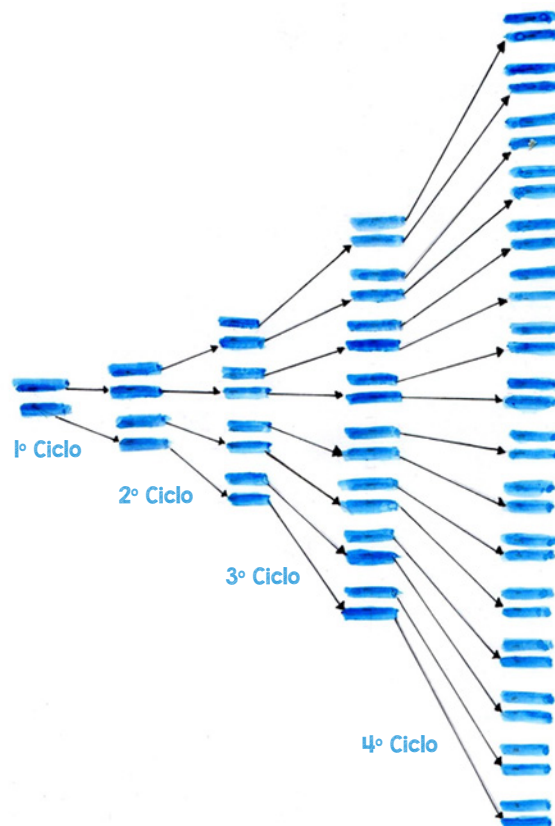


Figura 5. Padrão de crescimento exponencial que ocorre em uma reação de PCR

1.2. PCR em tempo real

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) é uma variação da PCR convencional que permite uma amplificação, detecção e quantificação de DNA em tempo real, não demandando a eletroforese no

final. Esse avanço permitiu resultados mais específicos, sensíveis, rápidos e livres de possíveis contaminações, representando assim grande avanço nos métodos de genotipagem e diagnósticos moleculares em geral.

Essa técnica permite a visualização em tempo real do progresso da reação e do número de cópias do DNA, que também aumenta exponencialmente a cada ciclo, sendo detectado e quantificado a partir de sinais fluorescentes produzidos e emitidos na mesma proporção desse aumento. Para isso, essa técnica exige um termociclador com sistema óptico para excitação e detecção da fluorescência, assim como um software para aquisição e análise de dados.

Para que ocorra a liberação dessa fluorescência, a reação de qPCR necessita de fluoróforos, ou corantes fluorescentes, que são moléculas capazes de absorver e emitir luz em determinados comprimentos de onda. Na reação de qPCR, essas moléculas possuem a finalidade de emitir fluorescência quando ligadas à molécula de DNA ou quando sofrem hidrólise após serem ligadas a uma região específica. Os sistemas precursores e atualmente mais utilizados na realização da qPCR são:

SYBR® Green: esse sistema baseia-se em uma molécula que emite fluorescência ao se ligar ao DNA dupla fita, sendo essa fluorescência diretamente proporcional à amplificação do DNA-alvo. Na desnaturação, etapa em que o DNA se separa em duas fitas simples, a fluorescência do SYBR® Green é muito baixa, gerando um sinal muito fraco. Na fase de

anelamento, quando os *primers* se ligam à fita molde, inicia-se a emissão de uma fluorescência, que vai aumentando à medida que a Taq DNA polimerase, na fase de extensão, vai sintetizando a fita complementar e, consequentemente, gerando uma dupla fita de DNA. Como o SYBR® Green se liga a qualquer fragmento sob forma de dupla fita, a fluorescência também pode ser gerada para produtos indesejáveis, como dímeros de *primers*. Assim, a diferenciação entre produtos desejáveis e indesejáveis deve ser feita pela análise da curva de *melting*.

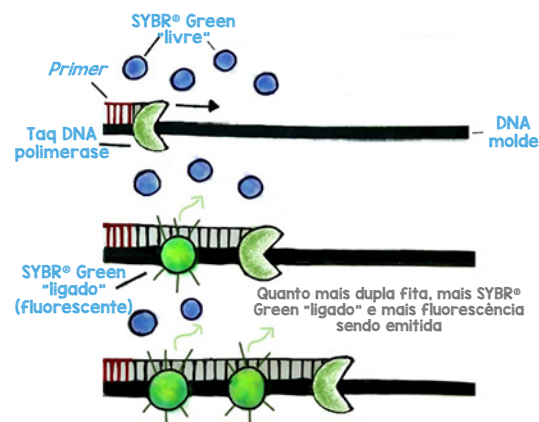


Figura 6. Representação do princípio de funcionamento do SYBR® Green

A curva de *melting* é realizada após a ocorrência de cerca de 30 a 40 ciclos, quando o fluoróforo SYBR® Green atinge

seu maior grau de fluorescência, pois há muitas duplas fitas formadas. Nesse ponto, o pesquisador deve aumentar a temperatura gradativamente, levando à desnaturação dessa dupla fita e consequente diminuição da fluorescência. Nesse momento, o pesquisador terá a temperatura de *melting* (T_m) de sua amostra, que corresponderá ao momento em que metade desses fragmentos se encontram em forma de dupla fita, e a outra metade em fita simples. A presença de um único pico na curva de *melting* sugere a existência de um único produto (pois há uma única T_m), porém a presença de vários picos sugere a formação de produtos indesejados (várias T_m detectadas). Além disso, a temperatura de *melting* também está relacionada com a composição desse fragmento de DNA, sendo que maior T_m indica maior conteúdo de G \equiv C, pois há necessidade de maior energia para quebrar as três ligações existentes entre essas duas bases nitrogenadas. Dessa forma, pode-se dizer que cada genoma apresenta uma temperatura de *melting* diferente.

A vantagem da aplicação de técnicas por SYBR® Green é o menor custo por reação e a facilidade. No entanto, como o corante se liga a qualquer fragmento de dupla fita, a técnica se torna menos específica, podendo gerar sinais falso-positivos, incluindo a ligação a sequências inespecíficas e a dímeros de *primer*.

TaqMan®: esse sistema baseia-se em um fragmento de DNA que hibridiza em uma sequência específica do DNA que está sendo amplificado pela PCR. Esse fragmento, chamado de sonda, apresenta em sua extremidade 5' um fluoróforo, o *reporter* (R), e em sua extremidade 3' o *quencher* (Q), molécula que capta a energia emitida pelo R.

Em suma, as sondas ligam-se às sequências-alvo com a quais apresentam total complementaridade. Nesse momento, a porção R da sonda capta a energia emitida pelo equipamento e a dissipa em forma de fluorescência. Entretanto, a porção Q absorve essa fluorescência, não permitindo sua detecção pelo equipamento. Enquanto essa sonda estiver ligada ao fragmento de DNA, haverá baixa fluorescência. A Taq DNA polimerase, por sua vez, ao encontrar essa região hibridizada pela sonda, pela ação de uma exonuclease, irá separar o R do Q. Assim, o R não terá mais sua energia absorvida pelo Q, aumentando exponencialmente a intensidade da fluorescência emitida por R até ser detectada pelo equipamento.

Ao determinar a presença ou ausência de sequências específicas, o sistema TaqMan® permite realizar experimentos tanto qualitativos como quantitativos, todos com alta especificidade e sensibilidade, gerando resultados mais confiáveis, principalmente no auxílio em diagnósticos clínicos. Além disso, quando diferentes sondas são combinadas é

possível detectar simultaneamente diversos patógenos, por meio de uma qPCR *multiplex*. No entanto, apesar das inúmeras vantagens, ainda é uma técnica pouco utilizada na rotina laboratorial devido ao alto custo dos reagentes

e pela necessidade de sondas específicas, o que limita seu uso apenas para pesquisa.

No Quadro 1 é apresentado um resumo das principais diferenças nas metodologias de qPCR discutidas anteriormente.

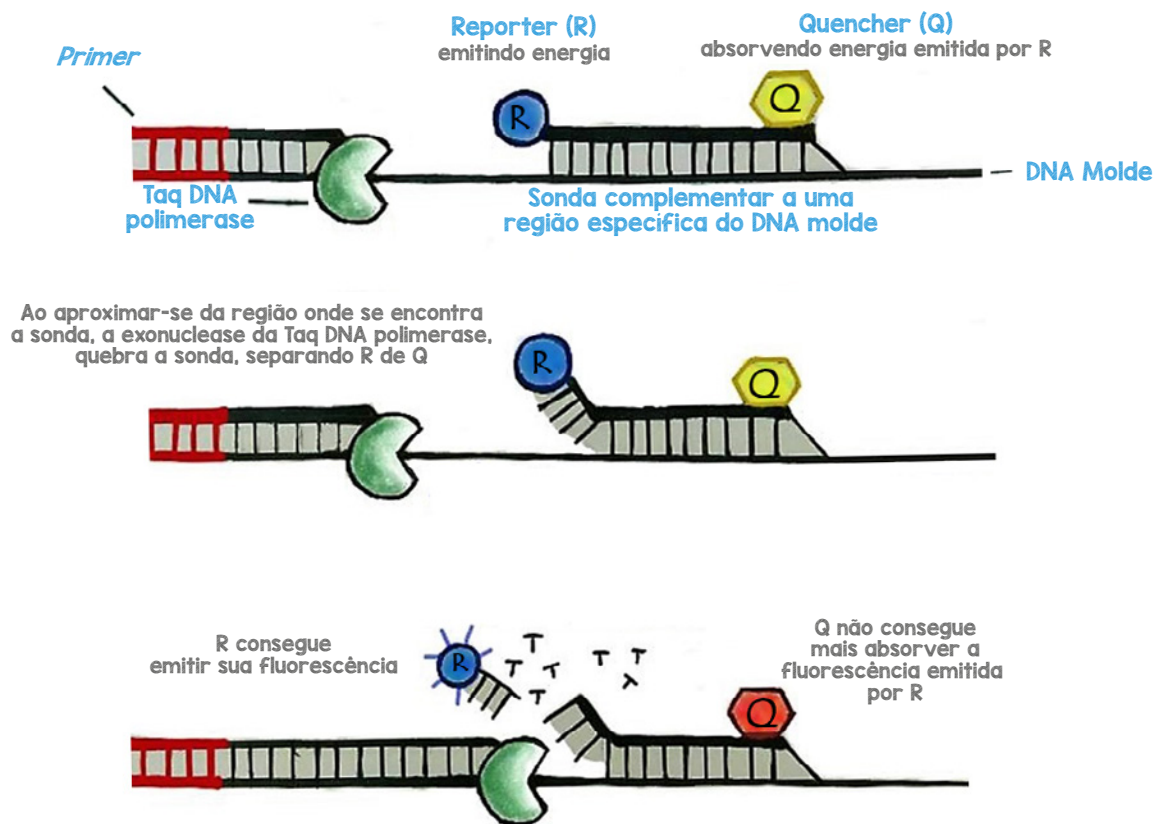


Figura 7. Representação do princípio de funcionamento do TaqMan®

Quadro 1. Principais diferenças entre os métodos utilizados na qPCR

SYBR® Green	TaqMan®
Moléculas que se liga a qualquer fragmento de DNA dupla fita presente na PCR	Sondas que se ligam a regiões específicas do DNA sintetizado na reação de PCR
Menor custo, porém menos específico	Maior custo, porém mais sensível e específico
Presença de sinais falso-positivos	Resultados mais confiáveis, porém necessita de sonda específica para cada sequência-alvo

Na qPCR é comum encontrar novos conceitos, logo, é importante saber o significado de cada um deles, uma vez que ajudarão no momento de configurar a reação no

software e, também, na análise dos resultados. No Quadro 2 estão listados os principais termos, considerados essenciais para melhor entendimento da técnica.

Quadro 2. Termos básicos utilizados na qPCR

<i>Threshold</i>	Limiar de detecção, sendo acima da <i>baseline</i> e significativamente abaixo do <i>plateau</i> em um gráfico de amplificação. Seu valor varia conforme o alvo a ser detectado.
<i>Baseline</i>	Ruído existente do início de cada reação, geralmente entre os ciclos 3 e 15. Não há aumento detectável na fluorescência.
<i>Background</i>	Refere-se a uma fluorescência não específica.
<i>Threshold cycle (Ct)</i>	É o número do ciclo no qual a reação atinge seu limiar, ou seja, existe aumento significativo na fluorescência em relação ao <i>background</i> e, portanto, de fato está ocorrendo amplificação da amostra.
Temperatura de <i>melting</i> (Tm)	Temperatura em que metade do DNA está ainda em forma de dupla fita, enquanto a outra metade é fita simples. A curva de <i>melting</i> é analisada na metodologia SYBR®.
<i>Standard</i>	Amostra padrão com concentração ou alvo conhecido.

I.3. Sequenciamento de DNA

Após o estabelecimento da estrutura do DNA e aplicações de técnicas moleculares, observou-se a necessidade de melhor conhecer essa molécula. Nesse contexto, surgem os métodos de sequenciamento de DNA, sendo o método de Sanger um dos mais conhecidos e ainda utilizados, descrito por Frederick Sanger e colaboradores em 1978. A partir do sequenciamento genético é possível realizar a leitura exata da sequência de nucleotídeos, que é o que de fato determina as características dos seres vivos.

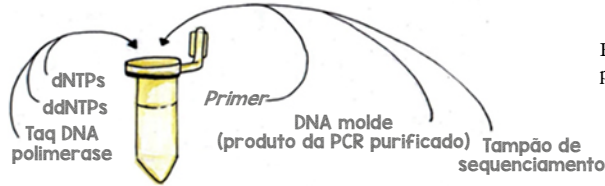
O sequenciamento de DNA pelo método de Sanger é baseado na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse. Para esse método é necessário o produto de PCR purificado, com o qual é realizada uma nova reação de PCR (chamada de reação de sequenciamento), dessa vez adicionando-se ddNTPs (desoxinucleotídeos marcados com fluoróforos).

Na reação de sequenciamento os dNTPs vão sendo adicionados, estendendo

o fragmento de interesse. Quando um ddNTP é adicionado, a extensão da cadeia é interrompida, uma vez que os ddNTPs não apresentam um grupo hidroxila (OH) no carbono 3' da pentose, que seria necessário para a ligação do próximo dNTP. No final de vários ciclos, têm-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos, todas terminadas com diferentes ddNTPs.

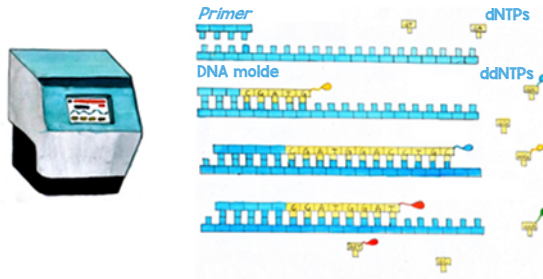
O produto dessa reação de sequenciamento é submetido ao sequenciador automático, cujo princípio é a eletroforese. Os fragmentos de diferentes tamanhos, terminados com um ddNTP marcado com fluoróforos, migram ordenadamente através de um capilar. Ao chegarem na posição do laser do equipamento, são excitados e emitem sua fluorescência, que é detectada por um fotomultiplicador. Essa informação é transmitida ao computador e processada para que, ao final da corrida, os dados possam ser recuperados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta), fazendo com que a sequência dos nucleotídeos seja identificada. Finalmente, pode-se seguir com diferentes análises de bioinformática, conforme o objetivo.

1º Preparação da reação de sequenciamento (mix)



Reação de sequenciamento realizada a partir do produto purificado da PCR

2º Termociclador



No termociclador, os diferentes ciclos de temperatura permitem a desnaturação da dupla fita, anelamento dos *primers* e síntese de novas duplas fitas pela incorporação de dNTPs

Aleatoriamente há a incorporação de ddNTPs, interrompendo a extensão da nova cadeia, que, por sua vez, permanecerá marcada com a fluorescência do último ddNTP incorporado

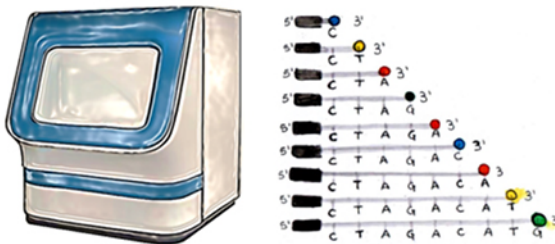
Assim, no final de vários ciclos, têm-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos e terminadas com diferentes ddNTPs

Obs.: cada ddNTP apresenta uma cor (fluorescência) específica, por exemplo: ddGTP, preto; ddCTP, azul; ddATP, verde; e ddTTP, vermelho

3º Purificação da reação de sequenciamento

Remoção dos dNTPs não incorporados, dos restos de *primers* e do excesso dos demais reagentes, para que essas “sujeiras” não interfiram na leitura das sequências

4º Sequenciamento



As cadeias de diferentes tamanhos, terminadas com um ddNTP, migram ordenadamente através de um capilar até chegarem na posição do laser, onde são excitadas e emitem sua fluorescência

Essa informação é transmitida ao computador e processada, identificando a sequência dos nucleotídeos

Obs.: os dados podem ser recuperados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta) e devem seguir com uma análise bioinformática

Figura 8. Etapas do processo de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger

2. PROTOCOLOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

A seguir estão descritos os protocolos mais utilizados em práticas e rotinas de biologia molecular.

2.1. Diluição de primers

Conforme citado anteriormente, *primer* é uma pequena sequência, geralmente formada por 20 a 25 nucleotídeos, que serve como um iniciador para a síntese de DNA. Ele se liga à fita molde de DNA pela complementariedade de bases. Assim, essa sequência deve ser muito bem projetada pelo pesquisador, pois é a partir dela que a sequência-alvo será amplificada.

Inicialmente o pesquisador deve desenhar essa sequência (a partir de ferramentas de bioinformática) e enviar para empresas que fazem esse tipo de serviço a ordem exata de nucleotídeos a ser sintetizada. Essa sequência chega ao laboratório liofilizada e sua reconstituição inicial deve seguir as orientações do fabricante, descritas na bula. Geralmente a solução diluente é tris-EDTA (TE) ou água ultrapura. O preparo dessa solução deverá ocorrer dentro da capela, sendo de extrema importância manipular a solução com materiais limpos e assépticos.

Reconstituição de *primer* (solução estoque)

- 1º Identifique o volume e a solução diluente necessários para reconstituir o *primer* liofilizado (apresentado na bula).
- 2º Adicione a solução diluente, no volume correto, diretamente no tubo contendo o *primer* liofilizado e deixe em repouso por 1 minuto.
- 3º Agite por 15 segundos com o auxílio de um vórtex e deixe repousar por 5 minutos.
- 4º Leve o tubo à microcentrífuga e dê um *spin*.

Finalizado esse processo, você terá uma solução estoque de *primer*, e é a partir dessa solução que você irá preparar as concentrações de trabalho.

Se liga!

A micromolaridade do *primer*, ao final desse processo, ficará em 100 μM , ou na concentração indicada na bula.

Diluição do *primer* (solução de trabalho)

Lembre-se que cada protocolo de reação de PCR exige uma concentração de trabalho diferente de *primer*. Portanto, leia atentamente seu protocolo e identifique a concentração e

o volume de trabalho necessários. A partir de então, você deverá fazer o cálculo de diluição (apresentado no Capítulo 2), no qual a concentração inicial do *primer* sempre será 100 µM (ou conforme bula), e a concentração e o volume finais estarão identificados no seu protocolo.

Exemplo

Preparar 1.000 µL de uma solução de *primer* a partir da solução estoque (100 µM), a uma concentração final de 20 µM.

$$C_i = 100 \mu\text{M}$$

$$V_i = ?$$

$$C_f = 20 \mu\text{M}$$

$$V_f = 1.000 \mu\text{L}$$

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \rightarrow 100 \cdot V_i = 20 \cdot 1.000 \rightarrow V_i = \frac{20.000}{100} \rightarrow V_i = 200 \mu\text{L}$$

Após conferir o cálculo, prepare sua solução de trabalho:

1º Homogeneíze a solução estoque com uma micropipeta.

2º Em um novo microtubo, adicione os 200 µL da solução estoque e 800 µL de água ultrapura ou TE (conforme fabricante), completando um volume final de 1.000 µL.

Se liga!

Recomenda-se separar os *primers* diluídos em três alíquotas, reduzindo os episódios de descongelamento e mantendo a qualidade do reagente;

Não se esqueça de identificar as alíquotas com o nome do *primer*, sua concentração e a data do preparo.

2.2. Diluição de sondas (*probes*)

Antes de iniciar o processo de diluição da sonda, é imprescindível ler a bula do produto. Dependendo da sonda e do fabricante, ela poderá estar em forma de pó liofilizado, para reconstituição no laboratório, ou previamente diluída a uma concentração de 100 µM. No caso de estar em forma de pó liofilizado, deve-se seguir com sua reconstituição. Para isso, você pode seguir o mesmo passo a passo da reconstituição de *primer* (solução estoque), verificando a solução diluente e o volume recomendados pelo fabricante. Caso a sonda já se encontre em forma diluída a 100 µM, você poderá seguir diretamente para o mesmo passo a passo de diluição de *primer*, preparando sua solução de trabalho. Lembre-se: as mesmas dicas vistas para conservação e estoque dos *primers* também são válidas para as sondas.

Qual a diferença entre *primer* e *probe*?

O *primer* é uma extensão pequena (oligonucleotídeo) de fita simples do DNA ou RNA que irá servir como guia inicializador para sua replicação. A *probe* também é uma sequência pequena do DNA ou RNA fita simples, porém é utilizada para reconhecer as sequências complementares no DNA ou RNA, permitindo a identificação de sequências-alvo, pois tem um corante fluorescente preso a ela.

2.3. Diluição de dNTPs

Os dNTPs são os nucleotídeos trifosfatados que se encontram livres em uma solução de PCR, aguardando serem incorporados na nova fita pela Taq DNA polimerase. São eles: dATP – desoxiadenosina trifosfatada; dTTP – desoxitimidina trifosfatada; dGTP – desoxiguanosina trifosfatada; e dCTP – desoxicitosina trifosfatada. Cada dNTP encontra-se em um tubo separado, e todos devem ser preparados de maneira a conter a mesma concentração, para que não ocorram erros de incorporação. Geralmente a solução estoque de cada um já se encontra na concentração de 100 µM. Para sua concentração de trabalho, cada um deles deve estar diluído a uma concentração de 10 µM. Logo:

$$C_i = 100 \text{ µM}, V_i = ?, C_f = 10 \text{ µM}, V_f = 100 \text{ µL}$$

$$C_i \cdot V_i = C_f V_f \rightarrow 100 \cdot V_i = 10.000 \rightarrow$$

$$V_i = \frac{1.000}{100} \rightarrow V_i = 10 \text{ µL}$$

Ou seja, você deve fazer uma diluição de cada dNTP, utilizando 10 µL e completando o volume para 100 µL. A partir dessas diluições, deve fazer um mix para uso com 10 mM de cada dNTP. Para 400 µL de dNTP 10 mM, utilize:

$$\left. \begin{array}{l} 10 \text{ µL dT} \\ 10 \text{ µL dG} \\ 10 \text{ µL dC} \\ 10 \text{ µL dA} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Totalizando } 40 \text{ µL. Assim, para} \\ \text{completar um volume final de} \\ 400 \text{ µL, é necessário acrescentar} \\ 360 \text{ µL de água ultrapura.} \end{array}$$

2.4. Extração de DNA

Com o surgimento de novas técnicas moleculares, deve-se avaliar muito bem o protocolo de extração de DNA a ser empregado, a fim de verificar se é adequado para a amostra em estudo. Essa etapa inicial é de extrema importância, devendo-se atender à necessidade de extrair um DNA de boa qualidade, pois poderá influenciar na qualidade de todas as reações e atividades posteriores.

As soluções utilizadas nos protocolos de extração de DNA apresentados a seguir podem ser preparadas *in house*.

Soluções utilizadas nos protocolos de extração de DNA

Acetato de Amônio 7,8 M: dissolva 6,07 g de acetato de amônio ($C_2H_7NO_2$) em 10 mL de água destilada/deionizada.

Clorofórmio/álcool isoamílico: misture 24 volumes de clorofórmio ($CHCl_3$) com 1 volume de álcool isoamílico ($C_5H_{12}O$). Armazene à temperatura ambiente por não mais que um ano. Ex.: para 50 mL de solução, adicione 48 mL de $CHCl_3$ e 2 mL de $C_5H_{12}O$. Cuide no armazenamento, pois essa é uma solução altamente volátil. Dessa forma, o ideal é prepará-la na hora do ensaio e na quantidade necessária.

CTAB/NaCl: dissolva 4,1 g de cloreto de sódio (NaCl) em 80 mL de água destilada, com o auxílio de uma chapa e barra magnética. Enquanto agita, adicione 10 g de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Se necessário, aqueça a solução a 65 °C. Depois que a solução estiver bem homogeneizada, ajuste o volume para 100 mL com água destilada. Armazene à temperatura ambiente. Validade: 6 meses.

Lisozima 10 mg/mL: dissolva 10 mg de lisozima para cada mL de água destilada. Armazene em alíquotas pequenas, a -20 °C. Validade: 1 ano.

Liticase 1 U/ μ L: a liticase vem em forma de pó liofilizado, devendo sua preparação respeitar as orientações do fabricante. Geralmente, após seguir essas recomendações, sua solução estoque ficará em 100 U/ μ L. A partir desta, faça a solução de uso: dilua 50 μ L da solução estoque em 4.950 μ L do solvente recomendado. Faça alíquotas.

NaCl 5 M: dissolva 29,22 g de NaCl em 100 mL de água destilada. Autoclave. Armazene à temperatura ambiente. Validade: 1 ano.

Proteinase K 10 mg/mL: dissolva 10 mg de Proteinase K para cada mL de água destilada. Armazene em alíquotas pequenas, a -20 °C. Validade: 1 ano.

SDS 10%: dissolva 10 g de SDS (dodecil sulfato de sódio) em 100 mL água destilada, por aquecimento a 65 °C durante 20 minutos. Não autoclave. Armazene à temperatura ambiente. Validade: 1 ano.

Mix SDS/Proteinase K: misture 3,75 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e 52,5 µL de SDS 10% para cada amostra.

Solução de lise alcalina (NaOH 0,5 M e $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 0,05 M): dissolva 2 g de hidróxido de sódio (NaOH) + 1,470 g de citrato de sódio diidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) em 100 mL de água deionizada. Armazene a ± 4 °C. Validade: 4 meses.

Tris-HCl 0,5 M pH 8,0: dissolva 7,878 g de tris-HCl em 80 mL de água deionizada. Usando uma solução básica, ajuste o pH em 8,0. Complete o volume para 100 mL com água deionizada. Armazene a ± 4 °C. Validade: 4 meses.

TE 10x pH 8,0 (tris-base 100 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM pH 8,0): dissolva 1,21 g de tris-base em 80 mL de água deionizada. Acrescente 372,2 mg de EDTA. Ajuste o pH para 8,0, e depois complete o volume para 100 mL. A partir deste, faça TE (tris-base) 1x: 100 mL de TE 10x + 900 mL de água deionizada.

Tampão de lise celular: dissolva 1,0 g de tris + 7,5 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em 900 mL de água destilada. Agite com o auxílio de uma chapa e barra magnética. Ajuste o pH para 7,2. Transfira para um balão volumétrico de 1 L e ajuste menisco. Filtre. Armazene a ± 4 °C. Validade: 6 meses.

Tampão de lise nuclear: dissolva 10 mL de tris 1 mM + 0,8 mL de NaCl 5 M + 0,5 mL de EDTA 500 mM em 75 mL de água destilada/deionizada. Ajuste o pH para 8,2. Transfira para um balão volumétrico de 100 mL e ajuste o menisco. Filtre. Armazene a ± 4 °C. Validade: 6 meses.

2.4.1. Extração de DNA de vírus

O protocolo de extração de DNA viral apresentado a seguir é indicado para amostras de papilomavírus humano (HPV), conforme Mahony e colaboradores (1993), e é realizado por digestão enzimática com Proteinase K. Para cada amostra:

1º Incube, durante 1 hora a 65 °C no termobloco, 5 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de Tween 80% (que serão utilizados no 4º passo).

2º Centrifugue o material coletado a 10.000 rpm por 10 minutos.

3º Descarte o sobrenadante e ressuspenda o sedimento em 500 µL de TE 1x gelado.

4º Adicione 5 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de Tween 80% (pré-aquecidos a 65 °C, conforme 1º passo).

5º Inative a Proteinase K em banho-maria sob temperatura de 100 °C por 10 minutos.

A solução obtida contém o DNA extraído e deve ser armazenada no congelador a -20 °C.

Caso a quantificação/qualidade da amostra não seja muito satisfatória, pode-se realizar um processo de precipitação para retirar algumas impurezas:

1º Adicione 400 µL de álcool etílico P.A. (para análise, ou seja, mais puro que o normal).

2º Agite com o auxílio de um vórtex e centrifugue a 10.000 rpm por 10 minutos.

3º Despreze o sobrenadante e conserve o precipitado (ou *pellet*) no freezer a -20 °C.

2.4.2. Extração de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*

Entre as técnicas mais comuns para a extração de DNA de *M. tuberculosis* estão aquelas adaptadas do protocolo de Supply (2005) (extração “suja”/rápida, por fervura) e de Van Embden *et al.* (1993) (extração limpa/rápida baseada em CTAB).

Extração rápida de DNA de micobactérias (extração suja): a extração rápida de DNA sem purificação, ou extração “suja”, pode ser feita a partir do meio sólido ou líquido, sendo importante retirar uma boa massa bacteriana de qualquer um dos meios.

Meio sólido: coloque 300 µL de TE 1x em um microtubo de 1,5 mL. Retire uma alçada de colônias e misture nessa solução de TE 1x. Preferencialmente, realize a extração em duplicata.

Meio líquido: após o crescimento bacteriano em meio líquido, passe 1 mL de cultura com colônia bacteriana para um microtubo de 1,5 mL. Centrifugue a 5.000 rpm por 5 minutos. Despreze o sobrenadante e adicione 300 µL de TE 1x ao precipitado. Agite com o auxílio de um vórtex, por aproximadamente 10 a 15 segundos.

Depois, deve-se realizar a inativação bacteriana:

1° Vede com filme de parafina plástica o microtubo contendo a bactéria suspensa em TE 1x (também pode ser usado o crio-tubo – tubo com tampa de rosca).

2° Incube em banho-maria por 30 minutos a 85 °C.

3° Centrifugue a 5.000 rpm por 5 minutos.

4° Transfira o sobrenadante para um novo microtubo (nesse caso o sobrenadante é o que é utilizado).

5° Deixe esfriar à temperatura ambiente e, depois, conserve no freezer -20 °C.

Extração limpa de DNA de micobactérias: deve ser feita a partir do DNA extraído não purificado (da extração “suja”). Lembrando que os volumes das soluções apresentadas são estimados para a extração de DNA de uma amostra:

1° Aqueça 75 µL de solução CTAB/NaCl a 65 °C em banho-maria, fazendo a solução se tornar menos viscosa e mais fácil de pipetar (a ser utilizada posteriormente no 5° passo).

2° Adicione 37,5 µL de Lisozima (10 mg/mL), passe no vórtex e incube por 1 hora a 37 °C (caso a amostra ainda esteja muito contaminada, deixe a 37 °C *overnight*). Enquanto isso, prepare as demais soluções.

3° Adicione 56,25 µL do mix SDS/Proteinase K, passe no vórtex e incube por 10 minutos a 65 °C (52,5 µL de SDS 10% + 3,75 µL de Proteinase K, por amostra).

4° Adicione 75 µL de NaCl 5 M.

5° Adicione 75 µL de solução CTAB/NaCl (que deverá estar pré-aquecida, conforme 1° passo), passe no vórtex até o líquido se tornar branco leitoso e incube por 10 minutos a 65 °C (isso remove os detritos da parede celular, proteínas desnaturadas e complexos de polissacarídeos, mantendo o ácido nucleico em solução).

6° Adicione 562,5 µL de clorofórmio/álcool isoamílico, e homogeneíze em vórtex por pelo menos 10 segundos (realize esta ação com cuidado) e, então, centrifugue à temperatura ambiente a 12.000 rpm por 8 minutos (isso remove o CTAB contendo proteínas e complexos de polissacarídeos).

Nota: o clorofórmio/álcool isoamílico é altamente volátil e instável, por isso o risco de vazar da ponteira aumenta. Nesse caso, ambiente a ponteira.

7° Transfira 180 µL do sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL (usar micropipeta).

8° Adicione um volume de 144 µL de isopropanol (80% da fase aquosa obtida), e homogeneíze por inversão por cerca de 20 vezes (isso vai fazer precipitar o ácido nucleico).

9° Coloque o microtubo por 30 minutos a -20 °C (se possível *overnight*, podendo obter maior rendimento).

10° Centrifugue à temperatura ambiente por 15 minutos a 12.000 rpm.

11° Descarte o sobrenadante por inversão, cuidando para não desgrudar o *pellet*. Deixe ainda cerca de 20 µL de sobrenadante.

12° Adicione 1.000 µL de etanol 70% gelado e homogeneíze delicadamente de 5 a 10 vezes com a micropipeta.

13° Centrifugue à temperatura ambiente por 5 minutos a 12.000 rpm e descarte o sobrenadante, deixando ainda cerca de 20 µL dele.

14° Centrifugue à temperatura ambiente por 1 minuto a 12.000 rpm e descarte cuidadosamente por inversão o restante do sobrenadante, utilizando um papel toalha para escorrer. Tenha certeza de que todo o etanol foi removido.

15° Deixe o *pellet* secar à temperatura ambiente (observe se o tempo está úmido, o que pode dificultar a secagem).

16° Ressuspenda o *pellet* em 20 µL de tampão TE 1x. Isso pode levar mais de 1 hora, uma vez que o DNA é de peso molecular elevado.

17° O DNA extraído deve ser armazenado em freezer a -20 °C.

2.4.3. Extração de DNA de isolados bacterianos e de hemoculturas

A técnica de lise alcalina permite extrair o DNA de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, de forma a apresentar resultados satisfatórios relativos à quantidade e qualidade do DNA extraído. A metodologia foi adaptada a partir de Millar e colaboradores (2000).

1° Em um microtubo já contendo 500 µL de TE 1x, adicione 10 a 20 colônias da bactéria de interesse, previamente semeadas em ágar Mueller Hinton.

2° Acrescente 1 mL da solução de lise alcalina.

3° Misture no vórtex por alguns segundos e, em seguida, no agitador por 10 minutos.

4° Centrifugue a 14.000 rpm por 5 minutos e descarte o sobrenadante.

5° Adicione 500 µL de Tris-HCl (pH 8,0).

6° Misture no vórtex por alguns segundos, centrifugue novamente a 14.000 rpm por 5 minutos, e depois descarte o sobrenadante.

7° Adicione 100 µL de TE 1x e misture no vórtex.

8° Incube a 100 °C durante 1 hora.

9° Submeta as amostras a um banho de gelo por 10 minutos e em seguida coloque novamente em aquecimento por 5 minutos.

10° Repita o passo 9.

11° Centrifugue a 14.500 rpm durante 15 minutos.

12° Transfira o sobrenadante para um novo microtubo e armazene em freezer a -20 °C.

2.4.4. Extração de DNA de fungos leveduriformes

O protocolo a seguir é indicado para extração de DNA de espécies de *Candida* spp., para utilização em qPCR, proposto por Jackisch e colaboradores (2016):

1° Centrifugue 500 µL de cultivo líquido de leveduras a 13.000 rpm por 3 minutos.

2° Descarte o sobrenadante e lave levemente o *pellet* com água destilada.

3° Centrifugue novamente a 13.000 rpm por 3 minutos e descarte o sobrenadante.

4° Macere a amostra com nitrogênio líquido.

5° Adicione 500 µL de liticase 1 U/µL.

6° Incube por 60 minutos a 37° C.

7° Adicione 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e 60 µL de SDS 10%.

8° Incube a 55 °C por 60 minutos.

9° Resfrie em gelo.

10° Adicione 250 µL de acetato de amônia 7,8 M.

11° Centrifugue a 13.000 rpm por 3 minutos e mantenha o sobrenadante.

12° Adicione isopropanol (2:1).

13° Centrifugue a 13.000 rpm por 3 minutos e descarte o sobrenadante.

14° Adicione 750 µL de etanol 75% gelado.

15° Centrifugue a 13.000 rpm por 3 minutos e descarte o sobrenadante.

16° Deixe secar o *pellet* de DNA.

17° Ressuspenda o *pellet* em 100 µL de TE 1x.

Nota: caso observe uma relação 260/280 > 1,8, incube com 50 µL de solução de RNAs a 37 °C por 15 minutos.

2.4.5. Extração de DNA de sangue

A extração de DNA feita a partir de amostras de sangue é adaptada da técnica de *Salting Out*, descrita em Miller e colaboradores (1988).

1° Descongele uma alíquota contendo 500 µL de sangue total.

Nota: mantenha as amostras de sangue total em alíquotas de 500 µL. Isso evita que toda a amostra seja congelada/descongelada várias vezes, degradando o material.

2° Adicione 800 µL de tampão de lise celular gelado.

3° Passe no vórtex por 30 segundos ou até sua dissociação.

4° Centrifugue a 13.000 rpm por 3 minutos.

5° Despreze o sobrenadante.

6° Adicione 1.000 µL de tampão de lise celular gelado.

7° Agite em vórtex por 30 segundos ou até dissociar o *pellet*, e então centrifugue por 3 minutos a 13.000 rpm, desprezando o sobrenadante. Repita essa etapa até que o *pellet* esteja branco-róseo, ou por no máximo 6 vezes, tendo cuidado para não perder o *pellet*.

8° Quando o *pellet* estiver branco-róseo, adicione 350 µL de tampão de lise nuclear e 50 µL de SDS 10% para cada amostra. Agite por inversão.

9° Adicione 20 µL de Proteinase K a 10 mg/mL ou 100 µL de Proteinase K 2 mg/mL. Misture manualmente.

10° Incube em banho-maria de 55 a 65 °C por 1 hora.

11° Adicione 175 µL de NaCl 5 M e agite com força.

12° Centrifugue a 13.000 rpm por 10 minutos.

13° Transfira o sobrenadante para um novo tubo (cerca de 400 µL). O tubo contendo o *pellet* pode ser desprezado.

14° Adicione 1.000 µL de etanol 100% gelado. Misture por inversão; na maioria das vezes, aparece uma massa branca (DNA).

15° Centrifugue por 3 minutos na velocidade máxima.

16° Despreze o sobrenadante, sendo cuidadoso para não perder o *pellet*.

17° Lave o *pellet* com 1.000 µL de etanol 75% gelado, ressuspensa o *pellet* e centrifugue novamente por 3 minutos.

18° Despreze o etanol, cuidadosamente. Seque com a tampa aberta no termobloco a 37 °C até evaporar todo o etanol.

19° Dissolva o *pellet* em 100 µL de TE 1x, água ultrapura ou Tris 100 mM.

20° Incube a 37 °C *overnight* para dissolver o DNA.

2.4.6. Extração de DNA de tecido

A extração de DNA realizada a partir de amostras de tecido humano (biópsia de tecido tumoral) foi padronizada pela técnica de *Salting Out*, adaptada do protocolo de Tost e colaboradores (2003).

1° Pese de 20 a 25 mg de tecido tumoral em um microtubo e macere com o auxílio de uma pinça.

2° Adicione 180 µL de tampão de lise celular.

3° Ferva por 10 minutos a 100 °C em banho-maria.

4° Adicione 40 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e agite com o auxílio de um vórtex.

5° Incube com o auxílio de um termobloco a 55 °C por 3 horas, sempre agitando (vórtex) a cada 30 minutos.

6° Adicione 600 µL de tampão de lise nuclear e passe no vórtex por 15 segundos.

7° Incube a mistura por 30 minutos a 65 °C.

8° Centrifugue a amostra a 13.000 rpm por 10 minutos.

9° Transfira 600 µL sobrenadante para um tubo novo que contenha 600 µL de isopropanol e misture por inversão.

10° Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos.

11° Retire o sobrenadante, cuidando para não perder o *pellet*.

12° Adicione 600 µL de etanol 70% (solução purificadora) e inverta o tubo.

13° Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos.

14° Descarte o sobrenadante e inverta levemente o tubo em papel absorvente para retirar o excesso de álcool.

15° Deixe secar por um dia (24 horas).

16° Adicione 50 µL de solução de reidratação ao DNA (água ultrapura).

17° Armazene em freezer a -20 °C.

25. Quantificação de amostras de DNA

Após a extração de DNA, assim como após algum processo de purificação de amostra, é ideal realizar sua quantificação, uma vez que o volume de amostra a ser utilizado em muitas reações depende de sua concentração, bem como de sua qualidade.

25.1. Quantificação de DNA por espectrofotometria (*NanoDrop*®)

O NanoDrop® Spectrophotometer é um equipamento bastante utilizado na prática laboratorial para medir a quantidade de DNA presente na amostra. Além disso é possível ainda verificar a presença de outras substâncias, tais como impurezas, que possam existir na amostra. A técnica consiste em um sistema de retenção da amostra, fundamentada na propriedade de tensão da superfície, no qual o DNA irá entrar em contato com a parte superior e inferior do leitor óptico, formando uma coluna.

Passo a passo para utilização do *NanoDrop*®

1° Conecte seu computador ao equipamento, abra o software NanoDrop® 2000/2000c e clique em “*Nucleic Acid*”.

2° Pipete 2 µL de água ultrapura na parte inferior do pedestal e, em seguida, baixe cuidadosamente o braço da alavanca para iniciar a calibração.

3º No software, clique em “Blank”, espere alguns segundos e, então, clique em “Measure”.

Nota: a absorvância esperada para o branco é de 0,00 a 0,04. Caso o resultado seja diferente desses valores, repita o processo.

4º Limpe a superfície óptica, tanto a superior quanto a inferior, com um papel macio.

5º Pipete 1 µL da amostra na parte inferior e baixe cuidadosamente o braço da alavanca.

6º No canto direito do software (“Sample ID”), identifique a amostra a ser analisada.

7º Em seguida, selecione “Measure” para o equipamento gerar o resultado.

8º Limpe novamente a superfície óptica com um papel macio.

9º Repita os passos 5 a 8 para todas as amostras a serem analisadas. Lembre-se de calibrar o aparelho, como o branco, a cada 30 minutos.

2.5.2. Quantificação de DNA por fluorescência (*Qubit® 2.0 Fluorometer*)

O *Qubit® 2.0 Fluorometer* também permite a quantificação de amostras de DNA, porém ele usa o sistema de fluorescência, sendo mais sensível e específico. É necessário utilizar reagentes especiais.

Se liga!

A relação de absorvância a 260 nm e 280 nm (260/280) é usada para avaliar a pureza do DNA e RNA.

De modo geral, uma proporção de ~1,8 indica pureza da amostra de DNA; e uma proporção de ~2,0 indica pureza da amostra de RNA. Maiores variações geralmente indicam que a amostra está contaminada por proteínas, por um reagente como fenol ou, que houve um problema com a medição.

Já a relação de absorvância a 260 nm e 230 nm (260/230) é utilizada como uma medida secundária para avaliação da pureza do ácido nucleico. Essa relação deve apresentar valores mais altos do que os respectivos valores encontrados na relação 260/280, geralmente na faixa de 2,0-2,2. Maiores variações indicam a presença de contaminantes, que podem ter origem nos procedimentos de extração e/ou purificação.

Passo a passo para utilização do *Qubit®*

1) **Preparação da solução “mãe” (*Qubit Working Solution*):** o preparo dessa solução deve ser realizado com reagentes específicos para o equipamento:

1º Calcule 1 µL para cada amostra a ser quantificada (e mais para os padrões 1 e 2) do *Qubit Reagent*. Ex.: para 10 amostras + 2 padrões → $12 \times 1 = 12 \mu\text{L}$.

2º Calcule também 199 µL para cada amostra (e mais para os padrões 1 e 2) do *Qubit Buffer*. Ex.: para 10 amostras + 2 padrões à $199 \times 12 = 2.388 \mu\text{L}$.

3º Em um tubo falcon, adicione a quantidade de ambos os reagentes calculados e agite; assim, você terá sua *Qubit Working Solution*.

2) Preparação das soluções padrão 1 e 2: as soluções padrão 1 e 2 são necessárias para a calibração do equipamento e devem serem feitas a cada nova quantificação.

1º Em microtubo específico para o Qubit®, acrescente 10 µL do padrão 1 em 190 µL da *Qubit Working Solution*.

2º Em outro microtubo específico para o Qubit®, acrescentar 10 µL do padrão 2 em 190 µL da *Qubit Working Solution*.

3º No equipamento, selecione “dsDNA”, e em seguida escolha o ensaio utilizado de acordo com o kit adotado (*high sensitivity* ou *broad range*).

4º Selecionar a opção “Read Standards”. Nesse momento, o equipamento irá pedir para inserir o tubo do padrão 1 e, em seguida, o tubo do padrão 2.

Nota: tome o cuidado de não segurar pelas paredes do tubo.

3) Preparação das amostras:

1º Em microtubos próprios para o Qubit®, adicione 199 µL da sua *Qubit Working Solution* + 1 µL da amostra de DNA.

2º Homogeneíze levemente por alguns segundos no vórtex.

3º No equipamento, a opção de “Read samples” aparece logo após a realização da calibração. Insira o microtubo e selecione a quantidade de amostra utilizada (no caso 1 µL) e a unidade desejada para a leitura do resultado (recomenda-se ng/µL), e aperte em “Read tube”.

4º O resultado aparecerá na tela quase instantaneamente. Anote-o.

O ensaio a ser adotado depende exclusivamente do kit escolhido para a realização das quantificações e pode variar conforme a concentração de DNA.

No mercado, existe o Qubit dsDNA BR (Broad range) Assay e o Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay. O primeiro é para altas concentrações de DNA (2-1.000 ng) e o segundo para baixas concentrações (0,2-100 ng).

2.6. PCR convencional

Cada reagente utilizado na PCR possui uma função específica na reação, e todos são muito importantes para o sucesso nos resultados. As principais funções de cada reagente são:

Água estéril (ultrapura ou água de injeção): completa o volume final do mix da reação (diluente).

Tampão (buffer): fornece o pH ótimo para a atividade da enzima Taq DNA polimerase.

Cloreto de magnésio ($MgCl_2$): cofator enzimático que desempenha papel essencial para a atividade da enzima Taq DNA polimerase, pois fornece estabilidade e define a especificidade da reação.

Glicerol: ajuda a dar estabilidade para a Taq DNA polimerase, além de possuir importante papel na desnaturação da fita de DNA molde e no aumento da especificidade de anelamento dos *primers*. Deve-se observar para sempre utilizar um glicerol viável (límpido e denso), pois caso inviável, pode inferir no resultado final da reação.

dNTP's (desoxirribonucleotídeos fosfatados): são nucleotídeos livres presentes no

mix da reação que serão incorporados à nova fita pela ação da Taq DNA polimerase.

Primers (forward e reverse): atuam como iniciadores da nova sequência de DNA. Além disso, limitam a região a ser amplificada.

Taq DNA polimerase: possui uma atividade enzimática fundamental, realizando a incorporação de novos nucleotídeos e a ligação entre esses e a fita molde, sintetizando novas cadeias de DNA.

DNA molde: amostra de DNA total que servirá de molde para a síntese de novas sequências, sendo estas delimitadas pelo uso dos *primers*.

Antes de iniciar a reação, é importante averiguar a viabilidade dos reagentes (prazo de validade, aspecto, características etc.). Além disso, cada reagente possui concentrações iniciais específicas, variando conforme os fabricantes. Dessa forma, deve-se sempre ler a bula que acompanha os reagentes e ajustar conforme seu protocolo. Outra etapa importante da reação é a configuração correta das temperaturas e dos tempos de cada ciclo no termociclador, evitando resultados falsos ou falhos.

Passo a passo da técnica de PCR convencional

1º Limpe a capela de PCR e depois a de DNA com álcool 70% (limpe de cima para baixo, e de trás para frente). Coloque dentro da capela todos os materiais a serem utilizados: caixinhas de ponteiras P10, P20, P1000, microtubos estéreis de 0,2 mL e 1,5 mL (específicos para PCR ou DNA) e caneta para identificar as amostras. Abra as caixinhas dentro das capelas, e ligue a luz UV por, no mínimo, 15 minutos.

Nota: nunca abra caixinhas de ponteiras e microtubos estéreis fora das capelas.

2º Faça os cálculos de acordo com a quantidade de amostras a serem amplificadas na reação, considerando ainda o controle negativo (CN) e o controle positivo ou padrão (CP). Por segurança, lembre-se de sempre fazer o cálculo para uma ou duas amostras a mais. Quando passar 15 minutos, desligue a luz UV e coloque os EPIs (jaleco, luvas sem pó e máscara). Pegue os reagentes necessários para a reação: água ultrapura + tampão (*buffer*) + MgCl₂ + glicerol + *primers forward* e *reverse* + dNTPs, lembrando de conservá-los no gelo enquanto estiverem na capela. A Taq DNA polimerase deverá ser pega somente no momento de uso e novamente armazenada a -20 °C.

3º Separe e feche todos os microtubos que serão ocupados, com cuidado para não

contaminar a parte interna. Depois, quando todos os microtubos estiverem fechados, identifique-os na tampa (Mix, CN, CP, Amostra 1, Amostra 2 etc.).

4º Pipete os reagentes (água, tampão, MgCl₂, glicerol, *primers forward* e *reverse* e dNTP's) no tubo do mix (microtubo de 1,5 mL), sempre iniciando com o reagente de maior volume. Vortexe por 10 a 15 segundos. Depois, adicione a Taq DNA polimerase.

Nota: após a adição da Taq DNA polimerase, o mix não poderá mais ser vortexado.

5º Aliquote o mix em microtubos de 0,2 mL e leve-os para a capela de DNA, onde será adicionado, em cada um, o volume de amostra de DNA, de acordo com a identificação de cada microtubo.

Nota: pode-se levar material da capela de PCR para a de DNA, mas nunca o contrário.

6º Ligue e programe o termociclador. Caso haja bolha dentro dos microtubos, será necessário retirá-las (dar um *spin*). Coloque os microtubos no termociclador e dê "*start*", iniciando a reação.

7º Limpe as capelas e o material utilizado com álcool 70% e ligue a luz UV por, no mínimo, 15 minutos.

2.7. Eletroforese em gel

A eletroforese é uma técnica analítica capaz de separar moléculas de ácido nucléicos (e outras moléculas, como RNA e proteínas). Essas moléculas são dispostas em um gel de agarose ou de poliacrilamida, sobre o qual é aplicada uma corrente elétrica, separando as moléculas de acordo com seu tamanho e carga. No caso da PCR, a eletroforese possibilita a visualização do produto dessa reação, ou seja, possibilita a visualização dos milhares de fragmentos de DNA formados.

Genericamente, a eletroforese funciona da seguinte forma: uma fonte gera uma corrente elétrica que é transmitida para uma cuba. Esta, por sua vez, comporta o gel de agarose contendo o DNA. Como as moléculas de DNA apresentam carga negativa, irão migrar em direção ao polo positivo. Moléculas menores irão percorrer o gel mais fácil e rapidamente, ficando mais próximas do polo positivo. Já as moléculas maiores terão mais dificuldade de permear o gel, ficando mais próximas do polo negativo. Após a aplicação da corrente, o gel pode ser analisado, observando-se os tamanhos de fragmentos formados. Cada “linha” visualizada em um gel é uma “banda”. Cada banda contém milhares de fragmentos de DNA do mesmo tamanho. Ao comparar a distância de migração dos fragmentos de DNA com a distância de migração dos fragmentos de DNA de um padrão, você conseguirá determinar o tamanho do seu fragmento. Bandas muito

fracas ou bandas representando fragmentos muito pequenos geralmente indicam pouco produto ou contaminantes na amostra, respectivamente. Dessa forma, você conseguirá determinar a qualidade e o tamanho do seu produto de PCR, bem como, por exemplo, realizar uma análise qualitativa, observando se o seu fragmento de interesse foi realmente amplificado.

Passo a passo para produzir um gel de agarose

As medidas a seguir referem-se ao preparo de um gel de agarose a uma concentração de 3%, contendo EtBr (brometo de etídio, $C_{21}H_{20}BrN_3$). Alguns protocolos exigem outras concentrações de gel. Nesse caso, ajuste as quantidades e volumes.

1º Em uma balança analítica, pese 2,150 g de agarose.

2º Em uma proveta, meça 70 mL de TBE 1X.

3º Em um Erlenmeyer de 150 mL, misture os 2,150 g de agarose e os 70 mL de TBE 1X. Realize movimentos circulares até que se dissolva todo o conteúdo e, em seguida, cubra a boca do Erlenmeyer com plástico filme, fazendo pequenos furos na superfície.

4º Coloque no micro-ondas por aproximadamente 1 minuto. Retire do micro-ondas e novamente faça movimentos circulares. Aqueça por mais 1 minuto aproximadamente (observe para não deixar o conteúdo transbordar).

Nota: cuidado para não se queimar ao retirar o Erlenmeyer do micro-ondas. Utilize os EPIs mais adequados.

5° Leve o Erlenmeyer com a agarose dissolvida para uma capela de exaustão, que deverá conter o EtBr, uma pipeta, ponteiras e um recipiente de descarte específico (os itens citados devem ser exclusivos para esse fim; se possível, também disponibilizar uma capela de exaustão específica para manuseio do EtBr). Além disso, a “caminha” também já deve estar devidamente preparada dentro da capela (fitas nas suas extremidades e pente devidamente encaixado, observando que esteja na altura correta).

6° Baixe o vidro da capela, a fim de minimizar a exposição ao brometo (é cancerígeno quando volátil). É indispensável o uso de jaleco, luva e máscara.

7° Adicione 3,5 µL de EtBr (0,5 µg/mL) à mistura presente no Erlenmeyer. Depois, realize movimentos circulares suaves para completa diluição do Brometo.

Nota 1: para géis de 3%, usa-se 3,5 µL de EtBr (0,5 µg/mL), porém, para géis de 1%, deve-se utilizar 3 µL de EtBr (0,5 µg/mL).

Nota 2: o EtBr geralmente encontra-se a uma concentração de 10 mg/mL. Para preparar uma solução de trabalho a 0,5 µg/mL, dilua 0,5 µL de solução estoque de EtBr e complete o volume para 10 mL com água destilada/deionizada.

8° Derrame lentamente a mistura dentro da caminha, certificando-se de que ela esteja bem nivelada, e observe para que não se formem bolhas.

9° Deixe a caminha dentro da capela por, no mínimo, 30 minutos, até a completa solidificação do gel de agarose.

10° Após completa solidificação, retire as fitas e o pente com cuidado, assim como ao retirar o gel da caminha.

Nota: alguns protocolos não utilizam mais EtBr, mas outros corantes fluorescentes de ácidos nucleicos, como o GelRed. Nesse caso não é necessário adicionar EtBr ou qualquer outro corante no Erlenmeyer contendo a agarose fundida. O GelRed é acrescentado diretamente na amostra quando ela é adicionada ao gel, substituindo também o azul de bromofenol.

Se liga!

Caso o gel não seja utilizado logo após seu preparo, pode-se armazená-lo na geladeira, sempre envolto primeiramente em plástico filme e, depois, em papel alumínio. Não esqueça de identificá-lo com o seu nome, o dia em que foi preparado e a sua concentração.

2.7.I. Preparo do *loading buffer*

O *loading buffer* é um tampão de carregamento de amostra, utilizado na técnica de eletroforese em gel, com a finalidade de auxiliar na migração das amostras pela superfície do gel de agarose submetido a uma corrente elétrica. Esse tampão necessita de um açúcar, como sacarose, glicerol ou ficoll, que, devido à sua alta densidade, assegurará que a amostra de DNA entre no poço pela força da gravidade, além de corantes, como o azul de bromofenol e o xileno cianol, que permitirão visualizar a migração.

Na Tabela 1 estão descritas as quatro formas de preparo do *loading buffer*. Para todas essas formas, acrescenta-se água destilada para completar 10 mL. Recomenda-se depositar primeiramente o corante em um tubo do tipo falcon de 25 mL, seguindo com a adição de 3 mL de glicerol e, então, completar o volume com aproximadamente 7 mL de água destilada/deionizada. O conteúdo deve ser agitado e, caso haja necessidade, aquecido para completa dissolução.

Tabela 1. Protocolos de preparo do *loading buffer* 6X

Tampão 6X	Armazenamento
0,25% (0,025 g) de azul de bromofenol + 0,25% (0,025 g) de xileno cianol + 30% (3 mL) de glicerol	Refrigerado a 4 °C
0,25% (0,025 g) de azul de bromofenol + 30% (3 mL) de glicerol	Refrigerado a 4 °C
40% (4 g) de sacarose + 0,25% (0,025 g) de azul de bromofenol/xileno cianol	Refrigerado a 4 °C
0,25% (0,025 g) de azul de bromofenol + 0,25% (0,025 g) de xileno cianol + 15% (1,5 g) de ficoll (tipo 400)	Temperatura ambiente

Nota: para qualquer um dos modos de preparo, adicione água destilada/deionizada (completando 10 mL).

Passo a passo da eletroforese ("corrida do gel")

Antes de adicionar as amostras no gel de agarose, faça um desenho da disposição delas em um papel, assim como dos controles e marcadores. Assim, você poderá identificá-las após a corrida.

1° Coloque a solução de TBE 1x na cuba, o suficiente para apenas cobrir o gel de agarose.

2° Leve o gel até a cuba, com muito cuidado, mergulhando-o lentamente.

3° Para cada amostra, adicione 2 µL de *loading buffer* na placa de preparo de amostra, fazendo pequenos pontinhos. Descarte a ponteira no recipiente de descarte.

4° Com uma nova ponteira, colete 3 µL da amostra de PCR (do microtubo) e homogeneíze com o *loading buffer*, em torno de 3 vezes.

5° Ajuste o volume da ponteira para 5 µL (2 µL de *loading buffer* + 3 µL da amostra) e homogeneíze novamente.

6° Depois disso, deposite o conteúdo da ponteira no segundo poço do gel de agarose (no primeiro estará o marcador de 100 ou 50 pb) e descarte a ponteira. Sempre troque a ponteira a cada amostra diferente.

7° Repita o processo a partir do 4° passo, de acordo com a quantidade de amostras analisadas.

8° Depois de adicionar todas as amostras, adicione o CN em seu respectivo poço (se for o caso, também adicione o CP). Isso irá evitar possíveis contaminações.

9° Adicione os marcadores (3 µL se for o marcador de 100 pb; e 4 µL se for o marcador de 50 pb). Para isso, utilize o primeiro, o do meio e o último poços do gel (lembrando de deixar esses espaços na hora da adição das amostras).

Após a adição das amostras no gel de agarose, você deve ajustar a fonte de eletroforese:

1° Observe a correta posição da cuba e conecte os cabos em seus respectivos pontos na fonte, assim como na cuba de eletroforese: cabo preto (negativo) no lado esquerdo e cabo vermelho (positivo) no lado direito.

2° Ajuste os parâmetros de corrida do gel na fonte. Ex.: 100 V, 100 mA e o tempo. Esses parâmetros são variáveis, alterando de acordo com o tamanho da amostra, protocolo etc.

3° Inicie a corrida apertando o botão "Run" (ou "Start", ou ainda outro, dependendo do modelo da fonte).

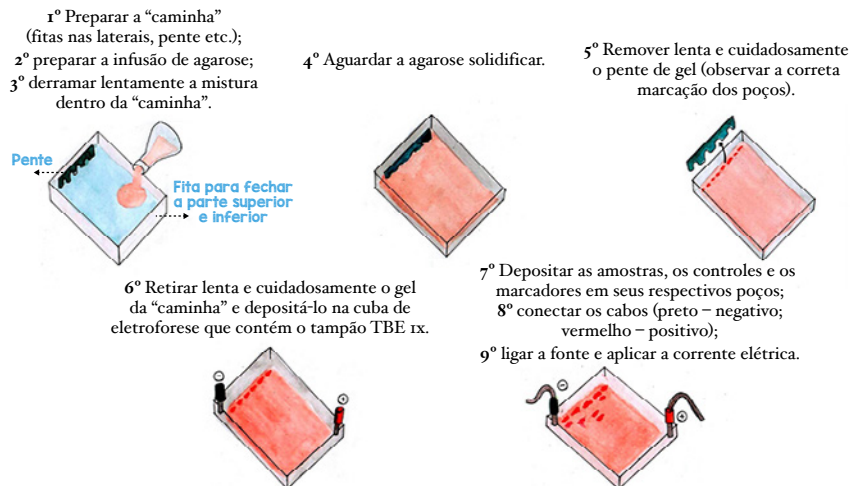


Figura 9. Resumo das etapas da preparação de um gel de agarose e corrida de amostras

Obs.: o gel da eletroforese apresenta coloração transparente/opaca. Na figura o gel tem coloração vermelha apenas para fins ilustrativos.

Após a corrida das amostras, deve-se retirar cuidadosamente o gel da cuba de eletroforese e colocá-lo em uma bandeja de plástico. Esta irá para o transiluminador, equipamento com luz ultravioleta que revelará as bandas.

1º Ligue o equipamento e o computador, abrindo seu respectivo software.

2º Ligue a luz ultravioleta do equipamento e, no software, ajuste a imagem conforme desejado, alterando o foco e a intensidade da luz.

Nota: como esse equipamento emite luz UV, ele deve ser manipulado somente com os filtros e EPIs (óculos e luvas) adequados.

3º Capture e salve a imagem.

4º Descarte corretamente o gel, e lave e organize todo o material.

Se liga!

O tampão TBE da cuba tem limite de 4 vezes de uso. Para manter esse controle, sobre a tampa da cuba existe uma marcação de quantas vezes aquele TBE já foi utilizado. Assim, a cada corrida, um número deve ser riscado e, ao atingir o limite, o TBE deverá ser devidamente descartado, e um novo ser acrescentado à cuba (após sua devida higienização).

2.8. PCR em tempo real

Passo a passo da técnica de PCR em tempo real (TaqMan® ou SYBR® Green)

1º Limpe a capela de PCR e depois a de DNA com álcool 70% (limpe de cima para baixo, e de trás para frente). Coloque dentro da capela todos os materiais que for utilizar na técnica: caixinhas de ponteiras P10, P20 e P200 com filtro, microtubos estéreis de 1,5 mL e microplacas ou microtubos em tiras (*strips*) específicos para qPCR. Ligue a luz UV por, no mínimo, 15 minutos.

Nota: nunca abra caixas de ponteiras e microtubos estéreis fora das capelas.

2º Faça os cálculos de acordo com a quantidade de amostras (duplicatas ou triplicatas) a serem amplificadas na reação, considerando ainda o CN e o CP. Por segurança, lembre-se de sempre fazer o cálculo para uma ou duas amostras a mais. Quando passar 15 minutos, desligue a luz UV e coloque os EPIs (jaleco, luvas sem pó e máscara). Pegue os reagentes necessários para a reação, vortexe-os e dê um *spin* (evitando que fiquem na tampa do microtubo e diminuindo risco de contaminação).

3º Em microtubo de 1,5 mL, faça a solução mix utilizando TaqMan® (nesse caso,

TaqMan® Universal PCR Master Mix + água ultrapura + *primers forward* e *reverse* + sonda) ou SYBR® Green (nesse caso, PowerUp® SYBR® Green Master Mix + água ultrapura + *primers forward* e *reverse*), sempre iniciando com o reagente de maior volume. Vortexe por 10 a 15 segundos. Se possível, realize uma pequena centrifugação do tipo *spin*, garantindo que os reagentes que porventura ficaram na face interna da tampa do microtubo desçam para a solução. Esse procedimento evita contaminações quando o microtubo do Master Mix for aberto.

4º Aliquote o mix nos microtubos em tiras (*strips*) ou na microplaca (específicos para qPCR) e leve-os para a capela de DNA, onde será adicionado um volume de amostra de DNA; posteriormente os microtubos serão fechados com tampas e selos ópticos específicos, cuidando ainda para que não se formem bolhas.

Nota 1: tenha muito cuidado na hora de fechar os *strips* ou de vedar a microplaca, uma vez que são utilizados tampas e selos ópticos. Nesse caso, utilize os instrumentos indicados, evitando manchas ou arranhões nas tampas/selos (pelos quais é realizada a leitura). Após o fechamento, centrifugue utilizando uma centrífuga de placa ou uma adaptável para *strip*, e observe se o volume está dentro do esperado para cada reação, bem como se não há bolhas.

Nota 2: é interessante fazer um desenho, previamente em um papel, do *strip* ou da microplaca, identificando a posição de cada amostra. Lembre-se que tanto placas como *strips* possuem marcações indicando cada posição.

5º Ligue o computador e o termociclador do *Real Time*, encaixe os *strips* ou a microplaca no equipamento e programe a reação no software, observando atentamente a correta configuração do método e ajustando o tempo e a temperatura de cada etapa, além de identificar corretamente as amostras no software.

Nota: leia com a atenção a bula do fabricante da Master Mix que contém a Taq DNA polimerase, pois existem tempos e temperaturas de ativação da enzima no passo inicial que variam entre os fabricantes, bem como as condições de temperatura e tempo de anelamento e extensão.

6º Inicie a reação.

7º Limpe as capelas e o material utilizado com álcool 70% e ligue a luz UV por, no mínimo, 15 minutos.

2.9. Sequenciamento de DNA

Passo a passo para sequenciamento de DNA (Plataforma ABI 3500)

Os protocolos descritos a seguir aplicam-se ao 3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems®). Antes da reação de sequenciamento, as seguintes etapas deverão ser realizadas:

a) extração de DNA.

b) Quantificação e corrida em gel do material extraído: para verificar concentração e integridade do DNA.

c) Amplificação por PCR.

d) Purificação do produto da PCR: essa etapa tem por finalidade remover restos de *primer* e de produtos excedentes que, se não retirados, interferem no sequenciamento. Pode ser realizada com kits e protocolos comerciais, seguindo o recomendado pelo respectivo fabricante. Entretanto, de maneira geral, segue-se a purificação do produto de PCR utilizando polietilenoglicol (PEG) a 20% PEG 8000 e 2,5 M de NaCl:

1º Prepare a solução estoque de PEG diluindo 20 g de PEG 8000 e 14,6 g de NaCl em 100 mL de água deionizada. Autoclave e armazene em geladeira.

2º Em microtubos de 1,5 mL, adicione 25 µL da solução estoque de PEG e 25 µL do produto de PCR, e dê um *spin* (use um microtubo devidamente identificado para cada amostra).

3º Agite em vórtex.

4º Aqueça a 37 °C por 15 minutos.

5º Centrifugue a 12.000 rpm por 10 minutos e descarte o sobrenadante.

6º Adicione 500 µL de etanol 50%

7º Centrifugue a 12.000 rpm por 5 minutos, despreze o sobrenadante e seque levemente a boca do tubo, deixando-o deitado por 1 hora para evaporar todo o etanol (ou o tempo que for necessário. Observe a umidade do ar, pois ela pode dificultar essa secagem).

8º Adicione 30 µL de água Milli-Q.

9º Coloque em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

10º Armazene em freezer a -20 °C.

e) Quantificação do produto purificado: para reação de sequenciamento. O produto de PCR deve respeitar as seguintes quantificações:

Tabela 2. Quantificações para produto de PCR

Tamanho do produto de PCR	Quantidade necessária
100-200 pb	1-3 ng
200-500 pb	3-10 ng
500-1.000 pb	5-20 ng
1.000-2.000 pb	10-40 ng
> 2.000 pb	40-100 ng

Legenda: pb – pares de base; ng – nanogramas.

Após garantir uma boa extração de DNA, reação de PCR, purificação do produto de PCR e alcançar adequada quantidade de material de partida (DNA molde), sua amostra estará pronta para a reação de sequenciamento.

f) Reação de sequenciamento: para realizar uma reação de sequenciamento, são necessários os seguintes componentes:

f.1) DNA molde na quantidade adequada (ver item "e"): a qualidade da amostra de PCR é um dos fatores mais críticos no sequenciamento. A PCR deve estar limpa e livre de contaminantes. A qualidade de seu sequenciamento será diretamente proporcional à qualidade de sua PCR;

f.2) primer 5 pmol/μL: o ideal é que os *primers* sejam recém-diluídos;

f.3) reagente BigDye Terminator (exclusivo para a plataforma 3500 Series Genetic Analyzers, que reúne dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂ e tampão tris-HCl);

f.4) tampão de sequenciamento (exclusivo para a plataforma 3500 Series Genetic Analyzers); e

f.5) água livre de RNase/DNase.

Identifique um microtubo de 1,5 ou 2,0 mL como “mix + nome do *primer*”, uma vez que para cada *primer* um mix diferente deverá ser preparado. Esse tubo irá conter: tampão de sequenciamento, *primer*, reagente BigDye Terminator e água, respeitando os seguintes volumes:

Tabela 3. Volumes para mix (por amostra)

Tampão de sequenciamento	1,5 μL
<i>Primer</i> 5 pmol/μL	1 μL
Reagente BigDye	1 μL
Água	q.s.p. 10 μL (considerando mais o volume de amostra)

Legenda: q.s.p. – quantidade suficiente para.

O volume de água a ser adicionado deve ser o suficiente para que a reação tenha 10 μL por amostra. Até agora temos: tampão de sequenciamento + *primer* + BigDye = 3,5 μL. Então, se você for utilizar 4 μL de amostra: 3,5 μL (mix) + 4 μL (amostra) = 7,5 μL. Assim, seu mix deve conter 2,5 μL de água.

ATENÇÃO! No mix não deve ser adicionada a amostra. Nessa etapa, a amostra só é considerada para o cálculo e deverá se a última a ser adicionada, diretamente na placa.

Para saber o volume total de cada item a ser adicionado no mix, basta multiplicar pelo número de amostras. O ideal é considerar ainda 3 ou 4 amostras a mais, uma vez que pode haver erro na calibração das pipetas. Ex.: para um sequenciamento de 10 amostras, prepare o mix considerando 12 amostras.

Tabela 4. Volume total de cada item do mix (por amostra)

	1x	12x
Tampão de sequenciamento	1,5 µL	18 µL
Primer 5 pmol/µL	1 µL	12 µL
Reagente BigDye	1 µL	12 µL
Amostra	4 µL	48 µL
Água	2,5 µL	30 µL
Total	10 µL	120 µL

Ainda, se possível, realize a reação sob baixa luminosidade, uma vez que o reagente BigDye Terminator apresenta fluoróforos que podem se degradar na presença de luz.

Após a preparação do mix, dispense 5,5 ou 6 µL (dependendo se você irá utilizar

4,5 ou 4 µL de amostra) em cada poço de uma placa de 96 poços (a placa também é exclusiva para a plataforma 3500 Series Genetic Analyzers).

Siga com a adição da amostra em cada poço, observando muito bem a ordem de localização de cada amostra (para isso, faça anteriormente um “desenho” da placa, indicando a localização de cada amostra). Observe para que não se formem bolhas.

Após a adição do mix e de cada amostra, sele a placa com o plástico filme adesivo para microplacas e leve-a ao termociclador.

O reagente BigDye Terminator apresenta uma ciclagem universal no termociclador (Tabela 5).

Tabela 5. Ciclagem do BigDye Terminator no termociclador

	Ciclos	Configuração (temperatura e tempo)	Rampa
Desnaturação inicial	1	96 °C – 1 min	100%
Desnaturação	35	96 °C – 15 seg	100%
Anelamento		50 °C – 15 seg	30%*
Extensão		60 °C – 4 min	100%

*A queda de temperatura de 96 °C para 50 °C de cada um dos 35 ciclos deve ser de 1 °C/seg, portanto, é preciso configurar o termociclador para uma rampa de 30% nesse ponto.

g) Purificação da reação de sequenciamento: após o tempo em termociclador (3 horas e 40 minutos aproximadamente), siga com esta etapa, na qual serão removidos restos de *primer*, de dNTPs, ddNTPs, enzima e sais que não foram incorporadas na reação, para que não interfiram na leitura no sequenciador. Existem diferentes protocolos para essa etapa que utilizam kit comerciais. Para estes, siga o recomendado pelo fabricante. Existem ainda protocolos mais “caseiros”, como purificação da reação de sequenciamento por precipitação com etanol/EDTA. Nesse caso, para 10 µL de volume final de reação de sequenciamento em uma placa de 96 poços (ou tubo de 0,2 mL):

1º Dê um rápido *spin* na placa e remova sua vedação.

2º Adicione 2,5 µL de EDTA a 125 mM pH 8,0. Coloque o EDTA com a pipeta e misture-o bem com a solução da reação (pode misturar com a pipeta, fazendo um sobe-desce 3x para misturar as soluções). O EDTA deve ser preparado preferencialmente no dia. Esse ponto é fundamental para que o EDTA atue como quelante de íons antes da próxima etapa.

3º Adicione 30 µL de etanol 100%. Procure utilizar etanol absoluto de qualidade, e sempre com grau para biologia molecular. Faça também alíquotas do etanol e evite deixar o frasco aberto por muito tempo, pois o etanol absorve umidade do ambiente.

4º Vede a placa e a passe no vórtex, em baixa velocidade, por 10 segundos.

5º Incube a placa à temperatura ambiente, protegida da luz, por 15 minutos.

6º Centrifugue a placa (escolha uma das opções) a 4 °C:

- 1.400 – 2.000 x g por 45 min;
- 2.000 – 3.000 x g por 30 min.

Quanto maior a velocidade e o “g”, maior o rendimento da precipitação, mas pode aumentar também a precipitação de ddNTPs fluorescentes, que ocasionam manchas indesejadas no sequenciamento. Dessa forma, é preciso adequar tempo e “g” para cada centrífuga específica. Sugestão de escolha inicial: 3.000 g por 30 minutos. Depois, deve-se avaliar o rendimento e as manchas. No caso de baixo rendimento (a sequência começa a ter qualidade em bases posteriores a 20-25 bases) deve-se aumentar o tempo de centrifugação e/ou o “g”. No caso de manchas fluorescentes (aparecem sempre nas posições de 7080, 110120 e 180190 bases), é preciso reduzir o tempo de centrifugação e/ou o “g”. Assim que a centrifugação terminar, proceda imediatamente para a etapa seguinte.

7º Retire a vedação da placa e inverta-a em cima de um papel absorvente. Evite dar fortes solavancos na placa.

8º Coloque a placa virada para baixo no papel absorvente na centrífuga, e dê um *spin*.

Essa etapa é conhecida como *spin* invertido. Deixe a centrífuga chegar, no máximo, a 700-800 rpm e já a pare.

9° Adicione 30 µL de etanol 70%. Esse etanol deve ter sido preparado no dia. Nunca utilize etanol 70% preparado há mais de um dia.

10° Vede a placa e a passe no vórtex, em baixa velocidade, por 10 segundos.

11° Centrifugue a placa a 4 °C com o mesmo “g” que utilizou na etapa 6 por 15 minutos. Assim que a centrifugação terminar, proceda imediatamente para a etapa seguinte.

12° Retire a vedação da placa e inverta-a em cima de um papel absorvente. Evite dar fortes solavancos na placa.

13° Segundo *spin* invertido: coloque a placa virada para baixo no papel absorvente na centrífuga e dê um *spin*. Deixe a centrífuga chegar, no máximo, a 700-800 rpm e já a pare.

14° Após esse último *spin* invertido é preciso secar bem a placa. Sugestão: coloque a placa

não vedada em um termociclador a 60 °C por 10 minutos. Deixe a tampa do termociclador aberta.

15° Ponto de parada: após essa purificação, a placa com as amostras poderá ser armazenada por até 30 dias a -20 °C.

Se for correr as amostras imediatamente, adicione 10 µL de formamida *bi-di* (altamente deionizada) em cada poço da placa; vede a placa e passe-a no vórtex, em baixa velocidade, por 10 segundos. Dê um rápido *spin* na placa; aqueça a placa em um termociclador a 95 °C por 3 minutos (desnaturação) e depois a coloque imediatamente no gelo. Assim que a placa esfriar, ela estará pronta para ser colocada no instrumento.

h) Leitura no equipamento: essa plataforma exige uma série de procedimentos antes da leitura das amostras. Siga todas as instruções, certificando-se do devido andamento desses procedimentos, assim como da correta configuração do método no software.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. P. *et al.* Avaliação de cinco protocolos de extração de DNA de *Polytrichum Juniperinum* Hedw. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, Bagé, v. 7, n. 2, p. 1-2, 2015. Trabalho apresentado no 7º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2015, Bagé. Disponível em: <http://bit.ly/2xusOrt>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- BARKER, K. *Na bancada*: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: artmed, 2002.
- BECKER, C. E. *Utilização da curva de melting como screening para análise dos genótipos A, D e F do vírus da hepatite B em pacientes de um hospital geral do Sul do Brasil*. 2012. Tese (Doutorado em Hepatologia) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2Xv87v2>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- BRUNO, A. N. *Biotecnologia I*: princípios e métodos. Porto Alegre: artmed, 2014.
- BRUNO, A. N. *Biotecnologia II*: aplicações e tecnologias. Porto Alegre: artmed, 2017.
- CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. A análise de DNA por eletroforese. *In*: ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. *Biologia Molecular*: técnicas moleculares. São José do Rio Preto: AC&T, 15 out. 2004. Disponível em: <http://bit.ly/329QOyl>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- CRISAFULI, F. A. P.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S. Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *European Biophysics Journal*, New York, v. 44, n. 1-2, p. 1-7, 2014. Disponível em: <http://bit.ly/2NDgReo>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- FLEURY. PCR quantitativo em tempo real (real-time PCR). *In*: FLEURY. *Manuais diagnósticos*. São Paulo: Fleury Medicina e Saúde, 13 abr. 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2XtKH9j>. Acesso em: 6 fev. 2019.
- FRUEHWIRTH, M.; DELAI, R. M.; FOLHA, R. A. Técnicas de biologia molecular aplicadas a perícia e ciência forense. *Derecho y Cambio Social*, Lima, ano 12, n. 42, p. 1-25, 2015. Disponível em: <http://bit.ly/2L4Scgv>. Acesso em: 14 maio 2018.
- GOUVEIA, J. J. S.; REGINATO, L. C. A. Eletroforese de ácidos nucleicos. *In*: REGITANO, L. C. A. *et al.* (ed.). *Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal*. São Carlos: Embrapa, 2007. p. 22-30. Disponível em: <http://bit.ly/2XIYAAI>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- HIMME, B. DNA probes. *In*: LEARNING PATHWAYZ. *Pathwayz*: biotechnology. [S. l.]: Learning Pathwayz, 21 jun. 2016. Disponível em: <http://bit.ly/32dgrhC>. Acesso em: 14 maio 2018.
- JACKISCH, M. L. *et al.* Adaptações de técnica *in house* de extração de DNA de *Candida* para utilização em qPCR. *In*: SALÃO DE ENSINO E EXTENSÃO, 9., SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO

- CIENTÍFICA, 24., 2016, Santa Cruz do Sul. *Anais [...]*. Santa Cruz do Sul: Unisc, 2016. p. 91. Disponível em: <https://bit.ly/2Z14dGU>. Acesso em: 16 mai. 2018.
- KARP, G. *Biologia celular e molecular*: conceitos e experimentos. 3. ed. Barueri: Ed. Manole, 2005.
- KHAN ACADEMY. Eletroforese em gel. In: KHAN ACADEMY. *Biologia*: introdução à biotecnologia. Mountain View: Khan Academy, [20--]. Disponível em: <http://bit.ly/2JsNHJ8>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- KHAN ACADEMY. Reação em cadeia da polimerase (PCR). In: KHAN ACADEMY. *Biologia*: introdução à biotecnologia. Mountain View: Khan Academy, [20--]. Disponível em: <http://bit.ly/2JfvYpR>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- LARA, F. J. S. (org.). *Hibridação de ácidos nucléicos*. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Ed., 2002.
- MAHONY, J. B. *et al.* Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 31, n. 7, p. 1.753-1.758, 1993. Disponível em: <http://bit.ly/2LaGMYL>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- MILLAR, B. C. *et al.* A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 139-147, 2000. Disponível em: <http://bit.ly/2Jd3OMo>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 16, n. 3, p. 1.215, 1988. Disponível em: <http://bit.ly/2FUoKFA>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Revista Brasileira de Medicina*, São Paulo, v. 67, p. 1-9, nov. 2010. Disponível em: <http://bit.ly/32bLvHW>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, DF, ano 7, v. 33, p. 10-13, 2004.
- OLIVEIRA, T. M. S. *PCR em tempo real*: métodos e aplicações. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010. Disponível em: <http://bit.ly/2LFb459>. Acesso em: 6 fev. 2019.
- QIAGEN. *Critical factors for successful real-time PCR*. Hilden: Qiagen, 2010. Disponível em: <http://bit.ly/2RXQiik>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, Washington, DC, v. 230, n. 4.732, p. 1.350-1.354, 1985. Disponível em: <http://bit.ly/2YwDbqU>. Acesso em: 5 jul. 2019.

- SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David William. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANDERS, M. F.; BOWMAN, J. L. *Análise genética: uma abordagem integrada*. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.
- SANTOS, E. A.; STERNBERG, R. T.; ALMEIDA, R. T. Influência da temperatura ambiente na análise do termociclador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 24., 2014, Uberlândia. *Anais* [...]. Rio de Janeiro: Sebeb, 2014. p. 1.522-1.525.
- SILVA, A. F.; PIOVESAN, A. C.; ROSSALU, L. M. Reação em cadeia da polimerase – PCR. *Revista Científica Unilago*, São José do Rio Preto, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016. Disponível em: <http://bit.ly/2xyLRkw>. Acesso em: 15 maio 2018.
- SPEROTTO, R. A. (org.). *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana*. Lajeado: Ed. Univates, 2014. Disponível em: <http://bit.ly/3obHokb>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- SUPPLY, P. *Multilocus variable number tandem repeat genotyping of Mycobacterium tuberculosis: technical guide*. Lille: Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille, 2005. Disponível em: <http://bit.ly/2FSpic3>. Acesso em: 5 jul. 2019.
- TOMAZ, P. R. X. SANTOS, J. R.; SANTOS, P. C. J. L. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de Melting. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 19-23, 2015. Disponível em: <http://bit.ly/2YE79cs>. Acesso em: 6 fev. 2019.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Nucleic acid: Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*. Wilmington: Thermo Scientific, 2010. Disponível em: <http://bit.ly/32b7i9p>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. Qubit assays. In: THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Thermo Fisher Scientific: industrial & applied science*. Wilmington: Thermo Scientific, 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2YJwT76>. Acesso em: 5 maio 2018.
- TOST, J. *et al.* Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 31, n. 9, p. 1-10, 2003. Disponível em: <http://bit.ly/2FNoTe7>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- VAN EMBDEN, J. D. A. *et al.* Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993. Disponível em: <http://bit.ly/2LDri3A>. Acesso em: 4 jul. 2019.
- VERMA, M. What is the difference between primer and probe? In: QUORA. *Quora*. Mountain View: Quora, 19 ago. 2017. Disponível em: <http://bit.ly/2FYGdNo>. Acesso em: 23 abr. 2018.

- VERZOLA, L. F. S. *Técnicas em biologia molecular*. Ribeirão Preto: Laboratório de patologia molecular: FMRP-USP, 2017. Disponível em: <http://bit.ly/2Jt5jEN>. Acesso em: 11 maio 2018.
- VIEIRA, D. P. Aula 1: PCR: princípios e tipos de reação. *In*: VIEIRA, D. P. *Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações*. São Paulo: IMTSP-USP, [20--]. p. 1-18. Disponível em: <http://bit.ly/2Jeuor>. Acesso em: 15 maio 2018.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (org.). *Biologia molecular básica*. 5. ed. Porto Alegre: artmed, 2014.

MICROBIOLOGIA

4

Autores

Betina Brixner

Carolina Fagundes Bilião

Jane Dagmar Pollo Renner

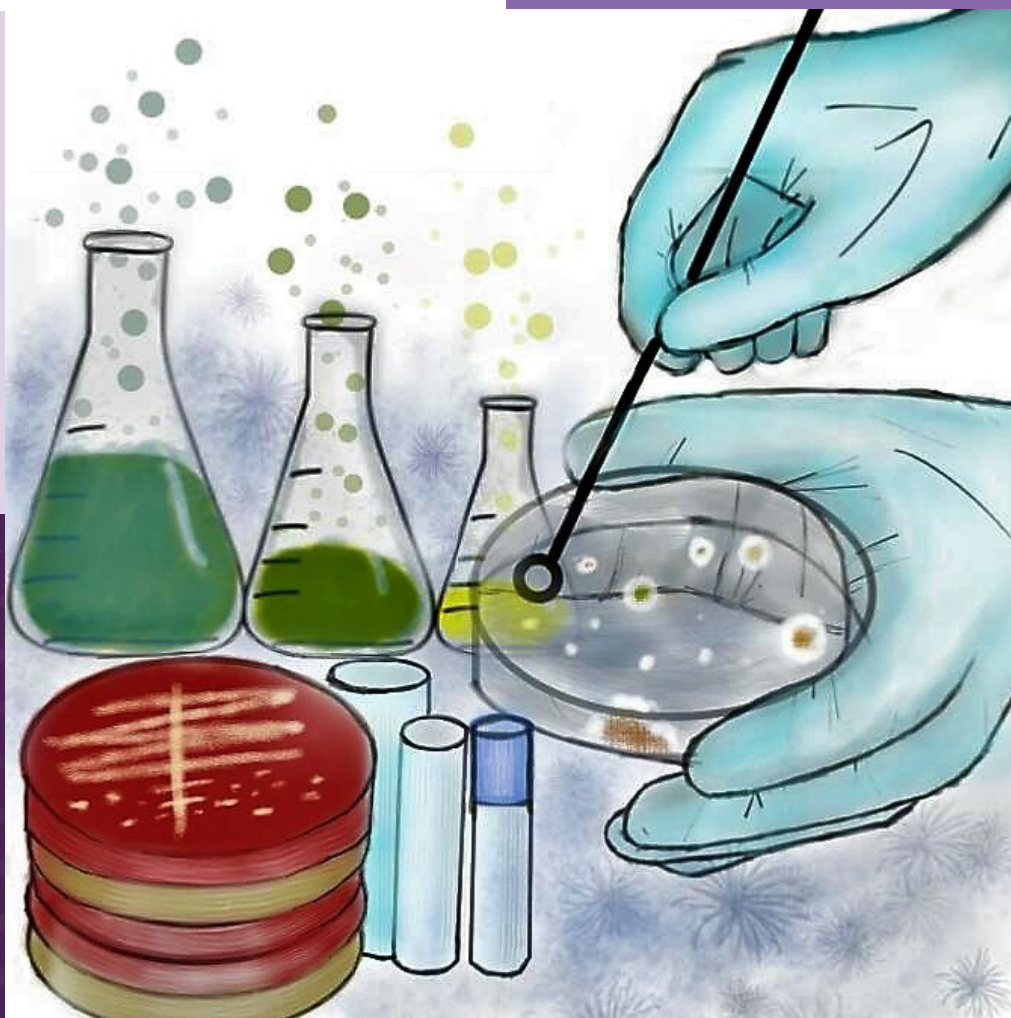
Nayanna Dias Bierhals

Valéria Louzada Leal

Vitória Gabriela B. da Silva

Ilustração

Letícia Clauhs



Microbiologia é a área dentro da biologia destinada ao estudo dos microrganismos, ou seja, dos organismos tão pequenos que não podem ser observados a olho nu. Essa área tem por objetivo a identificação, o estudo da forma, do modo de vida, da fisiologia, da genética e do metabolismo de vírus, bactérias, arqueanas, protozoários e alguns tipos de algas e fungos, assim como suas relações com outras espécies e o meio ambiente. Vale destacar que, apesar de incluso na categoria microrganismos, muitos cientistas não consideram os vírus como seres vivos, pois eles necessitam invadir uma célula viva para fazer sua replicação.

A microbiologia é muito importante, pois, apesar de muito pequenos, esses organismos microscópicos apresentam significativo papel em nossas vidas. Dessa forma, existem ainda subdivisões da microbiologia, destinadas a estudos mais específicos desses microrganismos de acordo com sua interação e aplicação no meio. Por exemplo:

- Microbiologia ambiental: dedicada ao estudo de todos os processos e formas de interação entre os microrganismos e o ambiente, a fim de manter uma qualidade ambiental e contribuir para o desenvolvimento sustentável da sociedade.
- Microbiologia clínica: dedicada ao estudo de microrganismos patogênicos para o ser humano, assim como o controle e prevenção das doenças associadas a eles.

- Microbiologia veterinária: dedicada à descoberta e ao estudo de microrganismos causadores de doenças em animais de diferentes espécies, bem como suas interações.
- Microbiologia industrial e biotecnologia: dedicada à descoberta e ao estudo de microrganismos com potencial para obter produtos e/ou processos de interesse comercial, ambiental e social como, por exemplo, vacinas, fármacos, componentes para diagnóstico, alimentos, bebidas, polímeros, combustíveis, produtos agropecuários e tratamento de resíduos.
- Microbiologia de alimentos: dedicada ao estudo de microrganismos envolvidos com a indústria de alimentos e bebidas, buscando e avaliando efeitos benéficos sobre a produção, assim como agentes contaminantes causadores de possíveis efeitos maléficos.
- Microbiologia do solo: dedicada à descoberta e ao estudo de microrganismos que vivem no solo e como essa interação afeta nas propriedades desse ambiente, seja ele natural ou com fins agrícolas.

De modo geral, a microbiologia divide-se em quatro grandes áreas, relacionadas aos tipos de microrganismos estudados, sendo elas a bacteriologia, que estuda as bactérias; a micologia, que estuda os fungos; a ficologia, que estuda as algas; e a virologia, que estuda os vírus e os príons (microrganismos acelulares). Neste capítulo vamos apresentar maiores informações, técnicas e protocolos aplicados nas áreas da bacteriologia e micologia.

I. BACTÉRIAS


Bactérias são organismos procariotos e unicelulares, presentes nos mais diversos ambientes de forma bastante interativa e dinâmica. Conhecer a morfologia e o metabolismo desses microrganismos é essencial para auxiliar na sua identificação, classificação e caracterização – informações de extrema relevância e aplicação nas mais diversas áreas, como na clínica médica, em alimentos, na indústria, entre outras.

I.I. Morfologia celular

Inúmeras formas de células bacterianas são conhecidas e, de modo geral, são

classificadas como: cocos (esféricos), bacilos (bastões), cocobacilos (ovoides), espirilos (helicoidais) e vibriões (semelhantes a uma “vírgula”). Apresentam tamanhos variados, desde cocos de cerca de 0,2 µm de diâmetro, por exemplo, a longas bactérias em forma espiralada de 10 µm de comprimento. Além disso, podem estar dispostas individualmente ou em agrupamentos, formando pares, cadeias, grupos e outras conformações, sendo cada uma específica de um gênero ou espécie bacteriana, conforme demonstrado na Quadro 1.

Quadro 1. Exemplos de formas e agrupamentos de bactérias

Forma	Descrição	Forma	Descrição
 Cocos	Estrutura esférica individual	 Bacilos	Estrutura em forma de bastão individualizado
 Diplococos	Estruturas esféricas aos pares	 Diplobacilos	Estruturas em forma de bastão aos pares
 Estreptococos	Estruturas esféricas formando cadeias	 Estreptobacilos	Estruturas em forma de bastão formando cadeias
 Estafilococos	Estruturas esféricas agrupadas como “cachos de uva”	 Vibrião	Estrutura em forma de bastão curvo, em formato de “vírgula”
 Cocobacilo	Estrutura ovoides, entre um coco e um bacilo	 Espiroqueta	Estrutura em forma helicoidal

1.2. Estrutura

A estrutura bacteriana é composta tipicamente por parede celular, citoplasma e estruturas externas à parede celular.

Parede celular: é a parte mais externa das bactérias, localizada no exterior da membrana citoplasmática. É uma estrutura rígida, formada por camadas de peptidoglicano, que confere sustentação estrutural e determina a forma da célula bacteriana.

A estrutura, a característica química e a espessura da parede celular dividem as bactérias em basicamente duas categorias fenotípicas: as Gram-positivas e Gram-negativas. A diferenciação entre esses dois grupos ocorre pelo método de coloração de Gram. Essa

coloração, desenvolvida pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884, tornou-se o mais importante e mais utilizado método de coloração nos laboratórios de bacteriologia, fornecendo informações fundamentais para a identificação de determinada bactéria. Ele baseia-se na composição química da parede celular bacteriana e na capacidade dessa estrutura de fixar ou não o corante cristal violeta, que é o que define a classificação das bactérias nesses dois grandes grupos.

As bactérias **Gram-positivas** são aquelas que apresentam uma parede celular composta por uma espessa camada de peptidoglicano, além de outros componentes, tais como ácidos teicoicos e lipoteicoicos.

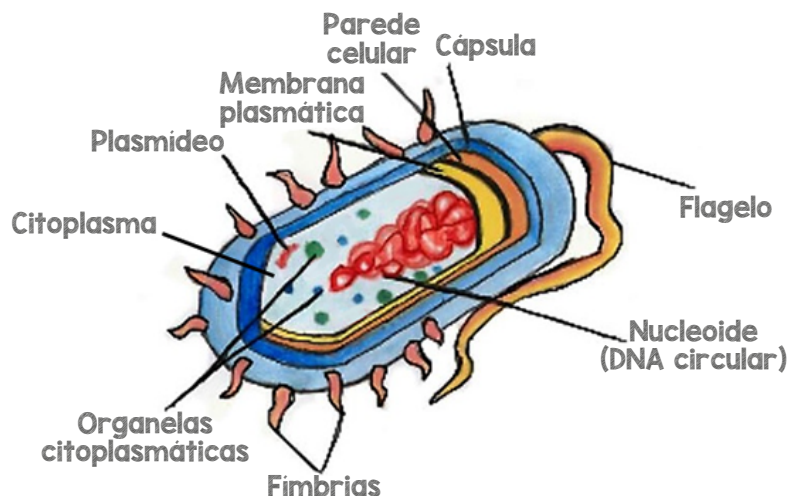


Figura 1. Estrutura básica de uma célula bacteriana

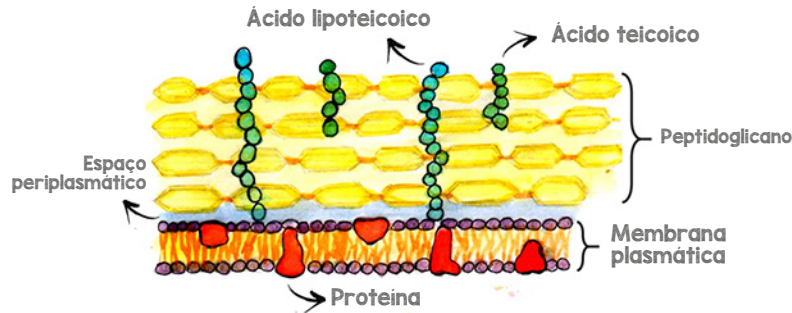


Figura 2. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas

As bactérias **Gram-negativas** são química e estruturalmente mais complexas do que as Gram-positivas. Esse grupo apresenta uma fina camada de peptidoglicano, por sua vez revestida por uma membrana externa constituída por lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos. O rompimento mecânico dessas bactérias é facilitado pela pequena camada de peptidoglicano.

Entretanto, algumas bactérias não são coradas pelo método de Gram como, por exemplo, bactérias álcoolácido resistentes do gênero *Mycobacterium*, que são identificadas a partir da utilização do corante de Ziehl-Neelsen. Ainda em relação à parede celular, algumas bactérias não apresentam essa estrutura, como as do gênero *Mycoplasma*.

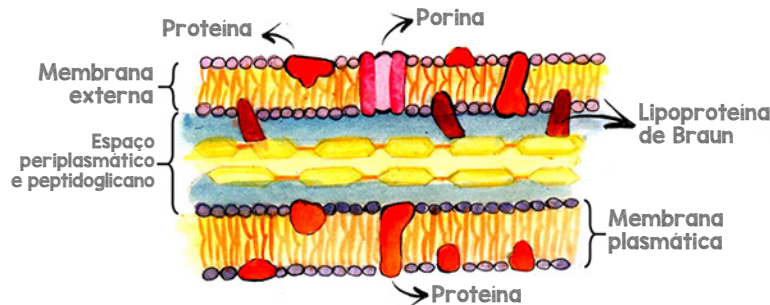


Figura 3. Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas

Membrana plasmática: também chamada de membrana celular, essa estrutura é composta por uma bicamada fosfolipídica e demais proteínas, e encontra-se envolvendo toda a célula bacteriana, regulando a passagem de nutrientes e trocas de substâncias com o exterior.

Citoplasma: é uma matriz fluidica constituída de uma mistura de todas as substâncias necessárias para manutenção da célula, como água, gases, nutrientes, proteínas, enzimas, produtos residuais etc. É delimitado pela membrana plasmática e é também onde se encontram demais organelas celulares, como ribossomos (responsável pela síntese proteica); grânulos (de diversos tipos, atuam no armazenamento de nutrientes); nucleóide (área em que está localizado o DNA bacteriano); plasmídeos (moléculas circulares de dupla fita de DNA, o qual se reproduz de maneira independente do DNA cromossômico); e *transposons* (segmentos de DNA que se movem de um local a outro dentro do genoma bacteriano).

Estruturas externas à parede celular: algumas bactérias podem ter uma ou mais estruturas externas à parede celular, tais como a glicocálice, os flagelos e as fímbrias.

O glicocálice é um material gelatinoso e limoso, produzido pela membrana celular e secretado para fora da parede celular, formando um revestimento extra. Dependendo da espécie, as bactérias podem apresentar um de dois tipos de glicocálice: camada limosa, fracamente organizada e não firmemente

ligada à parede celular, e a cápsula, altamente organizada e firmemente ligada à parede celular. Ambos os tipos impactam na virulência bacteriana, visto que essas estruturas protegem as bactérias de serem fagocitadas pelos leucócitos dos hospedeiros, além de facilitarem na adesão bacteriana aos tecidos humanos.

Os flagelos são apêndices proteicos filiformes responsáveis pela motilidade das bactérias, permitindo que elas se locomovam para locais em que haja nutrientes. Além disso, as bactérias flageladas podem possuir um ou mais flagelos na sua superfície, dispostos em diferentes locais da célula bacteriana, sendo considerado, assim, uma característica de identificação e classificação.

As fímbrias, também chamadas de *pili* (plural de *pilus*), são apêndices muito finos e rígidos, não associados à motilidade bacteriana. Surgem do citoplasma e estendem-se através da membrana plasmática, parede celular e glicocálice (se presente). Existem dois tipos de *pili*: aqueles dispostos por toda superfície celular e responsáveis pela adesão das bactérias a diferentes superfícies, e os chamados *pili* sexuais, que permitem a troca de material genético durante a conjugação bacteriana.

Existem ainda algumas bactérias capazes de formar esporos, ou seja, estruturas espessas que revestem uma cópia do cromossomo e parte do citoplasma circundante quando o microrganismo se encontra em situações adversas. Assim, a formação de esporos por algumas espécies está envolvida em processos de sobrevivência bacteriana.

1.3. Crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano pode ser afetado por inúmeros fatores, como:

Nutrientes: são a fonte de energia necessária para manutenção da célula bacteriana, assim como fonte de elementos vitais como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, entre outros.

Temperatura: cada bactéria apresenta uma temperatura ótima de crescimento, e esta pode variar conforme o microrganismo. No entanto, a maioria tem um crescimento melhor em 37 °C (mesófilas). Também podem ser consideradas termófilas (“amigas do calor”) ou psicrófilas (“amigas do frio”).

pH: as bactérias podem ser acidófilas, que crescem em pH baixo, entre 0,1 e 5,4; neutrófilas, que crescem em faixas de pH entre 5,5 e 8,5; e alcalófilas, que crescem em pH mais elevado, entre 8,5 e 11,5. Essa preferência varia de acordo com a espécie.

Oxigênio: classificam-se as bactérias em aeróbias estritas, que necessitam de O₂ para crescer; anaeróbias estritas, que crescem apenas na ausência de O₂; microaerofílicas, que necessitam de O₂, mas em pressão inferior à atmosférica; e anaeróbias facultativas, para as quais a presença ou ausência de O₂ é indiferente.

Além disso, a umidade, a pressão osmótica e a pressão atmosférica também são fatores que influenciam no desenvolvimento desses microrganismos.

O conjunto desses fatores pode garantir um crescimento exponencial das bactérias, de forma que suas colônias se multipliquem. Com isso, a curva de crescimento desses microrganismos baseia-se em quatro fases:

- 1) **Fase de latência ou lag phase:** não há divisão celular.
- 2) **Fase de crescimento exponencial ou log phase:** ocorre divisão celular, ou seja, momento em que o número de células bacterianas aumenta.
- 3) **Fase estacionária ou stationary phase:** equilíbrio no número de colônias e redução dos nutrientes que as mantêm vivas.
- 4) **Fase de declínio ou death phase:** esgotamento dos nutrientes e morte das células.

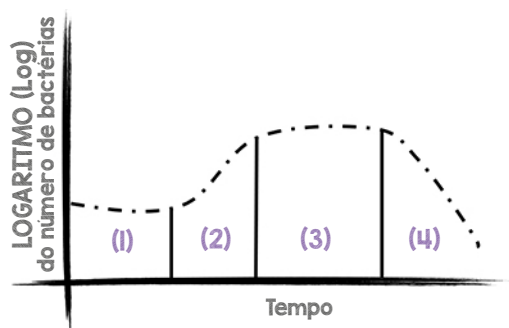


Figura 4. Curva de crescimento de bactérias

1.4. Meios de cultivo para bactérias

Práticas em microbiologia exigem a preparação de meios de cultivo para o crescimento bacteriano. Esse meio deve conter todas as fontes de energia para a construção e manutenção da estrutura e organização dos microrganismos, suprimindo suas necessidades mínimas e viabilizando seu crescimento.

Esses meios podem ser classificados, de acordo com seu estado físico, em líquidos (caldos) ou sólidos. Ainda podem ter origem natural, quando a matéria-prima para preparação do meio é natural e, assim, não se sabe sua composição exata, ou artificial/sintética, quando a composição é conhecida e definida. Podem ser genericamente classificados em:

Meio complexo: quando a exata constituição não é conhecida.

Meio quimicamente definido: quando todos os constituintes e suas respectivas quantidades são conhecidos.

Meio enriquecido: quando apresenta uma grande quantidade de determinados nutrientes, promovendo o crescimento de microrganismos fastidiosos.

Meio seletivo: quando apresenta substâncias inibidoras de crescimento de certos microrganismos, mas sem inibir o crescimento dos microrganismos de interesse.

Meio diferencial: quando permite que o microrganismo desenvolva estruturas ou reações que poderão ser utilizadas para diferenciação de gênero ou até mesmo de espécie.

A preparação do meio de cultura deverá seguir uma padronização, uma vez que esta etapa poderá garantir resultados confiáveis. Os meios de cultivo comerciais geralmente trazem em sua embalagem o correto modo de preparo para um volume de 1 litro. Ainda assim, apresentamos a seguir um cálculo básico para auxiliar nessa etapa.

Como calcular a quantidade de ágar a ser utilizada?

Suponha que você precise de 15 placas de ágar Mueller Hinton (MH), e que cada placa necessite de 25 mL do meio. Logo: $15 \times 25 = 375$ mL. Ou seja, você precisará preparar 375 mL desse meio. Assim:

1º A bula do produto indica que são necessários 34 g de ágar para preparar 1 L desse meio de cultivo. A partir disso, aplica-se a regra de três.

$$\begin{array}{rcl} 34 \text{ g de ágar MH} & \text{-----} & 1.000 \text{ mL} \\ x & \text{-----} & 375 \text{ mL} \\ x = 12,75 \text{ g de ágar MH} \end{array}$$

2º Dilua essa quantidade em 375 mL de água destilada/deionizada.

3º Aqueça em micro-ondas até que o meio fique límpido.

4º Armazene em frascos tipo Shott conforme recomendação do fabricante.

Nota: alguns meios exigem o ajuste de pH, a adição de algum suplemento, ser aquecido no micro-ondas para completa dissolução ou ainda ser autoclavado. Sempre respeite as instruções indicadas na embalagem.

Existem vários tipos de meios de cultura. De modo geral, os principais utilizados em laboratório para o cultivo de bactérias são:

Caldo brain heart infusion (BHI): em português, infusão cérebro coração. Meio de cultivo nutritivo não específico cuja finalidade é promover o crescimento de microrganismos. Sua composição é dada pelos nutrientes da infusão cérebro-coração e peptona, além da dextrose. Tanto a peptona quanto a infusão fornecem nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas. Já a dextrose é um carboidrato essencial para a fermentação dos microrganismos.

Modo de preparo do caldo BHI

1º Calcule e pese a quantidade de meio de cultivo necessária (conforme recomendação do fabricante).

2º Meça, em uma proveta, o volume de água destilada/deionizada necessário.

3º Em um Erlenmeyer, dissolva a quantidade pesada no volume de água medido (sempre utilize um recipiente de volume maior do que volume a ser preparado).

4° Aqueça em micro-ondas e agite até ficar completamente dissolvido.

Nota: quando o volume a ser preparado for superior a 400 mL, sugere-se dividir em mais de um Erlenmeyer.

5° Aliquote 5 mL do caldo BHI em tubos com tampa.

Nota: a distribuição sempre deverá ser realizada dentro de capela de fluxo laminar e sob demais condições para evitar contaminação.

6° Autoclave os tubos contendo o caldo por 15 minutos a 121 °C;

7° Conserve em temperatura de ± 4 °C, por até 6 meses.

Após seguir esse protocolo, a interpretação do caldo poderá ser feita da seguinte maneira:

Interpretação

Cor original: amarelo límpido.

Crescimento (positivo): presença de turvação.

Não crescimento (negativo): ausência de turvação.

Ágar Muller Hinton (MH): meio não seletivo, utilizado para avaliação das resistências aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão. Possui níveis adequados de cálcio e magnésio, e baixos níveis de timina e timidina, proporcionando, assim, resultados mais precisos de resistência ou sensibilidade. Além disso, também é muito utilizado em laboratórios de microbiologia para cultivo bacteriano e como meio base para o preparo de ágar sangue.

Modo de preparo do Ágar MH

1° Calcule e pese a quantidade de meio de cultivo necessária (conforme recomendação do fabricante).

2° Meça, em uma proveta, o volume de água destilada/deionizada necessário.

3° Em um Erlenmeyer, dissolva a quantidade pesada no volume de água medido (sempre utilize um recipiente de volume maior que o volume a ser preparado).

4° Aqueça em micro-ondas e agite até ficar completamente dissolvido.

Nota: quando o volume a ser preparado for superior a 400 mL, sugere-se dividir em mais de um Erlenmeyer.

5° Autoclave o Erlenmeyer contendo o meio por 15 minutos a 121 °C.

6° Homogeneíze delicadamente e, antes de o meio se solidificar (± 45 °C), distribua de 15 a 20 mL em cada placa de Petri de 90 x 15 mm.

Nota: a distribuição sempre deverá ser realizada dentro da capela de fluxo laminar e sob demais condições para evitar contaminação.

7° Deixe em temperatura ambiente até solidificar e conserve em temperatura de 4 a 8 °C, por até 3 meses.

Após seguir esse protocolo, a interpretação do caldo poderá ser feita da seguinte maneira:

Interpretação

Cor original: amarelo palha.

Teste de disco-difusão: utilizando os manuais (do Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCast ou European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EuCast), consegue-se escolher os antibióticos de acordo com a bactéria, verificar o tamanho do halo de inibição e classificar se a bactéria é sensível, intermediária ou resistente ao antibiótico testado.

Ágar sangue: meio não seletivo que permite o crescimento da maioria dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Muito empregado também na verificação da atividade hemolítica dos *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Em geral, é composto por ágar Columbia ou ágar MH com a adição de sangue de carneiro.

Modo de preparo do Ágar sangue

1° Calcule e pese a quantidade necessária de ágar MH (conforme recomendação do fabricante).

2° Meça, em uma proveta, o volume de água destilada/deionizada necessário.

3° Em um Erlenmeyer, dissolva a quantidade pesada no volume de água medido (sempre utilize um recipiente de volume maior que o volume a ser preparado).

4° Autoclave o Erlenmeyer contendo o meio por 15 minutos a 121 °C.

5° Deixe resfriar até ± 45 °C.

6° Adicione o sangue de carneiro, previamente calculado: para cada litro do meio base (ágar MH), adicione 50 mL de sangue de carneiro.

7º Homogeneíze delicadamente e distribua de 15 a 20 mL em cada placa de Petri de 90 x 15 mm.

Nota: a distribuição sempre deverá ser realizada dentro de capela de fluxo laminar e sob demais condições para evitar contaminação.

8º Deixe em temperatura ambiente até solidificar e conserve em temperatura de 4 a 8 °C, por até 4 meses.

Após seguir esse protocolo, a interpretação do meio poderá ser feita da seguinte maneira:

Interpretação

Cor original: vermelho.

Alfahemólise: presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos).

Betahemólise: presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos).

Gamahemólise (sem hemólise): ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

Ágar MacConkey: meio seletivo que possibilita somente crescimento de bactérias Gram-negativas. Nesse meio é possível verificar se as bactérias Gram-negativas são ou não fermentadoras de lactose. O ágar MacConkey contém ácido biliar (inibe o crescimento

da maioria das bactérias Gram-positivas, exceto algumas espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*), cristal violeta (inibe o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas), vermelho neutro (corante das bactérias fermentadoras de lactose), lactose e peptídeo.

Modo de preparo do Ágar MacConkey

1º Calcule e pese a quantidade de meio de cultivo necessária (conforme recomendação do fabricante).

2º Meça, em uma proveta, o volume de água destilada/deionizada necessário.

3º Em um Erlenmeyer, dissolva a quantidade pesada no volume de água medido (sempre utilize um recipiente de volume maior que o volume a ser preparado).

4º Aqueça em micro-ondas e agite até ficar completamente dissolvido.

5º Autoclave o Erlenmeyer contendo o meio por 15 minutos a 121 °C.

6º Homogeneíze delicadamente e, antes de o meio se solidificar (± 45 °C), distribua de 20 a 25 mL em cada placa de Petri de 90 x 15 mm.

Nota: a distribuição sempre deverá ser realizada dentro da capela de fluxo laminar e sob demais condições para evitar contaminação.

7° Deixe em temperatura ambiente até solidificar e conserve em temperatura de 4 a 8 °C, por até 3 meses.

Após seguir esse protocolo, a interpretação do meio poderá ser feita da seguinte maneira:

Interpretação

Cor original: rosa avermelhado.

Fermentadoras de lactose: colônias rosas. Na presença dessas bactérias, ocorre redução do pH do meio, e a cor rosa das colônias se sobressai em relação à coloração original do ágar.

Não fermentadoras de lactose: colônias incolores/amareladas. Utilizam a peptona do meio, produzindo amônia, que aumenta o pH do meio e resulta em um indicador de cor amarela.

Outros meios de cultivo bacteriano: além dos meios citados, existem outros que são frequentemente empregados na prática laboratorial, como:

Choc (ágar chocolate): meio nutritivo que permite o crescimento da maioria das bactérias.

TM (Thayer-Martin): meio seletivo para o isolamento de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, inibindo outras bactérias.

BEM (eosin methylene blue): meio seletivo de bacilos Gram-negativos, que permite diferenciar as bactérias em lactose

positiva e negativa, além de inibir bactérias Gram-positivas.

SS (*Salmonella Shigella*): meio seletivo para *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., além de detectar a presença de H₂S.

Tetra (caldo tetrationato): meio de enriquecimento para *Salmonella* spp.

Cromo (cromoágar): meio cromogênico disponível para cultura de fezes, urina, *Candida* spp. e pesquisa de resistência a alguns antibióticos.

CNA (*colistin nalidixic agar*): meio seletivo para *Enterococcus* e *Streptococcus*; inibe bactérias Gram-negativas e o ácido nalidíxico (*Proteus* spp.).

Thio (caldo tioglicolato): meio de enriquecimento que favorece o desenvolvimento da maioria das bactérias.

Se liga!

A prática em microbiologia exige uso dos EPIs básicos, bem como a manipulação dos meios de cultivos e dos próprios microrganismos próximos a uma chama (bico de Bunsen) e, se necessário, dentro de uma capela de fluxo laminar. Adotar essas medidas de segurança evitam contaminações, seja da pessoa que está trabalhando e do ambiente, seja do próprio experimento.

1.5. Técnicas em bacteriologia

Existem diversas técnicas e protocolos que permitem a observação, caracterização e identificação de microrganismos. Dependendo do objetivo da pesquisa, essas técnicas podem ser refinadas e mais complexas. A seguir serão apresentadas algumas técnicas mais básicas e comuns na área da bacteriologia.

1.5.1. Cultivo bacteriano por esgotamento

Serve para a obtenção de colônias puras de bactérias que podem ser isoladas de uma placa ou de um tubo contendo meio líquido enriquecido. Elas serão inoculadas em outro meio nutriente sólido, propício para o microrganismo a ser isolado. É importante sempre verificar, antes de semear no novo meio, se não há agentes contaminantes.

Passo a passo da Técnica de Esgotamento

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado, realize todas as etapas próximo à chama).

3º Flambe a alça de platina.

Nota: espere 30 segundos até esfriar a alça de platina, caso contrário as bactérias poderão morrer antes de semeá-las (recomenda-se esfriar a alça em um cantinho do ágar ou do caldo, para então realizar uma alçada).

4º Agite delicadamente o tubo, retire a tampa e flambe a extremidade superior do tubo na chama.

5º Introduza a alça de platina no tubo contendo o meio de cultura e bactérias, observando se há a uma “gota” na alça de platina. Caso essa técnica seja realizada a partir do cultivo de bactérias em meio sólido, retire uma alçada da colônia de interesse.

6º Flambe novamente a extremidade superior do tubo e feche.

7º Com a alça platina, estrie a bactéria em uma nova placa de Petri, pelo método de esgotamento.

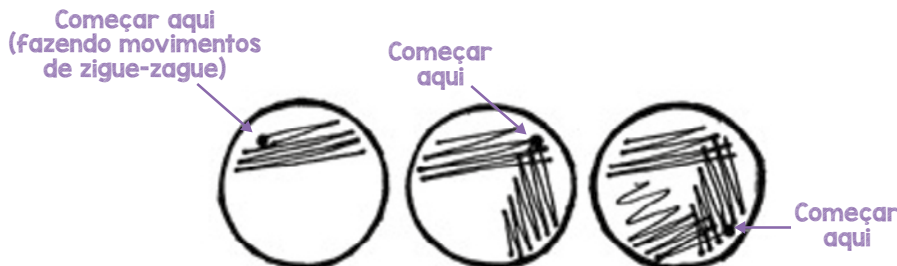


Figura 5. Movimentos para realizar uma semeadura por esgotamento

8° Flambe a alça de platina.

9° Repita os passos 3 a 7, para todas as amostras.

10° Desligue o bico de Bunsen e desinfete a bancada com álcool 70%.

11° Após realizar a semeadura pela técnica de esgotamento, as placas devem ser incubadas em uma estufa a 37 °C (ou conforme temperatura exigida pelo microrganismo), por um período de 24 a 48 horas. Ou ainda, devem ser incubadas conforme demais exigências do microrganismo, por exemplo: para bactérias anaeróbias, as placas semeadas devem ser incubadas dentro de uma jarra hermética com dispositivo que irá tirar totalmente o oxigênio. Para as bactérias fastidiosas que necessitam de 5% de dióxido de carbono (CO₂), as placas semeadas devem ser incubadas dentro de uma jarra hermética com vela acesa. Assim que fechar a jarra, a vela irá consumir todo o O₂ do meio, liberando dióxido de carbono, que ajuda no crescimento de diversas bactérias.

1.5.2. Coloração de Gram

Técnica criada pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram em 1884. Esse método consiste em diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando um simples processo de coloração.

Passo a passo para a coloração de Gram

Preparação da lâmina

1° Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2° Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando a preparação da lâmina próximo à chama).

3° Esterilize a lâmina passando-a levemente no fogo.

4° Com a alça de platina esterilizada pelo calor, colete uma alçada da cultura bacteriana de interesse e faça um esfregaço sobre a lâmina, com movimentos circulares.

5° Fixe a amostra, passando levemente a lâmina sobre o fogo (faça isso com o auxílio de um pegador).

Coloração de Gram

1° Cristal violeta: aplique o corante cristal violeta até cobrir a superfície da lâmina e aguarde 60 segundos. Lave a lâmina com água destilada/deionizada. Função: primeiro corante, irá se fixar na parede celular bacteriana, deixando todas as células com uma cor azul/arroxeadas.

2° Lugol: aplique o lugol em toda a lâmina e aguarde 60 segundos. Lave com água destilada/deionizada. Função: o lugol faz com que o cristal violeta se fixe de forma permanente

na parede celular, garantindo que as bactérias Gram-positivas não descorem nas próximas etapas (permanecendo em coloração azul/roxa).

3º Álcool/cetona: lave com a solução álcool/cetona por cerca de 15 segundos. Lave com água destilada/deionizada. Função: solução utilizada para fazer a descoloração de bactérias (geralmente, Gram-negativas) antes levemente coradas pelo cristal violeta. Etapa crítica, pois se deixar a solução álcool/cetona muito tempo

em contato com a amostra, poderá se descolorir até mesmo as Gram-positivas, gerando resultados dúbios e/ou falsos.

4º Fucsina: aplique a fucsina e aguarde 30 segundos. Lave com água destilada/deionizada. Função: este é um contra corante que irá corar as bactérias Gram-negativas (descoloridas pela solução álcool/cetona), dando a elas uma coloração avermelhada/rosa.

Microscopia: analise a lâmina em microscópio óptico.

Preparação da lâmina



Etapas da Coloração de Gram

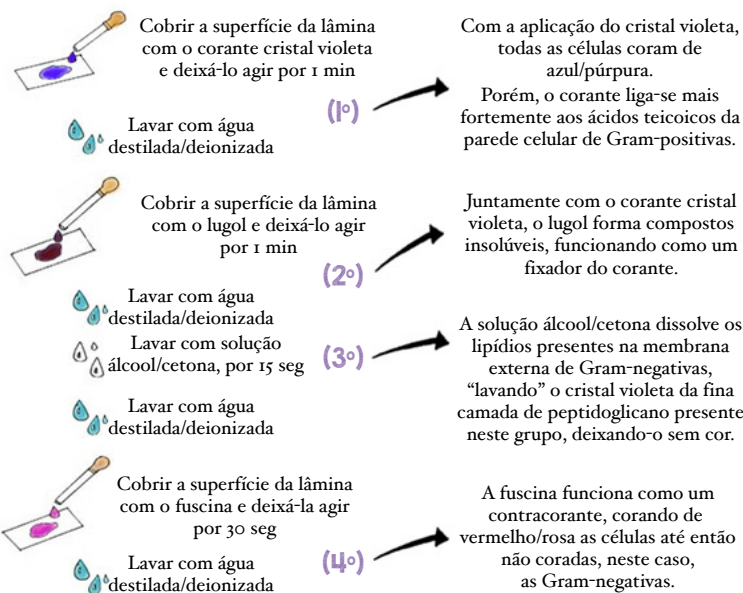


Figura 6. Passo a passo para coloração de Gram

1.5.3. Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Do ponto de vista microbiológico, principalmente clínico, é muito importante realizar a caracterização do isolado microbiano, classificando-o como sensível ou resistente. Será considerado resistente a um antimicrobiano quando a concentração inibitória mínima for mais elevada que a concentração habitual administrada para combater a espécie.

Várias metodologias podem ser aplicadas a fim de determinar a suscetibilidade de microrganismos diante de agentes antimicrobianos. A sensibilidade bacteriana aos agentes antimicrobianos nem sempre é prevista, por isso os testes de susceptibilidade antimicrobiana são de suma importância na rotina laboratorial. Apesar de ser um tanto laboriosa, a partir deles consegue-se definir o perfil de resistência da bactéria e, assim, auxiliar na escolha do tratamento adequado da infecção. As técnicas de susceptibilidade mais comuns são:

Técnica de Kirby-Bauer ou disco-difusão: essa técnica, apesar de antiga, é simples e garante resultados confiáveis e satisfatórios no que diz respeito à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* diante de agentes antimicrobianos. Trata-se de metodologia qualitativa, baseada no halo de inibição formado no entorno de pequenos discos de papel filtro, embebidos com algum antimicrobiano, colocados sobre uma placa de ágar MH, previamente semeada com a bactéria de interesse.

Passo a passo para técnica de Kirby-Bauer

Preparação das Placas: prepare, previamente, placas com ágar MH, mantendo espessura média de 4 mm (não podendo ser inferior a 3 mm ou superior a 5 mm).

Nota: realize o preparo do ágar e das placas de acordo com as boas práticas, evitando contaminações.

Preparação do inóculo

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

3º Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada pelo calor, suspenda, em solução salina 0,85% estéril, de 3 a 4 colônias bacterianas isoladas, de modo a se obter uma densidade semelhante à solução padrão 0,5 da escala de McFarland ($= 1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$).

Nota 1: caso a densidade seja maior que o padrão, deve-se adicionar mais solução salina. Caso fique menor que o padrão, deve-se suspender mais uma leve alçada das colônias.

Nota 2: preferencialmente, utilize o inóculo em até 15 minutos após o preparo.

Inoculação nas placas: introduza um *swab* estéril na suspensão bacteriana preparada, comprimindo-o na parede do tubo para retirar o excesso do inóculo, e semeie na placa contendo o ágar MH de forma uniforme em três sentidos distintos. Aguarde a superfície do ágar secar (máximo de 15 min.).

Aplicação dos discos à placa inoculada: com auxílio de uma pinça, deposite os discos de antibióticos sobre a superfície do ágar, mantendo uma distância entre eles.

Nota 1: flambe a pinça sempre antes e após pegar os discos.

Nota 2: adicione até 12 discos em uma placa de 150 mm ou 5 discos em uma placa de 90 mm, distribuindo-os uniformemente e de modo que entrem em contato completamente com o ágar inoculado.

Nota 3: não desloque os discos após colocá-los na placa, uma vez que a difusão do antimicrobiano é instantânea.

Nota 4: os antimicrobianos devem ser previamente definidos de acordo com a bactéria estudada, seguindo os manuais CLSI, BrCast ou EuCast.

Incubação: incube as placas invertidas, até 15 minutos após a aplicação dos discos, em estufa com temperatura entre 35 °C e 37 °C por 18 a 24 horas (ou conforme exigências do microrganismo estudado).

Nota: as placas devem ser incubadas invertidas, evitando que a água de condensação da superfície do ágar prejudique o crescimento das colônias.

Leitura e interpretação da placa: primeiramente, verifique se a placa foi corretamente semeada, de modo que os halos se encontrem uniformes e com crescimento confluinte. Com a placa invertida e com o auxílio de uma régua ou paquímetro, meça o diâmetro dos halos de cada disco. A partir do valor medido, consulte a tabela atual do manual escolhido (CLSI, BrCast ou EuCast) para determinar se a bactéria de interesse é sensível, intermediária ou resistente ao antibiótico testado.

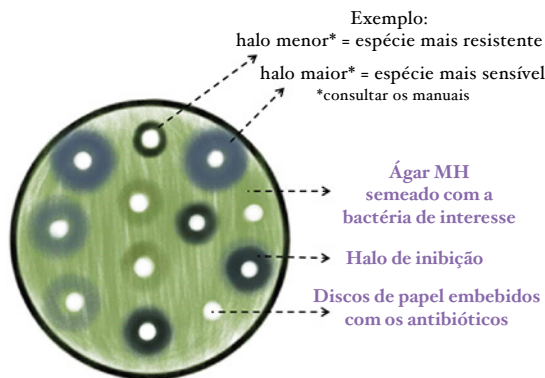


Figura 7. Técnica de Kirby-Bauer ou disco-difusão

Técnica de macrodiluição e microdiluição: técnicas quantitativas com objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM)

capaz de inibir por completo o crescimento microbiano. A técnica de macrodiluição é realizada por meio de diluições seriadas de agentes antimicrobianos em tubos contendo um meio de cultivo líquido. Já a técnica de microdiluição, que apresenta o mesmo princípio da de macrodiluição, utiliza microplacas estéreis, necessitando de menores quantidades de reagentes e inóculos. Apesar da desvantagem relacionada ao custo elevado das microplacas, a microdiluição é uma técnica bastante utilizada na rotina laboratorial, uma vez que necessita de pouco espaço para o armazenamento e menores volumes de reagentes, além de possibilitar a preparação de muitos ensaios em uma única placa. A técnica da microdiluição é muito empregada na avaliação CIM de substâncias sintéticas, vegetais ou naturais.

Passo a passo para a técnica de microdiluição em caldo

Pré cultivo:

- 1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.
- 2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).
- 3º Cultive, através da técnica de esgotamento e em ágar MH (ou outro meio mais apropriado), os isolados bacterianos de interesse.
- 4º Incube a 35 °C por 24 horas.

Preparação do inóculo: após 24 horas de crescimento em ágar, com o auxílio de uma alça de platina esterilizada pelo calor, suspenda, em solução salina 0,85% estéril, de 3 a 4 colônias bacterianas isoladas, de modo a obter uma densidade semelhante à solução padrão 0,5 da escala de McFarland (= 1 a 2×10^8 UFC/mL). Pode-se também ajustar a densidade do inóculo por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm, sendo que a absorbância deverá variar de 0,08 a 0,10.

Nota 1: ligue o espectrofotômetro cerca de 20 minutos antes de realizar a leitura.

Nota 2: as cubetas de espectrofotômetro não são descartáveis nem estéreis. Dessa forma, deve-se descartar o volume de inóculo que foi colocado na cubeta, lavando-a com água destilada/deionizada antes de medir o próximo inóculo.

Nota 3: caso a absorbância fique maior que 0,10, adicione mais solução salina. Caso fique menor que 0,8, suspenda mais uma leve alçada das colônias.

Nota 4: preferencialmente, utilize o inóculo em até 15 minutos após o preparo.

A partir do inóculo ajustado, faça uma diluição 1:100 (= 1 a 2×10^6 UFC/mL) em solução salina estéril, adicionando 100 µL da suspensão bacteriana inicial em 9,9 mL de solução salina 0,85%.

Nota: esse volume de inóculo ajustado (10 mL) é o suficiente para se trabalhar com até quatro substâncias em duplicata, pois cada poço (menos o controle negativo) recebe 100 µL de inóculo. Logo, $100 \text{ (volume do inóculo por poço)} \times 11 \text{ (n}^\circ \text{ de poços que recebe inóculo, por substância)} \times 2 \text{ (duplicata)} = 2.200 \text{ µL de inóculo por substância}$. Se você quiser aproveitar e preparar o mesmo inóculo para testar mais antimicrobianos, basta ainda multiplicar pelo número de substâncias que deseja testar.

Preparação das substâncias antimicrobianas a serem testadas: a partir da solução estoque, prepare uma solução de trabalho 4x maior que o valor necessário no primeiro poço. Isso é necessário pois, com a adição do meio de cultivo, esse valor cai pela metade, caindo mais uma vez com a adição do inóculo. Por exemplo: você precisa que seu teste inicie a uma concentração de 128 µg/mL. Então você precisa preparar uma solução de trabalho de 512 µg/mL pois, ao adicionar o caldo MH, esse valor passará para 256 µg/mL, passando ainda para 128 µg/mL ao adicionar o inóculo.

Nota 1: as soluções padrões de agentes antimicrobianos devem ser preparadas em concentrações de, pelo menos, 1.000 µg/mL (exemplo: 1.280 µg/mL), ou 10x a concentração mais alta a ser testada – das duas a maior.

Nota 2: leve em consideração as características de sua substância antimicrobiana a ser testada, uma vez que algumas drogas e outras substâncias não se dissolvem em água.

Preparação do caldo MH: esse será o meio de cultivo utilizado na placa. Para isso, deve-se dissolver 22 g do meio de cultivo comercial desidratado em 1 L de água destilada. Autoclave a 121 °C por 10 minutos. Confira o pH adequado. Armazene em geladeira e protegido da luz até sua utilização.

Preparação da placa: disposição do meio de cultivo, das substâncias a serem testadas e do inóculo.

- 1º Com o auxílio de uma micropipeta, adicione 100 µL de meio de cultivo da 1ª à 10ª coluna das linhas A e B (duplicada).
- 2º Adicione 100 µL de meio de cultivo na 11ª coluna das linhas A e B (controle positivo).
- 3º Adicione 200 µL na 12ª coluna das linhas A e B (controle negativo).
- 4º Adicione 100 µL da substância antimicrobiana teste (em concentração 4x maior do que a necessária) na 1ª coluna das linhas A e B (nessa hora a concentração cairá pela metade).
- 5º Realize a microdiluição seriada retirando 100 µL da 1ª coluna e adicionando à 2ª coluna; homogeneíze bem, aspirando e desprezando

o conteúdo dos poços 3x. Retire 100 µL da 2ª coluna e adicione à 3ª coluna; homogeneíze bem, aspirando e desprezando o conteúdo dos poços 3x. Repita o processo sucessivamente até alcançar a 10ª coluna das linhas A e B, desprezando-se o volume de 100 µL restantes na micropipeta. Não microdilua para a 11ª coluna, pois essa é o controle positivo de crescimento. Nessa etapa, os poços correspondentes às colunas de 1 a 10 estarão com 100 µL de meio de cultivo + substância antimicrobiana teste microdiluída, e no poço correspondente à 12ª coluna estarão somente os 200 µL de meio de cultivo, representando o controle negativo de crescimento.

6º Adicione 100 µL de inóculo bacteriano ajustado em todas as colunas, com exceção do controle negativo (12ª coluna). Nessa etapa a concentração cairá mais 1x, permanecendo no valor que foi estipulado.

Nota 1: a cada duas linhas da placa (A/B, C/D, E/F e G/H) é possível testar uma substância em duplicata. Assim, em uma única placa é possível testar até quatro substâncias.

Nota 2: lembre-se de identificar cada dupla de linhas com a substância testada, bem como o microrganismo inoculado.

Incubação: incube a 33-35 °C (não exceda), por 24 horas completas.

Leitura dos resultados: realize a leitura visual da microplaca, considerando a formação ou não de aglomerados/colônias/tufos de células no fundo da cavidade dos poços da microplaca, sendo que os poços correspondentes ao controle negativo (12ª coluna) não deverão apresentar crescimento bacteriano, nem indícios de contaminação do meio, e os poços correspondentes ao controle positivo (11ª coluna) deverão apresentar crescimento bacteriano significativo.

Além de uma leitura visual, pode-se realizar uma observação mais clara adicionando corantes. Nesse caso, pipete em cada poço 30 µL de resazurina 0,02% (100 µg/mL), um indicador de viabilidade celular, incubando por mais 2 horas.

Interpretação: a cor azul indicará ausência de crescimento bacteriano, e a cor rosa indicará a presença de crescimento. Será considerada como CIM a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano de cada isolado utilizado no ensaio, visualizado pela coloração azul.

1.5.4. Técnica para o armazenamento de bactérias

Após o estudo dos microrganismos, é importante ainda armazená-los e preservá-los da forma correta, uma vez que possivelmente demais estudos poderão ser feitos a partir deles. Os microrganismos podem ser armazenados a curto ou a longo prazo:

Armazenamento a curto prazo: tem como objetivo a preservação de cepas isoladas e utilizadas na rotina laboratorial. Colônias em placas ou em culturas líquidas podem permanecer em temperatura de 4 °C por algumas semanas. É válido, ainda, enrolar essas placas em *parafilm* para melhor vedação e menor risco de contaminação.

Armazenamento a longo prazo: existem várias técnicas para armazenar bactérias por um longo período, porém a mais utilizada é o congelamento das colônias em baixas temperaturas, com agentes crioprotetores, permitindo que fiquem estocadas por muitos anos.

Passo a passo para o armazenamento de bactérias a longo prazo

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

3º Em criotubos, adicione 750 µL de caldo BHI, previamente preparado e autoclavado.

4º Com uma alça de platina esterilizada pelo calor, transfira para o criotubo uma alçada bem carregada de colônias bem isoladas e previamente semeadas em meio sólido.

5º Adicione 250 µL de glicerol estéril;

6º Homogeneíze e armazene logo em seguida a -80 °C.

Você sabe o que é a escala de McFarland?

A escala de McFarland é uma escala nefelométrica muito utilizada em práticas de microbiologia com objetivo de padronizar suspensões de microrganismos. Essa escala utiliza um padrão de turvação para determinar a concentração de microrganismos em meio líquido, sendo que a intensidade de turvação e opacidade indicam maior número de partículas nesse meio.

A solução usada como padrão é uma solução aquosa de cloreto de bário (BaCl_2) a 1% peso/volume (p/v) e de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% p/v. A escala de McFarland pode ser adquirida comercialmente e consiste em uma série de 11 tubos, numerados de 0,5 a 10, com diferentes quantidades de BaCl_2 e H_2SO_4 , que geram um gradiente de concentrações de sulfato de bário (Ba SO_4), correspondendo a diferentes contagens bacterianas.

A seguir apresentamos uma tabela representando a equivalência dessas contagens:

Número do tubo da escala McFarland	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Número de microorganismos 10^8 (valor aproximado)	1,5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Como realizar a leitura:

1° Agite vigorosamente os tubos da escala de McFarland, obtendo uma suspensão homogênea.

2° Agite o tubo com a cultura microbiana, obtendo uma suspensão homogênea.

3° Compare a olho nu os tubos da escala com o tubo da cultura microbiana.

Nota: recomenda-se realizar a leitura comparativa dos tubos colocando-os contra um papel com texto impresso, de forma que a maior ou menor claridade das letras observadas através dos tubos indique maior ou menor turvação.

Vale destacar que testes de susceptibilidade geralmente utilizam uma suspensão microbiana corresponde à solução padrão 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), que corresponde a uma absorbância, em 625 nm, de 0,08 a 0,10.

2. FUNGOS

Durante muito tempo, os fungos foram classificados como vegetais. Entretanto, devido a características únicas, em 1969 passaram a compor um reino específico, o reino Fungi. Os organismos pertencentes a esse reino são eucariontes e heterotróficos. Podem ser encontrados associados a algas, constituindo os chamados líquens, ou ainda apresentarem características de fungos e de protozoários, chamados de fungos gelatinosos e classificados por alguns taxonomistas como protistas. Sendo assim, incluem as leveduras (organismos unicelulares), os bolores e os cogumelos (organismos multicelulares), sendo este último não considerado microrganismo e, por isso, não abordado como tal.

Podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, como água, solo, ar, parasitando e/ou decompondo animais e vegetais, apresentando assim importante papel do ponto de vista ecológico e até mesmo econômico, uma vez que implicam em diversos processos industriais, agropecuários e veterinários e na saúde humana.

2.1. Estrutura e morfologia celular

Como citado anteriormente, os fungos são organismos eucariontes, ou seja, apresentam uma membrana delimitando o núcleo. Diferentemente dos vegetais e das algas, não apresentam clorofila nem outros pigmentos fotossintéticos, e sua parede celular é constituída de quitina.

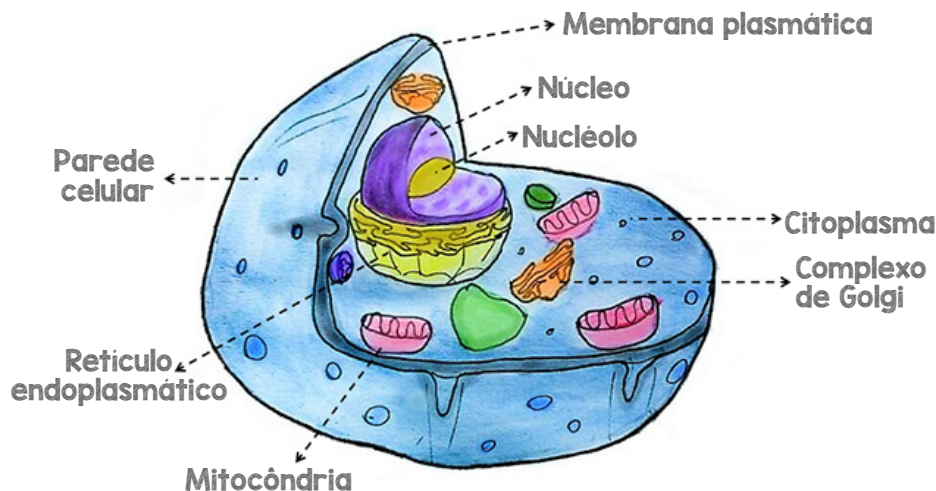


Figura 8. Estrutura celular de organismos eucariontes

Podem desenvolver-se como organismos unicelulares (leveduras) ou multicelulares (fungos filamentosos). Os fungos filamentosos, também chamados de bolor, constituem-se de hifas, que se desenvolvem e formam uma massa filamentosa chamada de micélio. Essas hifas podem ser septadas, ou seja, com septos transversais dividindo internamente a hifa, ou ainda asseptadas (ou cenocíticas), apresentando os núcleos dispersos em uma massa citoplasmática comum. Ainda, as hifas podem ser hialinas ou demáceas, ou seja, com pigmento acastanhado na parede celular.

As hifas aéreas são aquelas que se estendem além da superfície local em que o bolor esteja crescendo. Normalmente é nelas que ocorre a formação dos esporos, e são muitas vezes chamadas de hifas reprodutivas. Já as hifas que se encontram próximas aos substratos são chamadas de hifas vegetativas e desempenham importante papel na sustentação do micélio e de absorção de nutrientes. As colônias leveduriformes, por sua vez, são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas.



Figura 9. Representação de fungos unicelulares e multicelulares

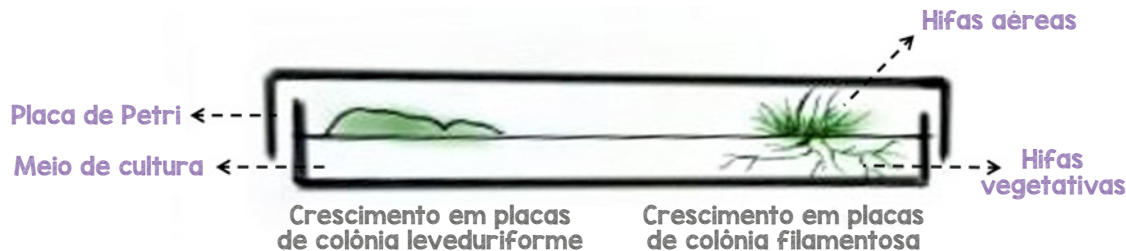


Figura 10. Forma de crescimento de leveduras e fungos filamentosos in vitro

As leveduras reproduzem-se assexuadamente por brotamento, em que novas células, chamadas de blastoconídios, derivam da célula-mãe. Normalmente os blastoconídios desprendem-se da célula-mãe, mas podem permanecer ligados, formando as pseudo-hifas. Já os fungos filamentosos podem reproduzir-se assexuadamente por fragmentação, em que um micélio se fragmenta e origina novos micélios, assim como por de esporulação, em que, pelo prolongamento da hifa, há desenvolvimento de conidióforos e formação de esporos assexuados (conídios), que ao se desprenderem e encontrarem substrato ideal, germinam e formam nova colônia. Os fungos filamentosos também podem reproduzir-se

sexuadamente pela união de dois gametas, formando assim esporos sexuados.

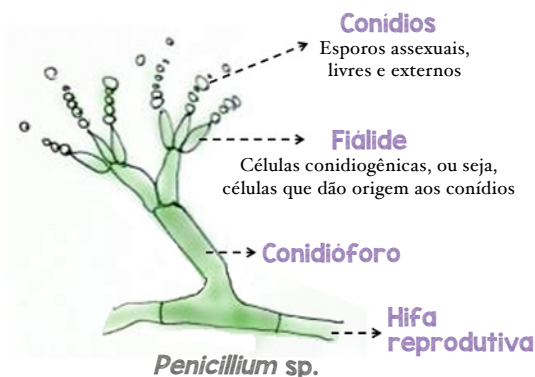


Figura 11. Estrutura básica de um fungo filamentoso

2.2. Crescimento fúngico

De modo geral, as exigências nutricionais dos fungos são semelhantes às das bactérias quimioheterotróficas, ou seja, necessitam de substâncias químicas como fonte de energia, e compostos orgânicos diferentes do CO₂ como fonte de carbono. Além disso, também exigem os demais fatores de crescimento:

Temperatura: podem ser psicrófilos, mesófilos e termófilos; no entanto, a maioria dos fungos é de característica mesófila, apresentando um ótimo de crescimento entre 22 e 30 °C. Leveduras patogênicas podem apresentar um ótimo de crescimento de 30 a 37 °C.

pH: de modo geral os fungos crescem em pH mais ácidos que as bactérias, entre 5 e 6. O pH ótimo para fungos leveduriformes é em torno de 3,5-4,0, enquanto para fungos filamentosos é em torno de 5,5-6,0.

Oxigênio: a maioria dos fungos filamentosos é aeróbia estrita. Outros, como alguns fungos filamentosos ruminais, são anaeróbios estritos. Alguns fungos leveduriformes são anaeróbios facultativos, obtendo energia na ausência de oxigênio por meio de processos fermentativos.

Assim como com as bactérias, a umidade, a pressão osmótica e a pressão atmosférica

também são fatores que influenciam no desenvolvimento e multiplicação desses microrganismos, em cuja cultura o crescimento respeita as mesmas fases de um crescimento bacteriano (*lag phase*, *log phase*, *stationary phase* e *death phase*).

2.3. Meios de cultivo para fungos

Os fungos são organismos cosmopolitas e apresentam grandes diferenças quanto às suas necessidades nutricionais, por isso não existe um meio de cultura universal, aplicável para o crescimento de todos os fungos. Dessa forma, assim como para qualquer outro microrganismo, o meio de cultura ideal é aquele que se assemelha ao máximo possível ao substrato no qual o fungo ocorre na natureza.

De modo geral, os fungos crescem com facilidade na superfície e no interior de vários tipos de meios de cultura, sejam eles sólidos ou líquidos. Meios de cultura líquidos são mais apropriados quando se necessita, por exemplo, quantificar alterações químicas provocadas pelo metabolismo do microrganismo durante seu período de incubação, ou ainda para determinar peso seco micelial, sendo essa uma das formas de avaliar crescimento fúngico. Já os meios sólidos são mais indicados para quando se necessita analisar a morfologia das células ou colônias.

Os meios de cultivo utilizados em micologia também podem ser complexos, quimicamente definidos, enriquecidos, seletivos ou

diferenciais, suprimindo assim as necessidades mínimas para um adequado crescimento *in vitro*. Existem vários tipos de meio de cultura, devendo ser escolhido de acordo com o microrganismo de interesse e objetivos da pesquisa. De modo geral, os principais meios de cultivo utilizados em laboratório para fungos são:

Ágar Sabouraud Dextrose (ASD): meio não seletivo, de baixo pH, ideal para o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos, especialmente dermatófitos. Apresenta peptona como fonte de compostos nitrogenados, e dextrose como fonte de carbono. Torna-se seletivo com a adição de cloranfenicol, impedindo a contaminação por bactérias, assim como com a adição de cicloheximida, evitando o crescimento de fungos contaminantes. O meio ASD pode ser adquirido pronto, com ou sem a adição de antibióticos, devendo ser diluído em laboratório conforme recomendação do fabricante.

1º Calcule e pese a quantidade de meio de cultivo necessária (conforme recomendação do fabricante).

2º Meça, em uma proveta, o volume de água destilada/deionizada necessário.

3º Em um Erlenmeyer, dissolva a quantidade pesada no volume de água medido (sempre utilize um recipiente de volume maior que o volume a ser preparado).

4º Autoclave o Erlenmeyer contendo o meio por 15 minutos a 121 °C.

5º Homogeneíze delicadamente e, antes de o meio se solidificar ($\pm 45^\circ\text{C}$), distribua de 15 a 20 mL em cada placa de Petri de 90 x 15 mm.

6º Deixe em temperatura ambiente até solidificar.

Nota 1: se utilizar tubos, pode-se distribuir 4 mL por tubo antes da esterilização em autoclave, deixando solidificar em temperatura ambiente, com inclinação a um ângulo de 45° .

Nota 2: a distribuição e solidificação deverá ser realizada dentro de capela de fluxo laminar e sob demais condições para evitar contaminação.

7º Armazene de 8 a 10 placas ou tubos em sacos plásticos bem fechados.

8º Conserve as placas e/ou tubos protegidos da luz, a uma temperatura entre 2 e 8 °C, até o momento da utilização.

Nota 1: armazene as placas ou tubos em sacos plásticos bem vedados (de 8 a 10 unidades em cada saco). Ao abrir um pacote, recomenda-se a utilização de todas as suas unidades em até 7 dias.

Nota 2: antes do armazenamento em geladeira, recomenda-se ainda manter esses sacos plásticos em temperatura ambiente durante 7 dias, a fim de garantir a esterilidade do meio. Meios com crescimento fúngico devem ser descartados de acordo com as boas práticas.

Ágar Batata Dextrose (ABD): meio não seletivo, assim como o ASD. A infusão de batata fornece inúmeros nutrientes, estimulando a produção de esporos em fungos filamentosos e a produção de pigmentos em alguns dermatófitos. Muito indicado para o cultivo e contagem de fungos a partir de amostras de alimentos e produtos lácteos. Também pode ser acrescido de antibióticos, adquirido comercialmente pronto com ou sem a adição destes. Deve ser diluído em laboratório conforme recomendação do fabricante, seguindo o modo de preparo e distribuição em placas e/tubos conforme recomendado para o meio ASD.

Meio BHI: em sua forma sólida (ágar) é indicado para a recuperação primária de fungos provenientes de amostras clínicas e de materiais não clínicos. Também pode ser acrescido de antibióticos, adquirido pronto com ou sem a adição destes. Deve ser diluído em laboratório conforme recomendação do fabricante, seguindo o modo de preparo e distribuição em placas e/tubos conforme recomendado para o meio ASD. Também pode ser utilizado em sua forma líquida (caldo), indicada para preparação de inóculos em testes de susceptibilidade.

2.4. Técnicas em micologia

Existem diversas técnicas e protocolos que permitem a observação, caracterização e identificação de microrganismos. Dependendo do objetivo da pesquisa, essas técnicas podem ser refinadas e mais complexas. A seguir serão apresentadas algumas técnicas mais básicas e comuns na área da micologia.

2.4.1. Isolamento de fungos pela técnica de diluição seriada

Em micologia, a técnica da diluição seriada pode ser utilizada, por exemplo, para o isolamento de fungos de substratos líquidos ou de amostras de solo; para realizar a separação de duas ou mais cepas fúngicas que estejam misturadas em um tubo ou placa; para quantificação das colônias em uma amostra; e para determinação da qualidade e quantidade de um inóculo a ser utilizado em processos fermentativos. Para tanto, pode-se realizar os seguintes passos:

Preparo da amostra: dependendo de sua origem, a amostra pode ser preparada de diferentes maneiras, para então seguir com a diluição seriada.

- A partir de substrato sólido: com o auxílio de uma alça de platina, raspe a superfície e colete a amostra que deseja analisar, suspendendo essa alçada em um tubo

contendo 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneíze (= amostra original).

- A partir de substrato líquido: com o auxílio de uma micropipeta transfira 2 mL da amostra líquida que deseja analisar (por exemplo, água, leite etc.) para um tubo contendo 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneíze (= amostra original).
- A partir de amostras de solo: transfira 1 g do solo que deseja analisar para um tubo contendo 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneíze (= amostra original).

1º Prepare mais 9 tubos, contendo cada um 9 mL de solução salina a 0,85%.

2º Adicione ao primeiro dos 9 tubos 1 mL da amostra original (primeira diluição = 10^{-1}).

3º Homogeneíze a suspensão do primeiro tubo e transfira 1 mL para o segundo tubo (segunda diluição = 10^{-2}); homogeneíze a suspensão do segundo tubo e transfira 1 mL para o terceiro tubo (terceira diluição = 10^{-3}). Repita esse procedimento até o último tubo.

Nota 1: a cada transferência, troque a ponteira.

Nota 2: ao final você terá uma diluição seriada, indo de 10^{-1} (primeiro dos 9 tubos) a 10^{-9} (último tubo).

Nota 3: escreva no tubo sua respectiva diluição.

Semeadura das amostras diluídas:

1º Prepare, previamente, 9 placas Petri (uma para cada tubo) com o meio de cultura mais adequado, escrevendo as respectivas diluições.

2º Com o auxílio de uma micropipeta, retire 0,1 mL de cada uma das diluições dos tubos e transfira para sua respectiva placa de Petri.

3º Espalhe a alíquota na superfície do ágar com o auxílio da alça de Drigalski.

Nota: a cada transferência de alíquota do tubo para sua respectiva placa troque a ponteira, assim como a alça de Drigalski (ou esterilize-a, caso seja de vidro).

4º Incube as placas por no mínimo 7 dias a 25 °C.

5º Observe cada placa e, naquela em que observar colônias mais isoladas, colete e proceda com o repique em meio sólido, a fim de obter culturas puras.

Contagem: deve ser realizada de forma manual, com o auxílio de um contador de colônia. Você pode obter a quantificação da diluição original ao multiplicar o número de colônias contadas pelo fator de diluição e pelo volume de alíquota transferido para a placa. Pode-se usar a seguinte fórmula para obter o resultado:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ de colônias} \cdot \frac{1}{\text{fator de diluição}} \cdot \frac{1}{\text{volume de alíquota}}$$

Por exemplo: na diluição 10^{-3} você contou 159 colônias a partir de um inóculo de 0,1 mL. Qual é a concentração original?

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = 159 \cdot \frac{1}{10^{-3}} \cdot \frac{1}{0,1} = 159 \cdot 10^3 \cdot 10 = 159 \cdot 10^4 \text{ ou } 1,59 \cdot 10^6$$

Sua concentração original será de 159×10^4 UFC/mL ou $1,59 \times 10^6$ UFC/mL.

2.4.2. Repique em ágar de culturas leveduriformes

A identificação de leveduras obtidas de amostra biológica deve ser realizada somente quando elas estiverem puras (axênicas), ou seja, sem contaminação bacteriana ou mistura de espécies. Para isso, deve-se realizar um repique, em meio ASD, de cada colônia morfologicamente distinta.

1º Após realizar a técnica de diluição seriada de uma amostra biológica, identifique as colônias morfologicamente distintas.

2º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

3º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

4º Com o auxílio de uma alça ou fio de platina esterilizado pelo calor, colete uma amostra dessa colônia.

5º Semeie em uma nova placa com um esfregão em zigue-zague ou, ainda, em um tubo de ágar inclinado, introduzindo a alça ou fio da platina na base da inclinação do ágar, realizando um esfregão sobre sua superfície até a boca do tubo.

Nota: para o isolamento de culturas leveduriformes, uma mesma placa pode ser utilizada para o repique de mais de uma colônia, dividindo a placa em quatro a seis partes. Esse procedimento pode ser feito marcando a placa pelo lado de fora, com uma caneta, dividindo-a em formato de pizza, com cada divisão representando um repique.

6º Incube as placas ou os tubos obedecendo os requisitos fisiológicos de crescimento do microrganismo, tais como temperatura, tempo de incubação, iluminação etc.

Nota 1: as placas devem ser incubadas invertidas, evitando que a água de condensação da superfície do ágar prejudique o crescimento das colônias.

Nota 2: faça verificações periódicas nos meios para visualizar se há crescimento fúngico, o que pode ocorrer em 24 a 72 horas para fungos leveduriformes, ou ainda possíveis contaminações.

2.4.3. Repique em ágar de culturas filamentosas

No caso de fungos filamentosos, o mais adequado é que o repique seja feito no ponto central de uma camada de ágar distribuída em placa de Petri ou, ainda, em três pontos distintos do ágar. Isso permite analisar, a partir da “colônia gigante”, a velocidade de crescimento, que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias), fatores fundamentais para identificação presumtiva do fungo.

1º Após realizar a técnica de diluição de uma amostra biológica, identifique as colônias morfológicamente distintas.

2º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

3º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

4º Com o auxílio de uma alça ou fio de platina esterilizado pelo calor, colete uma amostra dessa colônia.

5º Semeie no centro de uma nova placa ou, ainda, no centro da superfície do ágar inclinado.

Nota: caso opte por semear em três pontos equidistantes, para cada ponto deve-se realizar nova coleta da colônia, sempre flambando os instrumentos.

6º Incube as placas ou os tubos obedecendo os requisitos fisiológicos de crescimento do microrganismo, tais como temperatura, tempo de incubação, iluminação etc.

Nota 1: as placas devem ser incubadas invertidas, evitando que a água de condensação da superfície do ágar prejudique o crescimento das colônias.

Nota 2: faça verificações periódicas nos meios para visualizar se há crescimento fúngico, o que pode levar até 30 dias para fungos filamentosos, ou ainda possíveis contaminações. Se não houver crescimento fúngico após 30 dias, o meio pode ser descartado.

Vale destacar que ainda existe o grupo de fungos dimórficos, ou seja, aqueles que podem assumir tanto a forma de levedura como a forma de fungo filamentoso. Essa característica depende basicamente da temperatura, crescendo como fungos filamentosos quando expostos a uma temperatura de 25 °C, e como leveduras quando expostos à temperatura de 37 °C. Geralmente são esses fungos os causadores de micoses graves. Dessa forma, principalmente para fins de diagnóstico clínico, é indispensável submeter as culturas às diferentes temperaturas:

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2° Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

3° Com o auxílio de uma alça ou fio de platina esterilizado pelo calor, colete uma quantidade suficiente da cultura de interesse.

4° Semeie em meio de cultivo e incube a uma temperatura de 25 °C.

5° Realize verificações periódicas, observando a macro e a micromorfologia.

Nota: nesse momento, ao se observar a formação de hifas, conclui-se inicialmente ser um fungo filamentoso.

6° Com o auxílio de uma alça ou fio de platina esterilizado pelo calor, colete uma alíquota dessa colônia.

7° Semeie em uma nova placa ou tubo contendo meio de cultivo enriquecido.

8° Incube a 37 °C.

9° Realize verificações periódicas e, após o desenvolvimento das colônias, proceda com a identificação genérica-específica dos fungos por análise morfológica.

Nota: nesse momento, ao se observar a formação de estruturas leveduriformes, conclui-se ser um fungo dimórfico.

2.4.4. Análise morfológica e coloração

A análise morfológica das colônias é essencial para a observação de estruturas e identificação de espécies. Para tanto, pode-se realizar uma análise macromorfológica e micromorfológica.

A análise da macromorfologia é realizada pela observação da colônia fúngica a olho nu, diretamente da placa ou tubo. Nesse caso pode-se observar o tamanho da colônia, as características das bordas (inteira, ondulada, filamentosa, lobulada ou espiral), a textura (algodonosa, aveludada, arenosa, glabra etc.), o relevo (cerebriforme, apiculado, rugoso, liso ou crateriforme) e a cor.

Já a análise da micromorfologia da colônia é realizada no microscópio. Nesse caso, as técnicas de coloração auxiliam a melhor visualizar a morfologia das células leveduriformes, bem como as estruturas vegetativas e reprodutivas de fungos filamentosos, auxiliando na sua identificação.

Coloração de Gram

A coloração de Gram também é aplicável em amostras fúngicas quando estas são de origem clínica, diferenciando as estruturas fúngicas das demais estruturas encontradas em amostras de urina, secreções e fezes. Nesse

caso, todos os fungos apresentarão coloração azul/arroxeadas, como se fossem bactérias Gram-positivas, diferenciando-se facilmente destas por seu maior tamanho e morfologia.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando a preparação da lâmina próximo à chama).

3º Esterilize a lâmina passando-a levemente sobre a chama do bico de Bunsen.

4º Flambe a alça ou o fio de platina e a boca do tubo, ou bordas da placa.

5º Deixe esfriar um pouco.

6º Colete uma alíquota da amostra clínica, ou da colônia isolada, e faça um esfregaço sobre a lâmina com movimentos circulares.

7º Fixe a amostra, passando a lâmina levemente sobre o fogo (faça isso com o auxílio de um pegador).

8º Proceda com a coloração de Gram.

9º Observe em microscópio óptico comum, inicialmente com objetiva de 10x, e em seguida com a de 40x.

Coloração com hidróxido de potássio (KOH) 20%.

Técnica muito utilizada em pesquisa direta de fungos provenientes de material

biológico como muco, restos celulares, pelos e unhas.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando a preparação da lâmina próximo à chama).

3º Esterilize a lâmina passando-a levemente sobre a chama do bico de Bunsen.

4º Aplique no centro da lâmina uma ou duas gotas de KOH 20%.

5º Flambe a alça ou o fio de platina e a boca do tubo, ou bordas da placa.

6º Deixe esfriar um pouco.

7º Colete uma alíquota da amostra clínica, ou da colônia isolada, depositando-a no centro da lâmina, juntamente com as gotas de KOH 20%.

8º Cubra a preparação com uma lamínula.

9º Aguarde de 20 a 30 minutos para que ocorra o processo de clarificação.

Nota: para acelerar esse processo, pode-se também aquecer ligeiramente a lâmina sobre a chama do bico de Bunsen, sem deixar ferver a mistura.

10º Observe em microscópio óptico comum, inicialmente com objetiva de 10x, e em seguida com a de 40x.

Coloração com nanquim

Indicada para a observação de cápsulas. Essa estrutura, constituída de material polissacarídico, aparecerá como um halo claro ao redor da parede celular, contrastado com fundo negro da lâmina.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando a preparação da lâmina próximo à chama).

3º Esterilize a lâmina passando-a levemente sobre a chama do bico de Bunsen.

4º Flambe a alça ou o fio de platina e a boca do tubo, ou bordas da placa.

5º Deixe esfriar um pouco.

6º Colete uma alíquota da amostra clínica, ou da colônia isolada, depositando-a no centro da lâmina.

7º Aplique uma gota de tinta nanquim.

8º Cubra a preparação com lamínula.

9º Observe em microscópio óptico comum, inicialmente com objetiva de 10x, e em seguida com a de 40x.

Coloração com lactofenol de Amann

Indicado para microscopia de microculturas, corando esporos e micélios de fungos hialinos. Pode ser encontrado com a adição de azul de algodão (corante).

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando a preparação da lâmina próximo à chama).

3º Esterilizar a lâmina passando-a levemente sobre a chama do bico de Bunsen.

4º Aplique no centro da lâmina uma gota de lactofenol de Amann.

5º Flambar a alça ou o fio de platina e deixe esfriar um pouco.

6º Colete um pequeno fragmento da cultura filamentosa, ou uma alíquota da cultura leveduriforme, depositando-a sobre a gota do corante.

7º Homogeneíze levemente e cubra com uma lamínula.

8º Observe em microscópio óptico comum, inicialmente com objetiva de 10x, e em seguida com a de 40x.

Além da aplicação de corantes, uma melhor análise microscópica pode ser realizada a partir da técnica de microcultivo, uma vez que esta preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos.

2.4.5. Microcultivo

Técnica utilizada quando se necessita observar os fungos com suas estruturas íntegras, tornando a visualização e identificação mais fáceis.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Acenda o bico de Bunsen (com muito cuidado e realizando todas as etapas próximo à chama, ou em cabine de segurança biológica).

3º Prepare, em uma placa de Petri, meio ASD ou ABD, ou ainda ágar fubá.

4º Após a solidificação, com o auxílio de um bisturi, corte o ágar em fragmentos de 0,5 cm².

5º Em outra placa de Petri, posicione uma lâmina sobre um suporte, que pode ser formado por um bastão de vidro recurvado ou por dois palitos de fósforo.

6º Sobre a lâmina, posicione um dos fragmentos de ágar de 0,5 cm².

7º Semeie o fungo, a partir de repique recente, nos 4 lados do cubo de ágar.

8º Cubra esse fragmento de ágar com uma lamínula, pressionando levemente.

9º Embeba em água destilada estéril um pequeno chumaço de algodão, também estéril, e deposite na placa de Petri, evitando assim a dessecação do meio de cultura durante o crescimento do fungo.

Nota: todo material já deve estar esterilizado; para isso, recomenda-se autoclavar, previamente, a placa de Petri já contendo a lâmina, lamínula, algodão e suporte da lâmina. Lembre-se de realizar todo procedimento em cabine de fluxo laminar ou próximo à chama do bico de Bunsen.

10º Tampe a placa e incube à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, ou até que se observe desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação.

Nota: verifique periodicamente e reponha a água estéril sempre que necessário.

11º Após a observação do crescimento, adicione 1 mL de formol ao algodão e vede a placa com fita adesiva durante 24 a 48 horas. O vapor de formol irá inativar a esporulação e auxiliar na fixação das estruturas microscópicas.

12º Após esse período, adicione 1 gota de corante lactofenol de Amann no centro de uma lâmina.

13º Com o auxílio de uma pinça, cuidadosamente retire a lamínula do microcultivo e a deposite sobre a lâmina contendo o corante.

Nota: realize essa etapa com muito cuidado, uma vez que na lamínula deverão estar aderidas as hifas e esporos do fungo.

14° Despreze o cubo de ágar e, em seu lugar, pingue uma gota de corante.

15° Recubra com lamínula devidamente limpa.

Nota: assim como na lamínula, a lâmina também pode apresentar esporos e hifas aderidos sobre sua superfície.

16° Visualizar ambas as lâminas em microscópio, em aumento de 400x.

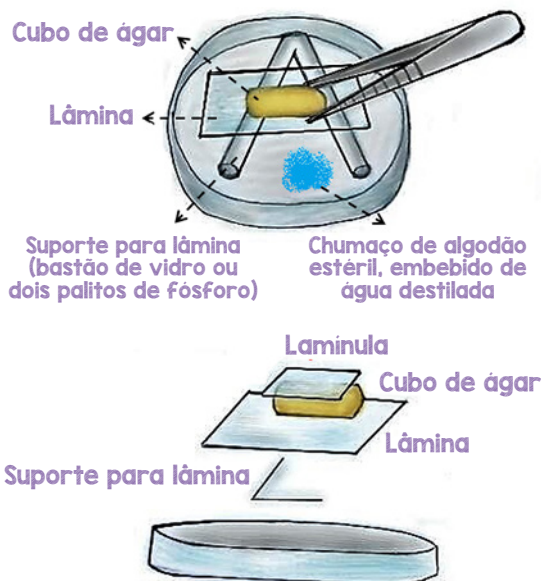


Figura 12. Preparação da placa para um microcultivo

2.4.6. Testes de susceptibilidade

Para avaliação da resistência aos agentes antifúngicos atualmente existentes, assim como para avaliação da susceptibilidade aos novos agentes, podem ser empregados os mesmos métodos aplicados para avaliação da susceptibilidade bacteriana (técnica de disco-difusão ou microdiluição em caldo). Entretanto, deve-se adaptar e utilizar os meios de cultivo recomendados para fungos (como meio RPMI, por exemplo), assim como adaptar demais condições, como tempo de incubação etc.

2.4.7. Técnicas para conservação

Culturas microbianas são muito sensíveis e vulneráveis a contaminação, mutação ou morte. Dessa forma, é imprescindível a aplicação de técnicas de conservação que garantam a viabilidade das culturas. Não existe um método universal de preservação e conservação, uma vez que os grupos taxonômicos, e até mesmo as linhagens de uma mesma espécie, apresentam características e, conseqüentemente, respostas distintas aos diferentes métodos de preservação. Entretanto, independentemente do método utilizado, deve-se garantir que todas as culturas se encontrem em ótimas condições de crescimento, temperatura, umidade, aeração, iluminação e meio de cultivo.

Existem muitos métodos aplicáveis para conservação de fungos, optando-se por aquele mais adequado de acordo com as características do microrganismo. De modo geral, os mais aplicáveis e de fácil acesso são:

Repique

O método de repique em meio sólido (ágar) é o mais tradicional método de preservação de culturas microbianas, realizado pela transferência periódica da cultura para um novo meio de cultivo.

A eficiência desse método pode ser garantida por três condições básicas: adequado meio de cultivo; adequadas condições de estocagem, como temperatura e umidade; e frequência de transferência, realizada a cada duas a quatro semanas ou, na maioria dos casos, a cada dois a quatro meses, ou ainda a cada 12 meses.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Flambe a alça ou o fio de platina e a boca do tubo, ou bordas da placa.

3º Deixe esfriar um pouco.

4º Colete uma amostra do cultivo de interesse.

5º Semeie em uma nova placa com um esfregão em zigue-zague ou, ainda, semeie em um tubo de ágar inclinado, introduzindo a alça ou fio da platina na base da inclinação do ágar, realizando um esfregão sobre a superfície do ágar até a boca do tubo.

Nota: realize todo o procedimento próximo à chama do bico de Bunsen e sob demais condições que evitem contaminações.

6º Estoque as placas ou tubos em adequadas condições ambientais, respeitando os requisitos do microrganismo.

Nota: faça verificações periódicas a fim de identificar possíveis contaminações ou crescimento inadequado, e realize novo repique respeitando o tempo de transferência estipulado.

Preservação sob óleo mineral

Algumas espécies de fungos podem ser preservadas por muitos meses, até mesmo anos, com uma técnica bastante simples, que é a imersão em óleo mineral.

1º Realize a devida desinfecção da bancada e dos demais utensílios utilizando álcool 70%.

2º Realize o repique da cultura de interesse em ágar inclinado.

3º Incube até o crescimento ideal.

4º Autoclave, duas vezes, o óleo mineral por 15 minutos a 121 °C.

5º Coloque assepticamente o óleo mineral estéril sobre a superfície da cultura, cobrindo-a completamente.

Nota 1: isso irá impedir a desidratação e reduzir a atividade metabólica, assim

como a velocidade de crescimento do microrganismo.

Nota 2: realize todo o procedimento próximo à chama do bico de Bunsen e sob demais condições que evitem contaminações.

6º Estoque as culturas com o óleo mineral na posição vertical.

Nota: faça verificações periódicas a fim de identificar possíveis contaminações ou crescimento inadequado, e realize novo repique respeitando o tempo de transferência estipulado.

REFERÊNCIAS

- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos*: módulo IV. Brasília, DF: Anvisa, 2004a. Disponível em: <http://bit.ly/2XJFw5z>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Procedimentos laboratoriais*: da requisição do exame à análise microbiológica: módulo III. Brasília, DF: Anvisa, 2004b. Disponível em: <http://bit.ly/2YLt6CR>. Acesso em: 22 abr. 2018
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resistência microbiana*: mecanismos e impacto clínico. Brasília, DF: Anvisa, 2007. Disponível em: <http://bit.ly/2JA162d>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana*. Brasília, DF: Anvisa, 2008. Disponível em: <http://bit.ly/3opbu3N>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- AULAS práticas: coloração com lactofenol azul algodão. *In*: BIOPEDAGOGIA: viver e educar, educar para o viver. [S. l.: s. n.], 20 fev. 2009. Disponível em: <http://bit.ly/2LORkvZ>. Acesso em: 27 fev. 2019.
- BAGLIANO, r. v. O que é microbiologia? *In*: UOL CURSOS TECNOLOGIA EDUCACIONAL. *Portal educação*. São Paulo: Uol Cursos, 8 nov. 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2XTCJWx>. Acesso em: 8 fev. 2019.
- BAPTISTA, M. G. F. M. *Mecanismos de resistência aos antibióticos*. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARKER, K. Bactérias. *In*: BARKER, K. *Na bancada*: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: artmed, 2002. p. xxxx.
- BASTOS, S. T. G. Meios de cultura. *In*: SCRIBD. *Scribd*. San Francisco, CA: Scribd, 23 dez. 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2YOgEGa>. Acesso em: 27 fev. 2019.
- BD – BECTON, DICKINSON AND COMPANY. BD Mycosel Agar: BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol and Cycloheximide. *In*: BD. *Instruções de utilização*: meios em placas prontos a usar. São Paulo: BD, 2003. p. 1-4.
- BD – BECTON, DICKINSON AND COMPANY. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar. *In*: BD. *Instruções de utilização*: meios em placas prontos a usar. São Paulo: BD, 2013. p. 1-3.
- BD – BECTON, DICKINSON AND COMPANY. *BBL Sabouraud Dextrose Agar*: BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol. São Paulo: BD, 2015.

- BIOMEDo2UFMG. Reino Fungi: revisão. *In*: CRESCENDO em cultura. [S. l.: s. n.], 10 nov. 2013. Disponível em: <http://bit.ly/2Yoat4G>. Acesso em: 27 fev. 2019.
- CLSI – CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico*: norma aprovada. 6. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2003a. Disponível em: <http://bit.ly/3osKW1y>. Acesso em: 5 maio 2018.
- CLSI – CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão*: norma aprovada. 8. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2003b. Disponível em: <http://bit.ly/2XzJhFy>. Acesso em: 22 abr. 2018
- LABORCLIN. *Manual para Antibiograma*: difusão em disco (Kirby & Bauer). Rev. 5. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratórios, 2011. Disponível em: <http://bit.ly/3ooZEXa>. Acesso em: 9 fev. 2019.
- LEVINSON, W. Estruturas de células bacterianas. *In*: LEVINSON, W. *Microbiologia médica e imunologia*. 10. ed. Porto Alegre: artmed, 2010. p. 16-26.
- LEVINSON, W. Fármacos antimicrobianos: resistência. *In*: LEVINSON, W. *Microbiologia médica e imunologia*. 10. ed. Porto Alegre: artmed, 2010. p. 94-101.
- LIMA, G. T. *et al.* Avaliação de meios de cultura para fungos com diferentes tipos de açúcares. *In*: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E EXTENSÃO, 6., 2015, Araguatins. *Anais [...]*. Palmas: Instituto Federal do Tocantins, 2015. p. 1-4. Disponível em: <http://bit.ly/2S7eKxR>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, Lisboa, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. Disponível em: <http://bit.ly/2LU3Wlk>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. *In*: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde* 4. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2009. p. 399- 496. Disponível em: <http://bit.ly/2GbzyQ2>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- MOREIRA, J. L. Coloração de Gram. *In*: MOREIRA, J. L.; CARVALHO, C. B. M; FROTA, C. C. *Visualização bacteriana e colorações*. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015. p. 29-43. Disponível em: <http://bit.ly/2XFz6nU>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Morfologia bacteriana e estrutura e síntese da parede celular. *In*: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006a. p. 11-23.

- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Agentes antibacterianos. *In*: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006b. p. 197-206.
- NEOGEN CORPORATION. *Ágar batata dextrose*: potato dextrose agar (7149). Lansing: Neogen Corporation, 2011.
- NICÉSIO, R. G. Coloração de Gram. *In*: NICÉSIO, R. G.; MARQUES, L.; OLIVEIRA, R. I. S. *Biomedicina Brasil*. [S. l.: s. n.], 2011. Disponível em: <http://bit.ly/2G7eDNW>. Acesso em: 8 fev. 2019.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* Meios de cultura, reagentes, soluções, corantes e testes bioquímicos. *In*: OPLUSTIL, C. P. *et al.* *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. p. 366-474.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* Estocagem de microrganismos. *In*: OPLUSTIL, C. P. *et al.* *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010. p. 475-485.
- PORTAL EDUCAÇÃO. Principais métodos de coloração. *In*: PORTAL Educação. São Paulo: Portal da Educação Tecnologia Educacional, 17 dez. 2012. Disponível em: <http://bit.ly/32vAoII>. Acesso em: 26 fev. 2019.
- POZZOBON, A. (org.). *Biomedicina na prática*: da teoria à bancada. Lajeado: Ed. Univates, 2017
- PROBAC DO BRASIL. *Escala nefelométrica de McFarland Nefelobac*. São Paulo: Probac do Brasil, 2009. Disponível em: <http://bit.ly/2XIYy6S>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- PROLAB. Como preparar um meio de cultura para bactérias e fungos. *In*: PROLAB. *Blog*. São Paulo: Prolab, 23 dez. 2014. Disponível em: <http://bit.ly/2XWBsy6>. Acesso em: 27 fev. 2019.
- RIBEIRO, B. Reino Fungi. *In*: COLA da Web. [S. l.: s. n.], 7 out. 2016. Disponível em: <http://bit.ly/2SbG-FMR>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- REINO Fungi. *In*: VIRTUOUS TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO. *Só biologia*. Porto Alegre: Virtuous, 2008. Disponível em: <http://bit.ly/2XJLdeG>. Acesso em: 28 fev. 2019.
- SBM – SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA. Áreas. *In*: SBM. *SBM*: Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo: SBM, 2004. Disponível em <http://bit.ly/2XEpgnO>. Acesso em: 8 fev. 2019.
- USP – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Medicina Tropical. *Congelamento de bactérias*. São Paulo: USP, 2002. Disponível em: <http://bit.ly/2XJTdwa>. Acesso em: 30 abr. 2018.

- VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. *Microbiologia geral*. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2GbHe4O>. Acesso em: 28 abr. 2018.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, Brasília, DF, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004. Disponível em: <http://bit.ly/2XBt7QZ>. Acesso em: 29 abr. 2018.

CULTIVO DE CÉLULAS DE ORIGEM ANIMAL

5

Autores

Chana de Medeiros da Silva

Mariéle Kliemann

Silvio Augusto Ortolan

Valéria Louzada Leal

Ilustração

Letícia Clauhs



A técnica de cultivo de células surgiu com o propósito de estudar a atividade de células animais fora do organismo, ou seja, em meio controlado, capaz de conservar ao máximo as características e comportamentos fisiológicos, bioquímicos e genéticos dessas células.

Pode-se dizer que, no final do século XIX, mais precisamente por volta do ano de 1885, o embriologista alemão Wilhelm Roux estabeleceu o princípio básico da técnica de cultura celular ao conservar, por vários dias, uma parcela da medula de um embrião de galinha, mantendo-a em solução salina aquecida. Entretanto, a técnica começou a ser mais bem estudada, elaborada e descrita somente em 1907, quando Ross G. Harrison, ao considerar as necessidades básicas de uma célula, mimetizou tais necessidades *in vitro*, conseguindo manter por mais de uma semana a viabilidade de células nervosas de um embrião de sapo. A partir de tais observações, vários cientistas começaram a

se interessar pela técnica. Alexis Carrel, em 1912, ao realizar um experimento com células cardíacas de um embrião de galinha, observou que a renovação constante dos nutrientes contidos nos frascos em que as células eram mantidas permitia melhor conservação e proliferação celular, tornando essas células viáveis por períodos ainda maiores do que aqueles obtidos por Harrison. A partir de então, grandes avanços foram feitos como, por exemplo, em 1952, quando o pesquisador George Gey, ao cultivar as células de um adenocarcinoma cervical agressivo da paciente Henrietta Lacks, estabeleceu a primeira linhagem celular humana com a capacidade de multiplicação indefinida, as chamadas células HeLa, utilizadas até hoje em todo o mundo. Além disso, em 1961 Leonard Hayflick e Paul Moorhead observaram que culturas de células humanas normais exibiam um limite de divisão celular, fato que abriu caminho para novos estudos sobre senescência celular.

A partir desses e de outros estudos envolvendo o cultivo celular, grandes avanços foram e ainda serão possíveis, proporcionando para a medicina achados de suma relevância como o desenvolvimento de vacinas, antibióticos, produção biotecnológica de moléculas recombinantes, diversas aplicações de células-tronco, produção de enxertos para transplantes e produção de potenciais fármacos para o tratamento de doenças degenerativas, entre outros.

Vale destacar que, embora tenha possibilitado grandes avanços, a técnica de cultivo celular apresenta algumas limitações, uma vez que a proliferação celular *in vitro* difere muito daquela *in vivo*. Dessa forma, todas as condições mimetizadas devem considerar as exigências de cada tipo celular, aproximando-se o máximo possível da realidade. De modo geral, o ambiente artificial em que as células são cultivadas consiste em um frasco (garrafas de cultivo) contendo um substrato capaz de fornecer todos nutrientes essenciais para o crescimento e proliferação celular, como aminoácidos, vitaminas, minerais, entre outros. Também é importante incluir fatores de crescimento, como hormônios e gases (O_2 , CO_2), assim como manter as condições físico-químicas do ambiente, como pH, pressão e temperatura. Além dessas condições básicas, devem-se empregar os devidos procedimentos de manipulação, bem como os protocolos mais adequados ao objetivo do estudo, garantindo resultados confiáveis e reprodutíveis.

I. ALGUNS CONCEITOS

A técnica de cultivo celular exige o conhecimento de alguns conceitos, como:

Linhagem celular: população de células originadas de um tecido ou órgão específico.

Cultura primária: obtida a partir de células retiradas diretamente de um tecido humano ou animal que conseguiram aderir à garrafa de cultivo, formando a primeira monocamada de células. Apresentam as características do tecido de origem, porém mantendo-as por um curto período de tempo. Devido à presença das características genótípicas e fenotípicas do tecido de origem, geralmente é a linhagem utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro*.

Cultura continua: obtida a partir de células que ainda detêm as características do tecido original, porém com alto potencial de proliferação, podendo, assim, ser mantidas por um longo período, sem sofrerem mudanças significativas.

Cultura transformada: obtida a partir de células cujas características genéticas foram modificadas, deixando de apresentar semelhanças morfológicas e genéticas com o tecido original. Essas modificações podem ser induzidas diretamente nas células em cultura, com uso de substâncias químicas, vírus ou agentes físicos ou, ainda, obtidas diretamente de tecidos

mutados, como os tecidos tumorais. Essas células são muito utilizadas em estudos de controle de qualidade, citotoxicidade, entre outros.

Células aderentes: células que dependem de um processo de ancoragem a uma superfície para iniciar a proliferação celular. Nesse caso, as garrafas para cultivo devem apresentar carga negativa, que, ao interagir com a matriz extracelular, composta por proteínas de adesão e proteoglicanos, permitirá a adesão das células e seu espalhamento por todo o fundo da garrafa, formando a monocamada celular.

Células não-aderentes: células derivadas de tecidos que não necessitam de processos de ancoragem para proliferação e sobrevivência, podendo ser cultivadas em suspensão no meio. Essa característica encontra-se em células hematopoiéticas ou, ainda, em linhagens transformadas ou células de tecido tumoral.

Passagem: processo de renovação das células, transferindo-as de uma garrafa para outra. O número de passagens diz respeito ao número de vezes que as células foram subcultivadas, e o procedimento deve ser realizado de acordo com a característica de aderência da célula. Algumas células perdem as características do tecido original após determinado número de passagens. Já outras, geralmente as transformadas, são capazes de permanecer viáveis por muitas e muitas passagens, chegando a infinitas passagens.

2. BOAS PRÁTICAS

No laboratório de pesquisa com células, antes de iniciar o trabalho, o pesquisador ou técnico deve estar atento a algumas atividades que visam a prevenção de contaminações.

EPIs e EPCs: utilizar os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) de acordo com a prática realizada, como jaleco limpo ou descartável, touca, máscara e sapatilha descartável (propé), que devem, preferencialmente, ser de uso exclusivo para o ambiente. Lavar as mãos e os antebraços com sabão antisséptico, realizar a assepsia com álcool 70% e, depois, colocar as luvas. Além disso, realizar a manipulação das células de acordo com o Nível de Biossegurança 2, ou seja, realizar todos os procedimentos em cabine de segurança biológica (Equipamento de Proteção Coletiva – EPC).

Limpeza e esterilização: quando bem executada, essa prática previne a contaminação por agentes químicos e/ou biológicos das células e dos materiais utilizados. A limpeza e a esterilização devem ser realizadas em todos os equipamentos, vidrarias e demais materiais, bem como em toda a área destinada à manipulação das células e preparo das soluções (bancadas, cabine). De modo geral, recomenda-se um detergente enzimático, álcool 70%, água sanitária comercial diluída de 5 a 10 vezes, e aplicação de luz UV (antes e depois das atividades).

Higienização e esterilização de vidrarias e demais materiais: utilizar o detergente enzimático de acordo com o grau de sujidade, seguindo orientações do fabricante. Após a lavagem, enxaguar abundantemente com água corrente, finalizando com 3 a 5 enxágues com água destilada. Secar o material em estufa de secagem a 75 °C por aproximadamente 6 horas. Vedar o material limpo e seco com papel kraft e fita crepe. Autoclavar a 121 °C por 20 minutos. Depois, armazenar os materiais estéreis em armários limpos, fechados e exclusivos para o laboratório de cultivo celular.

Higienização do banho-maria: descartar toda a água e lavar a parte interna com um sabão neutro. Enxaguar abundantemente com água corrente. Depois, realizar a devida desinfecção com um papel toalha (ou pano livre de fiapos) embebido, preferencialmente, em desinfetante à base de quaternário de amônia. Seguir a desinfecção com um papel toalha embebido em álcool 70%, tanto na parte interna quanto na externa. Após a completa evaporação do álcool 70% da superfície do equipamento, encher o recipiente interno com água destilada. Recomenda-se trocar a água do banho-maria a cada cinco dias de trabalho.

Higienização da cabine de segurança biológica: com um papel toalha (ou pano livre de fiapos) umedecido em álcool 70%,

realizar movimentos unilaterais (do fundo para frente) sobre toda superfície interna da cabine. Ligar, por 20 minutos, o fluxo de ar e a luz UV. Realizar esse procedimento sempre antes e após as atividades. Vale destacar que, após a devida higienização da cabine de segurança, todos os materiais nela introduzidos devem passar pelo processo de assepsia com álcool a 70%. Nesse caso, recomenda-se deixar um borrifador com álcool 70% próximo à cabine, borrifando a solução sobre a superfície do material sempre antes de introduzi-los no espaço, bem como sobre as próprias mãos.

Higienização da incubadora CO₂: a correta higienização da incubadora CO₂ é muito importante, pois é nela que as células permanecerão incubadas para seu crescimento e proliferação. Microrganismos e/ou produtos químicos podem levar à contaminação do cultivo, afetando diretamente no crescimento das células e, conseqüentemente, colocando em risco o experimento. De modo geral, recomendam-se as seguintes etapas:

1º Transfira todas as culturas para outra incubadora (ou se o procedimento não demorar muito, transfira as culturas para uma caixa plástica devidamente esterilizada com tampa).

2º Desligue a incubadora e o suprimento de gás CO₂.

3º Remova todas as prateleiras e acessórios internos, e esvazie o recipiente de água.

4º Lave a parte interna da incubadora, bem como acessórios já removidos, primeiramente com um sabão neutro.

5º Enxague com água destilada.

6º Com papel toalha (ou pano livre de fiapos) embebido em um desinfetante à base de quaternário de amônio diluído, limpe toda a superfície interna, bem como os acessórios removidos.

7º Finalize a limpeza com um papel toalha umedecido em álcool 70%, removendo, assim, qualquer resquício de desinfetante.

8º Recoloque as prateleiras e demais acessórios internos, ligando novamente a incubadora (somente aquecimento). Mantenha a porta fechada, aguardando cerca de 1 ou 2 minutos.

9º Encha o recipiente de água com água destilada, e então ligue o suprimento de gás CO₂.

10º Aguarde a estabilização dos parâmetros e reintroduza os cultivos.

Nota 1: limpar também a superfície externa da incubadora.

Nota 2: realizar essa higienização periodicamente. Vale lembrar que o processo de higienização também envolve a troca de filtros e/ou tubulações, que deve ser realizada de acordo com o fabricante e por um especialista.

Nota 3: esses procedimentos de higienização servem para demais equipamentos existentes em um laboratório de cultivo celular, sempre respeitando o material do equipamento, evitando danos.

Armazenamento e conservação: os reagentes e as soluções de trabalho devem estar devidamente identificados e armazenados.

Descarte de materiais: realizar a devida descontaminação de todos os materiais utilizados antes do descarte, autoclavando-os a 121 °C, por 30 a 40 minutos.

Esses procedimentos descritos são cuidados básicos, porém essenciais, para que seja minimizado o risco de contaminação das culturas. Havendo contaminação, aconselha-se avaliar todas as etapas de cultivo, evitando, assim, que essa se espalhe para outras culturas e permitindo corrigir as possíveis causas da contaminação.

3. PRINCIPAIS TÉCNICAS EM CULTIVO CELULAR DE ORIGEM ANIMAL

3.1. Descongelamento

O descongelamento é a etapa inicial para o processo de um cultivo celular, e é realizado logo após a retirada do criotubo do ultrafreezer ou do tanque de nitrogênio líquido em que as células se encontravam estocadas, e pode ser realizado de duas formas:

Em banho-maria: deixando o criotubo por alguns minutos em banho-maria a 37 °C.

Em temperatura ambiente: mantendo o criotubo em temperatura ambiente até o completo descongelamento do conteúdo.

Imediatamente após o descongelamento, proceda com as seguintes etapas:

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

3º Com uma micropipeta, cuidadosamente retire as células do criotubo e transfira-as para as garrafas de cultivo, depositando-as em pontos diferentes no interior da garrafa.

4º Adicione delicadamente o meio de cultivo recomendado para as células. Geralmente

esse meio deve ser ainda suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por calor e estéril + 1% de antibióticos (geralmente uma solução de estreptomicina e penicilina – PSA, do inglês *streptomycin penicillin antibiotic*).

Nota 1: em garrafas de cultivo de 25 cm³, adicione 3 mL de meio, ou seja, 2.670 µL do meio escolhido (podendo ser DMEM, RPMI ou outro recomendado) + 300 µL do SFB inativado e estéril + 30 µL de PSA.

Nota 2: em garrafas de cultivo de 75 cm³, adicione 9 mL de meio, ou seja, 8.010 µL do meio escolhido (podendo ser DMEM, RPMI ou outro recomendado) + 900 µL do SFB inativado e estéril + 90 µL de PSA.

Nota 3: muitas vezes o SFB comercial não se encontra inativado. Desta forma, deve-se seguir essa inativação em laboratório, a fim de desnaturar proteínas e demais inibidores do crescimento celular. Para isso, aquecer o SFB até 56 °C por 30 minutos (não ultrapassar temperatura e tempos indicados) e esterilizar por filtração.

5º Identifique a garrafa com informações importantes como: linhagem celular, número de passagens, data de descongelamento e nome do responsável.

6º Armazene as garrafas em incubadora, com temperatura de 37 °C, atmosfera umidificada e 5% de CO₂.

O protocolo de descongelamento é igual para as células aderentes ou não aderentes (suspensas). Entretanto, deve-se tomar o cuidado de passar as células aderentes para garrafas específicas para esse tipo de células, ou seja, garrafas com carga negativa.

3.2. Manutenção dos cultivos

Após 24 horas do descongelamento, é primordial realizar a troca do meio, pois no processo de congelamento se utilizam crioprotetores que descongelados podem tornar-se tóxicos às células, como o dimetil-sulfóxido (DMSO).

Além da manutenção logo após o descongelamento, a troca de meio e demais procedimentos de manutenção devem ser realizados a cada 24 horas durante todo o período de propagação celular, ou seja, durante todo o período em que ainda não se tenha atingido confluência ideal para o subcultivo, porque as células vão consumindo os nutrientes do meio para sua propagação, além de eliminarem metabólitos. A manutenção envolve a observação de sinais que indiquem contaminação ou deterioração, como encolhimento celular, formações irregulares, granações, entre outros, além do acompanhamento do nível de confluência.

Troca do meio utilizado em cultivo de células aderentes

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada).

Nota: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Observe no microscópio invertido o nível de confluência da cultura e se ela apresenta sinais que indicam contaminação ou deterioração. Sendo o caso, recomenda-se descartar o cultivo de acordo com as boas práticas.

6º Na ausência de sinais de contaminação e com nível de confluência inferior a 80%, realize a troca do meio (caso a confluência já se encontre no nível ideal, proceda com o subcultivo).

7º Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur acoplada a um pipetador automático, ou ainda acoplada a uma bomba de vácuo, aspire cuidadosamente todo o conteúdo da garrafa.

8º Com o auxílio de uma micropipeta, adicione delicadamente o meio de cultivo suplementado fresco.

Nota 1: lembre-se que em garrafas de 25 cm³ deve-se adicionar 3 mL de meio suplementado e, em garrafas de 75 cm³, 9 mL de meio suplementado.

Nota 2: recomenda-se adicionar o meio de cultivo suplementado pelas paredes laterais da garrafa, e não diretamente sobre a monocamada de células que está em propagação, prevenindo, assim, possíveis danos à cultura.

9º Incube a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

10º Siga com a observação em microscópio a fim de verificar a confluência e demais parâmetros.

Troca do meio utilizado em cultivo de células não aderentes

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada).

Nota: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Observe em microscópio invertido as condições gerais do cultivo, observando taxa de crescimento, morfologia celular, coloração do meio, entre outros.

6° Na ausência de sinais de contaminação e com nível de confluência inferior a 80%, realize a contagem das células viáveis, em câmara de Neubauer, e a adição de meio de cultivo fresco (caso a confluência já se encontre no nível ideal, proceda com o subcultivo).

Nota: a superpopulação celular proporciona um cultivo inadequado. Dessa forma, primeiramente você deve retirar uma alíquota do cultivo e realizar a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. A partir do conhecimento da concentração celular, proceda com uma diluição com o meio de cultivo suplementado fresco, obtendo uma suspensão celular de concentração conhecida, sendo: para células de crescimento lento (de 36 a 48 horas para duplicação), adicione meio de cultivo fresco a fim de se obter uma concentração final de 1×10^5 células/mL; e para células de crescimento rápido (de 12 a 24 horas para duplicação), adicione meio de cultivo fresco a fim de se obter uma concentração final de 2×10^4 células/mL.

7° Agite vagarosamente com a própria micropipeta, ou ainda em agitador a 60-100 rpm, à temperatura de 37 °C, evitando, assim, a permanência de grumos celulares.

8° Incube a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

9° Seguir com a observação em microscópio a fim de verificar a confluência e demais parâmetros.

3.3. Subcultivos

Células em cultivo são sensíveis ao contato, portanto, a observação do nível de confluência evita que o número de células presentes em uma garrafa seja tão alto que impossibilite o crescimento normal da monocamada, inibindo seu crescimento e levando, conseqüentemente, à morte celular. Assim, após atingirem a confluência ideal, as células devem passar pelo processo de passagem (ou repique), originando um subcultivo.

Em cultura de células aderentes, quando a confluência da monocamada alcança aproximadamente 80-90% da garrafa, a passagem deve ocorrer, primeiramente, com o “descolamento” da monocamada de células da superfície interna da garrafa. Esse descolamento, ou dissociação, pode ser realizado de forma mecânica, com um utensílio estéril, semelhante a um rodo (*rubber policeman*), que retira as células do fundo da garrafa de cultivo, ou de forma enzimática, adicionando-se enzimas (geralmente tripsina, com quantidade e tempo de ação específicos) que fazem a digestão das proteínas de adesão. Após a dissociação, as células podem ser transferidas para uma nova garrafa, devendo esta apresentar carga negativa para a adesão celular. Ao realizar esse processo de passagem, teremos um subcultivo de células aderentes. Vale destacar que o subcultivo desse tipo de células deve ser realizado sempre que se observar a confluência de 80-90%, sendo esse um processo de manutenção cíclica.

Para as culturas de células suspensas, a passagem ou repique é realizado como se fosse

uma diluição, retirando as células que estão em suspensão no meio de cultura e repassando-as para uma nova garrafa com uma quantidade de meio suficiente para a propagação.

Subcultivo de células aderentes

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada); tripsina 1x; e solução PBS estéril (autoclavada).

Nota 1: para fazer a solução tripsina 1x, dilua 1 mL de tripsina estéril em 9 mL de água destilada. Lembre-se de realizar esse processo dentro da cabine de segurança biológica e com o fluxo ligado.

Nota 2: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Observe no microscópio invertido o nível de confluência da cultura e se ela apresenta sinais que indicam contaminação ou deterioração (encolhimento, linhas irregulares e granulação). Sendo o caso, recomenda-se o descarte do cultivo de acordo com as boas práticas.

6º Na ausência de sinais de contaminação e/ou deterioração e com confluência em 80-90%, realize o subcultivo. Caso contrário, proceda com a manutenção do cultivo.

7º Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur acoplada a um pipetador automático, ou ainda acoplada a uma bomba de vácuo, cuidadosamente retire o meio suplementado da garrafa.

8º Com o auxílio de uma micropipeta, lave cuidadosamente a monocamada celular com 2 mL de solução PBS estéril. Repita essa operação por 3 vezes.

9º Com o auxílio de uma micropipeta, realize o processo de dissociação da monocamada, adicionado solução tripsina 1x.

Nota: adicione 1 mL de solução tripsina 1x para garrafas de 25 cm³, e 3 mL para garrafas de 75 cm³.

10° Deixe a tripsina agir de 3 a 5 minutos na incubadora a 37 °C com atmosfera umidificada e com 5% de CO₂, verificando, a cada minuto, se a monocamada já descolou do fundo da garrafa.

11° Após a tripsinização, adicione o de meio de cultivo suplementado fresco, agitando vagarosamente.

Nota: adicione 2 mL de meio de cultivo suplementado em garrafas de cultivo de 25 cm³, e 6 mL em garrafas de 75 cm³.

12° Com o auxílio de uma micropipeta, transfira metade do conteúdo da garrafa que foi tripsinizada para uma nova garrafa.

Nota: lembre-se que essa nova garrafa deve ser específica para cultivo de células aderentes.

13° Identifique a garrafa, atualizando o número do subcultivo (passagem). Por exemplo: se a passagem que estava sendo cultivada era de número 18, após a tripsinização será de número 19, ou seja, passagem número 19 (ou P19).

14° Incube as garrafas a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

15° A cada 24 horas, observe o nível de confluência e realize a manutenção. Ao atingir confluência ideal, realize novamente o procedimento de passagem.

Se liga!

Para evitar a contaminação cruzada entre as linhagens celulares, recomenda-se que o trabalho a ser desenvolvido com cada tipo seja realizado em momentos diferentes. Além disso, recomenda-se que os materiais sejam exclusivos para cada linhagem.

Subcultivo de células não aderentes

1° Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2° Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3° Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada).

Nota: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4° Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5° Observe no microscópio invertido o nível de confluência da cultura e se ela apresenta sinais que indicam contaminação ou deterioração (encolhimento, linhas irregulares e granulação). Sendo o caso, recomenda-se descartar o cultivo de acordo com as boas práticas.

6° Na ausência de sinais de contaminação e/ou deterioração e com confluência em 80-90%, realize o subcultivo. Caso contrário, proceda com a manutenção do cultivo.

7° Retire uma alíquota do cultivo e realize a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.

8° A partir do conhecimento da concentração celular, transfira para um novo frasco uma suspensão celular de acordo com a velocidade de crescimento desejada, ou no máximo com 1×10^6 células/mL.

9° Adicione 5 mL de meio suplementado em cada nova garrafa de cultivo.

10° Agite vagarosamente com a própria micropipeta, ou em agitador a 60-100 rpm a 37 °C, evitando assim a permanência de grumos celulares.

11° Incube a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

No cultivo de células em suspensão, não há necessidade de utilizar a tripsina, o que é uma vantagem, pois não há riscos de lesão traumática nas células. O procedimento é muito mais simples, porém dependente do tipo de cultura a ser utilizado. A concentração celular máxima é de 1×10^6 células/mL.

3.4. Congelamento (criopreservação)

Em cultivo celular, o congelamento tem por objetivo parar ou retardar processos metabólicos, preservando as células. Geralmente se utiliza nitrogênio líquido, que alcança temperatura de até -196 °C, paralisando todas as atividades celulares. Porém, esse método de congelamento se torna mais caro, uma vez que necessita de reposição constante do nitrogênio.

O melhor método para criopreservação é o congelamento lento, em que há vagarosa diminuição da temperatura e solidificação da água presente na cultura, evitando a formação de cristais que podem danificar a célula. O ideal é fazer um controle da velocidade de congelamento, de 1 a 2 °C por minuto. Ainda assim, as células podem

sofrer danos e é por isso que se utilizam crioprotetores, como glicerol e DMSO. Deve-se lembrar que ambos são tóxicos para as células, devendo ser utilizados somente no momento do congelamento, e devidamente retirados no momento do descongelamento.

Congelamento de células aderentes

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada); tripsina 1x; solução PBS estéril (autoclavada); SFB inativado e estéril; e DMSO.

Nota: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Observe no microscópio invertido o nível de confluência da cultura e se ela apresenta sinais que indicam contaminação ou deterioração (encolhimento, linhas irregulares e granulação). Sendo o caso, recomenda-se descartar o cultivo de acordo com as boas práticas.

6º Na ausência de sinais de contaminação e/ou deterioração e com confluência em 80-90%, proceda com as etapas para congelamento.

7º Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur acoplada a um pipetador automático, ou ainda acoplada a uma bomba de vácuo, cuidadosamente retire o meio suplementado da garrafa.

8º Com o auxílio de uma micropipeta, lave cuidadosamente a monocamada celular com 2 mL de solução PBS estéril. Repita essa operação por 3 vezes.

9º Com o auxílio de uma micropipeta, realize o processo de dissociação da monocamada, adicionado solução tripsina 1x.

Nota: adicione 1 mL de solução tripsina 1x para garrafas de 25 cm³, e 3 mL para garrafas de 75 cm³.

10º Deixe a tripsina agir de 3 a 5 minutos na incubadora a 37 °C com atmosfera

umidificada e com 5% de CO₂, verificando, a cada minuto, se a monocamada já descolou do fundo da garrafa.

11° Após a tripsinização, adicione o meio de cultivo suplementado fresco.

Nota: adicione 2 mL de meio de cultivo suplementado em garrafas de cultivo de 25 cm³, e 6 mL em garrafas de 75 cm³.

12° Agite levemente a garrafa.

13° Com o auxílio de uma micropipeta, aspire todo o conteúdo da garrafa, transferindo-o para um Falcon estéril de 15 mL.

14° Centrifugue a 1.200 rpm por 10 minutos.

15° Dentro da cabine de segurança biológica e com o auxílio de uma micropipeta, cuidadosamente retire apenas o sobrenadante.

16° Adicione ao precipitado (pellet) a solução de congelamento (900 µL de SFB inativado e estéril + 100 µL de DMSO para cada criotubo) e homogeneíze delicadamente.

17° Transfira 1 mL desse conteúdo para cada criotubo.

18° Identifique o criotubo com informações como nome da linhagem, nome do responsável, data, número da passagem etc.

19° Armazene em ultrafreezer a -80 °C ou em nitrogênio líquido (-196 °C).

Congelamento de células não aderentes

1° Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2° Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3° Prepare as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada); SFB inativado e estéril; e DMSO.

Nota: mantenha o meio de cultivo em banho-maria a 37 °C até sua utilização.

4° Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5° Observe no microscópio invertido o nível de confluência da cultura e se ela apresenta sinais que indicam contaminação ou deterioração (encolhimento, linhas irregulares e granulação). Sendo o caso, recomenda-se

descartar o cultivo de acordo com as boas práticas.

6° Na ausência de sinais de contaminação e/ou deterioração e com confluência em 80-90%, proceda com as etapas para congelamento.

7° Retire uma alíquota do cultivo e realize a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.

8° Ajuste uma suspensão celular, com o meio de cultivo suplementado, correspondente a 2×10^7 células/mL.

9° Agite levemente a garrafa.

10° Com o auxílio de uma micropipeta, aspire o conteúdo da garrafa, transferindo-o para um Falcon estéril de 15 mL.

11° Centrifugue a 1.200 rpm por 10 minutos.

12° Dentro da cabine de segurança biológica e com o auxílio de uma micropipeta, cuidadosamente retire apenas o sobrenadante.

13° Adicione ao precipitado (pellet) a solução de congelamento (900 µL de SFB inativado e estéril + 100 µL de DMSO para cada criotubo) e homogeneíze delicadamente.

14° Transfira 1 mL desse conteúdo para cada criotubo.

15° Identifique o criotubo com informações como nome da linhagem, nome do responsável, data, número da passagem etc.

16° Armazene em ultrafreezer a -80°C ou em nitrogênio líquido (-196°C).

3.5. Contagem de células

A contagem do número de células presentes em um cultivo é imprescindível, uma vez que é a partir dela que conseguimos determinar o número de células viáveis e, assim, prosseguir com os ensaios, já que cada ensaio exige um determinado número de células.

A determinação do número de células pode ser realizada com uma câmara de contagem, chamada de *câmara de Neubauer*, ou ainda câmara Fuchs Rosenthal. Esse dispositivo consiste em uma grossa lâmina de vidro óptico composta por duas câmaras de contagem independentes, uma superior e uma inferior. Cada uma dessas câmaras possui 9 mm², constituídos de linhas que formam nove quadrantes de dimensões conhecidas (1 mm² cada).

A câmara de Neubauer é utilizada em técnicas de contagem em cultivo celular em microbiologia, hematologia, entre outras áreas, e é um dispositivo utilizado para realizar a contagem de diversas partículas em suspensão.

Contagem de células utilizando a câmara de Neubauer

1° Prepare a câmara de Neubauer posicionando uma lamínula de vidro sobre as câmaras de contagem.

Nota: a lamínula deve ser específica para ser usada em câmara de Neubauer, porque são mais grossas que as comuns, mantendo uma distância de 0,1 mm entre a lamínula e a lâmina, permitindo,

assim, obter um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ de suspensão celular em cada quadrante.

2º Injete, delicadamente, $10 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão celular bem homogeneizada entre a câmara e a laminula de vidro.

3º Leve a câmara de Neubauer ao microscópio e foque até conseguir observar os quadrantes.

4º Conte as células, considerando apenas aquelas que se encontrem dentro dos quatro quadrantes das pontas.

Nota: conte apenas das células vivas, evitando que sejam contadas em duplicidade. As células vivas aparecerão em cor translúcida brilhante, e as danificadas em cor escura.

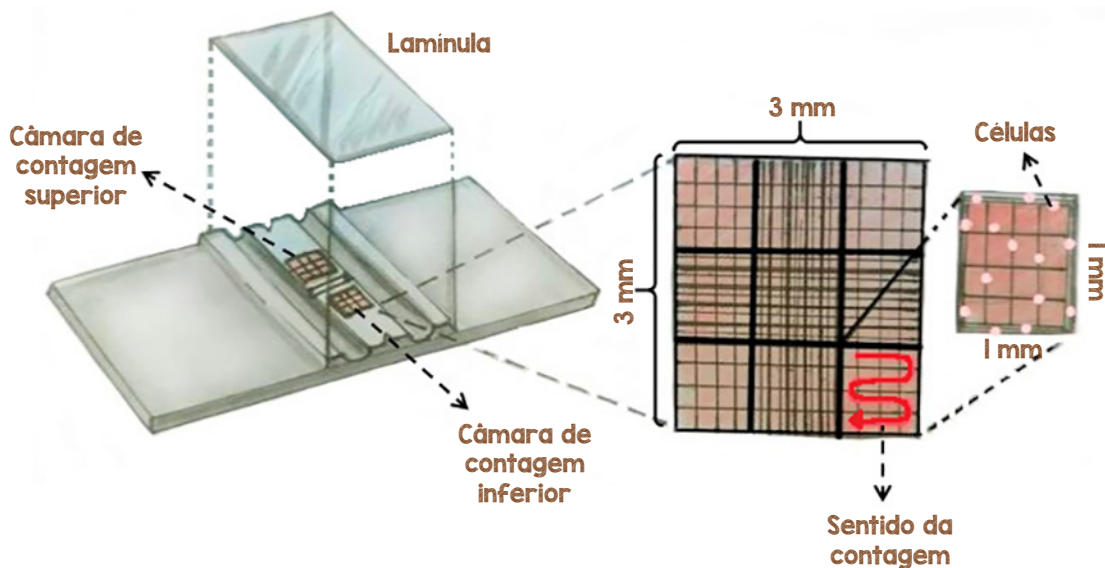


Figura 1. Câmara de Neubauer

5º Aplique a fórmula a seguir, pois ainda deve-se considerar alguns fatores para se obter o número real de células por mL:

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \cdot 10.000 \cdot \text{fator de diluição}$$

Sendo: Q_1 = número de células viáveis contadas no quadrante 1; Q_2 = número de células viáveis contadas no quadrante 2; Q_3 = número de células viáveis contadas no quadrante 3; Q_4 = número de células viáveis contadas no quadrante 4; 10.000 = fator de correção da câmara de Neubauer; e fator de diluição = número de vezes que sua amostra foi diluída.

Após a quantificação celular, muitas vezes você precisará ajustar a concentração de uma determinada suspensão. Por exemplo: você chegou a um valor de 50×10^4 células/mL (= 500.000 células/mL), entretanto, você precisará de 100 µL de uma suspensão celular a uma concentração de 1×10^4 células/mL (= 10.000 células/mL). Logo:

$$\begin{array}{rcl} 500.000 & \text{-----} & 1.000 \text{ µL} \\ 10.000 & \text{-----} & x \\ 500.000x & = & 10.000.000 \\ x & = & 20 \text{ µL da suspensão inicial, diluídos em} \\ & & 80 \text{ µL de meio de cultivo} \end{array}$$

3.6. Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular é definida como o momento em que uma célula se divide gerando, assim, uma nova célula, sendo esse fenômeno contínuo e natural entre todos os seres vivos. Contudo, uma desregulação no ciclo celular pode favorecer um crescimento e proliferação descontrolados, levando ao surgimento de células tumorais.

Diante disso, os ensaios de avaliação da proliferação celular são comumente empregados para avaliar as atividades celulares, bem como a ação de um determinado composto sobre o crescimento das células tumorais, indicando seus potenciais efeitos na viabilidade celular e citotoxicidade.

3.6.1. Ensaio de redução de tetrazólio (MTT)

Esse ensaio, descrito primariamente por Mosmann (1983), tem por objetivo avaliar a viabilidade e, conseqüentemente, a proliferação celular, a partir da atividade enzimática mitocondrial de células vivas.

Para o desenvolvimento da técnica, utiliza-se o reagente 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), um sal de coloração amarelada e solúvel em água, que as células viáveis reduzem a formazan, outro sal, de coloração roxa e insolúvel em água. Dessa forma, consegue-se medir a viabilidade celular pela

observação e quantificação, em espectrofotômetro, de formazan, que corresponderá diretamente à quantidade de células viáveis, pois células mortas não conseguem realizar essa conversão.

A eficiência do ensaio é dependente de alguns fatores que precisam ser levados em conta, tais como: concentração de MTT, tempo de incubação, número de células viáveis e atividade metabólica. Sendo assim, considerando que a formação de cor depende da atividade mitocondrial, deve-se observar se essa atividade não está sendo suprimida por demais fatores, como variações nos níveis celulares de dinucleótido de nicotinamida e adenina, glicose ou outros fatores, o que poderá levar a resultados falsos, uma vez que a coloração não poderá ser observada, sugerindo que as células não estejam vivas ou não proliferaram.

Destaca-se que outras técnicas de avaliação da viabilidade celular, como o ensaio de sulforrodamina B, podem ser utilizadas para conduzir a um desfecho mais robusto, quando associadas ao ensaio de MTT.

Procedimentos para o ensaio de MTT (adaptado)

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare todas as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada); solução PBS estéril (autoclavada); soluções-controle e compostos-teste (de acordo com seu protocolo); solução MTT (0,5 mg/mL); e DMSO.

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Retire uma alíquota do cultivo e realize a quantificação das células viáveis em câmara de Neubauer.

6º Prepare uma suspensão celular, em meio de cultivo suplementado fresco, na concentração 5×10^3 células/mL.

7º Semeie 100 µL dessa suspensão em cada poço de uma microplaca de poliestireno estéril.

8° Incube a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24 horas, ou até observar adequada aderência e confluência.

9° Retire o meio de cultura, cuidando para não danificar as células que aderiram ao fundo da placa.

10° Trate as células com as respectivas soluções-controle e compostos-teste nas concentrações desejadas.

11° Incube novamente a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24, 48 ou 72 horas (conforme seu protocolo).

12° Ao final de cada tempo de tratamento, retire o meio de cultura dos poços correspondentes ao período.

13° Lave cada um desses poços com 50 µL de solução PBS estéril e à temperatura de 37 °C (repita esse processo 2 vezes).

14° Adicione em todos os poços 50 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL diluído em água).

Nota: manuseie o MTT no escuro, pois o reagente é fotossensível.

15° Incube a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 2 horas.

16° Retire cuidadosamente a solução de MTT dos poços.

17° Incube a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ até o final do próximo tempo de tratamento.

18° Repita as etapas de 12 a 17 após o término de cada um dos tempos de tratamento.

19° Após todos os poços passarem pela etapa de adição e posterior retirada de MTT, adicione a cada um deles (inclusive nos controles) 50 µL de DMSO puro.

20° Agite a microplaca com o auxílio de um agitador de microplacas por 5 minutos.

21° Aguarde 5 minutos para estabilização da cor.


22° Realize imediatamente a leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 492 nm.

23° Aplique a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \left(\frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células do controle}} \right) \cdot 100$$

Nota: realize o ensaio em duplicata e, preferencialmente, em dois ensaios independentes.

Cultivo e semeadura das células em placa

 Cultivar as células em garrafa até confluência ideal

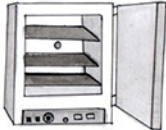
 Observar condições do cultivo e realizar quantificação celular

 Semear 100 μL de uma suspensão celular, a uma concentração de 5×10^3 células/mL, em cada poço de uma microplaca

 Incubar a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO_2 por 24 horas

Tratamento

 Retirar o meio de cultura e tratar as células com as respectivas soluções-controle e compostos-teste nas concentrações desejadas

 Incubar novamente a microplaca a 37 °C, atmosfera umidificada e com 5% CO_2 por 24, 48 ou 72 horas (conforme seu protocolo)

Ensaio com MTT

 Lavar 2x cada um dos poços com 50 μL de solução PBS estéril, a 37 °C
Adicionar, em cada poço, 50 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL)

 Incubar a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO_2 por 2 horas

 Retirar o MTT e adicionar, em cada um dos poços, 50 μL de DMSO puro
Agitar a microplaca e aguardar estabilização da cor

 Realizar, imediatamente, a leitura da DO em espectrofotômetro a 492 nm
Aplicar a fórmula para determinar a % de viabilidade celular

Figura 2. Etapas para o ensaio do MTT

3.6.2. Ensaio de sulforrodamina B

O ensaio de sulforrodamina B (SRB) é frequentemente usado para avaliar a atividade antiproliferativa, em que o reagente, uma aminoxantina de coloração vermelho brilhante, tem a capacidade de se ligar aos componentes proteicos das células. Ao ligar-se a essas estruturas celulares, o SRB é fixado pela ação do ácido tricloroacético (TCA), fazendo, assim, com que se tenha uma quantificação celular total independente da atividade metabólica das células. O ensaio de SRB apresenta como vantagem a realização da leitura em espectrofotômetro depois do ensaio, e não necessariamente imediatamente, como no ensaio do MTT. É um método muito utilizado para a avaliação citotóxica de extratos de plantas contra células tumorais.

Procedimentos para o ensaio de SRB (adaptado)

1º Vista todos os EPIs exigidos para a prática de cultivo celular.

2º Realize a devida limpeza da cabine de segurança biológica, bem como de todos os materiais a serem utilizados.

Nota: logo após a limpeza da cabine e dos materiais, já posicione todos eles dentro da cabine, evitando introduzir novos materiais após o início dos procedimentos (caso necessário, faça a assepsia desses materiais borrifando álcool 70% sobre sua superfície externa).

3º Prepare todas as soluções a serem utilizadas: meio de cultivo suplementado com 10% de SFB inativado e estéril + 1% de PSA (ou outro meio específico para a linhagem celular a ser trabalhada); soluções-controle e compostos-teste (de acordo com seu protocolo); TCA gelado a uma concentração de 10% (diluído em água destilada); ácido acético 1% (diluído em água destilada); SRB 0,4% (diluído em ácido acético 1%); e tris-base pH 10,0 (10 mM).

4º Retire a garrafa de cultivo da incubadora CO₂.

5º Retire uma alíquota do cultivo e realize a quantificação das células viáveis em câmara de Neubauer.

6º Prepare uma suspensão celular, em meio de cultivo suplementado fresco, na concentração 5×10^3 células/mL.

7º Semeie 100 µL dessa suspensão em cada poço de uma microplaca de poliestireno estéril.

8º Incube a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24 horas ou até observar adequada aderência e confluência.

9º Retire o meio de cultura, cuidando para não danificar as células que aderiram ao fundo da placa.

10º Trate as células com as respectivas soluções-controle e compostos-teste nas concentrações desejadas.

11° Incube novamente a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24, 48 ou 72 horas (conforme seu protocolo).

12° Ao final de cada tempo de tratamento, retire o meio de cultura dos poços correspondentes ao período.

13° Adicione em todos os poços 100 µL de TCA gelado, a uma concentração de 10%.

14° Incube a 4 °C por 1 hora.

15° Retire o TCA e lave cada poço com 50 µL de água destilada (repita esse processo 5 vezes).

16° Deixe a microplaca secar (esse pode ser o primeiro ponto de parada).

17° Adicione em cada poço 50 µL de SRB 0,4% (diluído em ácido acético 1%).

18° Incube a placa por 30 minutos em local escuro.

19° Retire o SRB e lave cada poço 5 vezes com 100 µL de ácido acético 1%.

20° Deixe a microplaca secar (esse pode ser o segundo ponto de parada).

21° Repita as etapas de 12 a 20 após o término de cada um dos tempos de tratamento.

22° Adicione em cada poço 100 µL de tris-base pH 10,0 (10 mM).

23° Agite a microplaca com o auxílio de um agitador de microplacas por 5 minutos.

24° Aguarde 5 minutos para estabilização da cor.


25° Realize a leitura em espectrofotômetro a 530 nm.

26° Aplique a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \left(\frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células do controle}} \right) \cdot 100$$

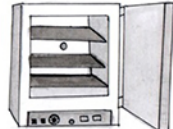
Nota: realize o ensaio em duplicata e, preferencialmente, em dois ensaios independentes.

Cultivo e semeadura das células em placa

 Cultivar as células em garrafa até confluência ideal

 Observar condições do cultivo e realizar quantificação celular

 Semear 100 mL de uma suspensão celular, a uma concentração de 5×10^3 células/mL, em cada poço de uma microplaca

 Incubar a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24 horas

Tratamento

 Retirar o meio de cultura e tratar as células com as respectivas soluções-contrôle e compostos-teste nas concentrações desejadas

 Incubar novamente a microplaca a 37 °C, em atmosfera umidificada e com 5% CO₂ por 24, 48 ou 72 horas (conforme seu protocolo)

Ensaio com Sulforrodamina B

TCA 10%
 Adicionar, em cada um dos poços, 100 µL de TCA 10% gelado
Incubar a 4 °C por 1 hora

dH₂O
 Retirar o TCA e lavar 5× cada um dos poços com 50 µL de água destilada
Deixar a microplaca secar

SRB 0,4%
 Adicionar, em cada um dos poços, 50 µL de SRB 0,4%
Incubar a placa por 30 minutos em local escuro

Ácido acético 1%
 Retirar o SRB e lavar 5× cada um dos poços com 100 µL de ácido acético 1%
Deixar a microplaca secar

Tris-base 10 mM
 Adicionar, em cada um dos poços, 100 µL de tris-base pH 10,0 (10 mM)
Agitar a microplaca e aguardar estabilização da cor

 Realizar imediatamente a leitura da DO em espectrofotômetro a 530 nm
Aplicar a fórmula para determinar a % de viabilidade celular

Figura 3. Etapas para o ensaio com sulforrodamina B

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula. 4. ed. Porto Alegre: artmed, 2004.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde* 2. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010. p. 215-253. Disponível em: <http://bit.ly/3osnxNF>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- BOGO, D. *Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural*. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009. Disponível em: <http://bit.ly/32eoriY>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- CÂMARA, B. Conhecendo a câmara de Neubauer. In: CÂMARA, B. *Biomedicina padrão*. [S. l.: s. n.], 7 jan. 2015. Disponível em: <http://bit.ly/2YPyHvx>. Acesso em: 18 fev. 2019.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. Manutenção e cuidados para uma incubadora. In: DATAMED. *Blogs*. São Paulo: Datamed, 7 nov. 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2LhhV5f>. Acesso em: 14 fev. 2019.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 5. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005.
- HARADA, T. N. *Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em Artemia salina Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais*. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009. Disponível em: <http://bit.ly/2xGJlc5>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- HOUGHTON, P. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007. Disponível em: <http://bit.ly/2Lk3ZaO>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- MALAJOVICH, M. A. *Biotecnologia 2011*. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feller do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- MARQUES, F. cultura celular. In: NUNES, P. (coord.). *Knoww.net: enciclopédia temática*. [S. l.: s. n.], 25 dez. 2015. Disponível em: <http://bit.ly/2JyzxGE>. Acesso em: 14 fev. 2016.
- MARTINS, A. K. A. *et al.* Cultivo de linhagens permanentes. In: PERES, C. M.; CURI, R. (org.). *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 41-49.
- MIGITA, N. A. *Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares*. 2012. Monografia (Bacharelado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, 2012.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: <http://bit.ly/3oDgjXt>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- QIAGEN. Animal cell culture. In: QIAGEN. *Qiagen: learning hub*. Hilden: Qiagen, [20--]. Disponível em: <http://bit.ly/32pzO7A>. Acesso em: 14 maio 2018.
- SPEROTTO, R. A. (org.). *Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde*

FARMACOGNOSIA

6

Autores

Chana de Medeiros da Silva
Greice Graziela Moraes
Pâmela Silveira Pedroso
Vanessa Caroline Hermes

Ilustração

Letícia Clauhs



Farmacognosia é um dos ramos mais antigos e ainda um dos mais relevantes das ciências farmacêuticas, e tem como objetivo a descoberta e o estudo de princípios ativos naturais, sejam eles vegetais, animais ou, ainda, obtidos de outros tipos de organismos, como bactérias, fungos e organismos marinhos.

O termo farmacognosia deriva das palavras gregas *pharmakon* (fármaco) e *gnosis* (conhecimento), e foi utilizado pela primeira vez em 1811 pelo médico austríaco J. Adan Schmidt. Entretanto, mesmo antes de ter uma definição mais clara, seu “conceito” já era muito utilizado, uma vez que há relatos apontando a utilização de plantas para fins medicinais desde por volta de 2600 a.C., pelos povos

da Mesopotâmia. Desde então, muitos relatos foram encontrados, sendo atualmente mais bem descritos e elucidados, demonstrando, assim, que os compostos naturais constituem importante fonte para obtenção de substâncias biologicamente ativas.

Pode-se dizer, portanto, que a farmacognosia é uma ciência multi e interdisciplinar, que faz interface com as áreas da física, química, bioquímica, fitoquímica, botânica, microbiologia, farmacologia, farmacotécnica, toxicologia, antropologia, entre outras. Dessa forma, pode-se defini-la mais amplamente como a ciência que estuda, a partir da aplicação simultânea de várias disciplinas, os compostos bioativos com o objetivo de conhecer os fármacos naturais sob todos os aspectos.

I. COMPOSTOS BIOATIVOS OBTIDOS DAS PLANTAS

As plantas são usadas há milhares de anos pelo ser humano na forma de alimento e no tratamento de doenças. Inicialmente, as plantas eram o único recurso terapêutico existente para a sobrevivência humana, e seu uso era realizado de maneira empírica, construindo-se, assim, o conhecimento tradicional que foi passado ao longo de gerações.

A partir do século XX, com os avanços na área da química e o surgimento de técnicas de extração e isolamento de compostos, as plantas passaram a ser investigadas e a ser vistas como possíveis matérias-primas para o desenvolvimento de fármacos.

Ao serem administradas, as plantas medicinais desenvolvem uma resposta biológica devido à presença de substâncias chamadas de metabólitos secundários, que elas produzem naturalmente para se defender de microrganismos e animais herbívoros, para atrair insetos polinizadores e para competir ou cooperar com outras espécies (alelopatia), representando assim uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante. Entre os compostos que compõem o metabolismo secundário das plantas estão os glicosídeos, mucilagens, flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas, cumarinas, alcaloides, terpenoides e peptídeos. Esses compostos apresentam grande valor comercial, não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica,

de perfumaria e outras. Entretanto, destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde humana, como atividade diurética, antipirética, analgésica, cicatrizante, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, entre outras.

2. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DAS PLANTAS

Os extratos brutos vegetais são misturas de compostos contendo diferentes grupos funcionais de diferentes classes vegetais. Nesse contexto, no momento de selecionar um método extrativo para o melhor aproveitamento dos metabólitos, deve-se avaliar a eficiência e a estabilidade das substâncias a serem extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando o objetivo final do extrato que se quer preparar. Assim, veremos os processos iniciais, desde o beneficiamento da matéria-prima vegetal a alguns processos utilizados na extração de produtos vegetais, bem como algumas técnicas de isolamento de compostos de origem vegetal de interesse.

2.1. Beneficiamento da matéria-prima vegetal pós-colheita

A etapa de beneficiamento consiste em um conjunto de processos para a devida preparação e armazenamento da matéria-prima vegetal, para posterior preparação dos extratos ou extração de óleos.

1º Lavagem: ao chegar no laboratório, a primeira etapa é a limpeza da matéria-prima vegetal. Essa etapa é muito importante para remoção de contaminantes estranhos provenientes de seu habitat natural, como terra, microrganismos, poeira, insetos e pedras. Esse processo deve ser realizado com água, etanol ou suas misturas, por imersão ou por jato, e somente nos casos em que não há risco de ocorrer alterações nos constituintes químicos de interesse.

2º Seleção: essa etapa consiste na realização de uma inspeção visual e na eliminação das partes ou componentes indesejados das matérias-primas vegetais como, por exemplo, partes que não pertencem ao farmacógeno (porção vegetal de interesse) ou partes que pertencem ao farmacógeno, mas que estão doentes, deformados ou com manchas. Pode ser realizada simultaneamente com a etapa de lavagem.

3º Secagem: a secagem das plantas após a colheita é uma etapa muito importante, pois diminui a velocidade de deterioração do vegetal, devido à diminuição da quantidade de água e, por conseguinte, da ação de enzimas, bolores e leveduras, e bactérias. Dessa forma, a planta pode ser usada na forma fresca ou seca, mas a secagem permite a obtenção de uma matéria-prima vegetal com maior tempo de conservação e, além disso, ocasiona a redução do volume e do peso do produto, facilitando seu armazenamento e transporte.

O processo de secagem das plantas deve ser realizado em um ambiente limpo, bem ventilado, protegido do ataque de insetos e outros animais, e ao abrigo da luz. Deve-se secar cada parte da planta individualmente, para não haver mistura de elementos voláteis, separando sempre as partes mais úmidas, como os ramos, das partes mais secas, como as folhas. Isso permite que a secagem aconteça uniformemente. Existem dois processos de secagem que são muito utilizados:

■ **Processos naturais:** utilizados principalmente quando não se dispõe de estufas, podendo ser realizados à sombra, sob o abrigo da luz do sol. No entanto, essa técnica apresenta muitas desvantagens, pois é um processo lento, que pode resultar na deterioração do vegetal devido à exposição a poeira, luz, vento, umidade e, além disso, pode sofrer com o ataque de animais e microrganismos.

■ **Processos artificiais:** realizados por meio de aquecimento em estufas de ar circulante. Uma das grandes vantagens desse método é a agilidade do processo quando comparado aos métodos naturais de secagem.

A temperatura é um fator muito importante na hora da secagem, pois pode ocasionar alterações nas características físico-químicas, provocando alterações na qualidade da matéria-prima vegetal. A temperatura ideal para secagem de partes moles,

como folhas e flores, é de 38 °C, enquanto para secagem das partes mais duras, como caules e raízes, a temperatura é de 60 °C.

É muito importante seguir precisamente esses critérios para assegurar a qualidade pós-colheita das plantas.

4º Armazenamento: o tempo de armazenamento deve ser o menor possível, para que não ocorra perdas qualitativas e/ou quantitativas das substâncias ativas das plantas. O local de armazenamento deve ser seco, arejado, escuro, de temperatura baixa e isolado de pragas. O recipiente de armazenamento deve ser, preferencialmente, sacos duplos ou frascos âmbar com tampa hermética, pois estes oferecem abrigo de luz, umidade e calor, permitindo melhor conservação da droga vegetal.

5º Moagem: a moagem é realizada de acordo com o tamanho do material vegetal desejado. Pode ser feita por secção, que consiste em cortar o material vegetal com tesouras, sendo indicada principalmente para folhas e plantas herbáceas. Outro método utilizado é a moagem por contusão, com equipamentos chamados de moinhos, que permitem a obtenção de partículas com diferentes granulometrias, sendo indicada para folhas secas e outras partes vegetais que sejam de consistência dura. E, por último, há a técnica de rasuração, realizada com raspadores, indicada para cascas e sementes. Um dos grandes benefícios da

diminuição do tamanho do material vegetal é a facilidade de armazenamento e transporte.

2.2. Preparação de extratos vegetais

Extratos são misturas complexas constituídas por diversas classes de metabólitos, e podem ser utilizados na fabricação de produtos fitoterápicos. São obtidos por meio de processos extrativos que apresentam como princípios físico-químicos a difusão e/ou lavagem do material vegetal para obtenção dos metabólitos de interesse.

Dessa forma, utilizam-se matérias-primas vegetais naturais e solventes, ou misturas de solventes, com objetivo de extrair os componentes ativos das plantas. Existem diferentes tipos de técnicas que podem ser usadas para o preparo de extratos vegetais, classificadas em técnicas a frio, como é o caso da maceração, e técnicas a quente, como as de refluxo e soxhlet.

2.2.1. Maceração

A maceração é um método de extração que utiliza matérias-primas vegetais já trituradas ou rasuradas, realizada em um recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um longo período de tempo, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Uma das vantagens desse método é que não ocorre o esgotamento da matéria-prima devido à saturação do líquido extrator.



Figura 1. Preparação de extratos vegetais pela técnica de maceração

2.2.2. Refluxo

Refluxo é um processo de extração a quente, realizado em um sistema fechado. O seu procedimento consiste em colocar o líquido extrator (solvente) e o material vegetal em um mesmo recipiente, devendo este estar acoplado a um condensador, que será submetido a aquecimento. Durante o aquecimento, o solvente evapora e, ao chegar no condensador, volta para o estado líquido, retornando para o recipiente e iniciando um novo ciclo. Essa técnica permite extrair uma grande quantidade de compostos ativos. No entanto, não é recomendada sua utilização para extrair substâncias termossensíveis.

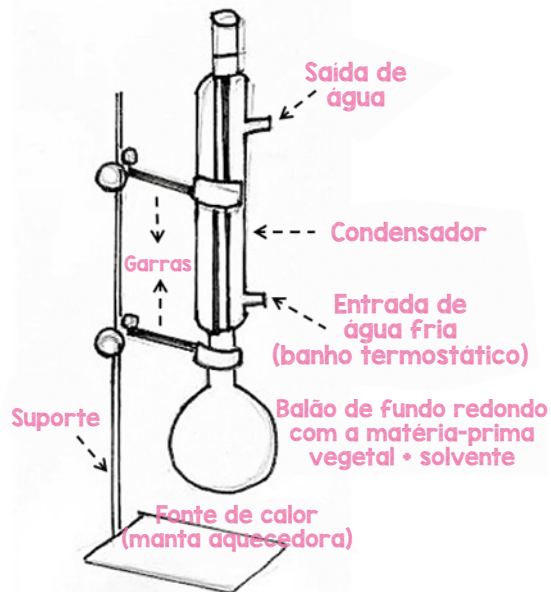


Figura 2. Preparação de extratos vegetais por refluxo

2.2.3. Soxhlet

O soxhlet é uma vidraria laboratorial inventada em 1879 por Franz von Soxhlet, inicialmente utilizada na extração de lipídios de materiais vegetais no estado sólido. Assim como a extração por refluxo, a extração pelo soxhlet também emprega calor e é realizada em um sistema fechado. No entanto, o material vegetal e o solvente extrator não se encontram no mesmo recipiente.

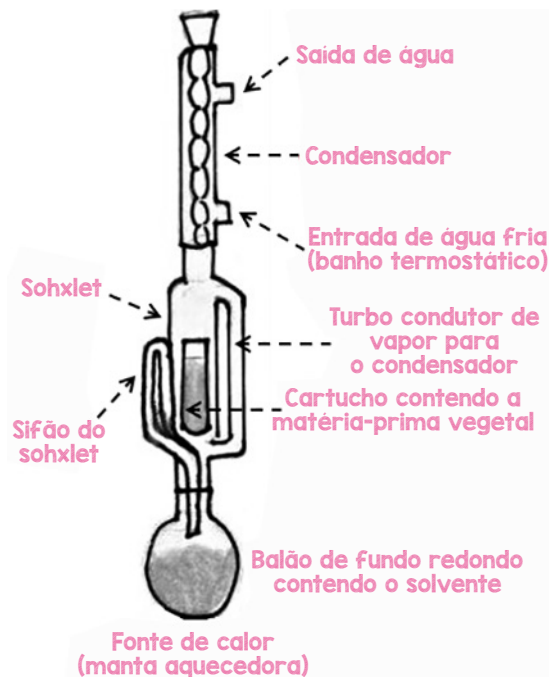


Figura 3. Extrator do tipo soxhlet

Nesse caso, o solvente, que se encontra em um balão de fundo redondo, é aquecido, tendo seu vapor posteriormente condensado. O líquido arrefecido cai sobre o cartucho contendo a matéria-prima vegetal, que se encontra na câmara central do soxhlet. Essa câmara vai então acumulando lentamente o solvente, que dissolve os compostos presentes na matéria-prima, até estar cheia ao ponto de ser esvaziada através do sifão, retornando para o balão e completando um ciclo de extração. Assim, a cada ciclo, uma porção dos compostos presentes na matéria vegetal se dissolve no solvente e, ao final de vários ciclos, esses compostos estarão concentrados no balão. Essa separação possibilita que a cada novo ciclo da extração ocorra renovação do solvente que entra em contato com o material vegetal. Isso possibilita uma extração com maior eficiência e utilizando menor quantidade de solvente.

1º Aquecimento e evaporação do solvente



Solvente é aquecido no balão e evapora, subindo até o condensador através de um tubo condutor de vapor.

2º Condensação do solvente



Ao passar pelo condensador, que está sendo abastecido por água fria, o solvente condensa e entra em contato com o cartucho contendo a matéria-prima vegetal

3º Retorno do solvente para o balão



Câmara central do soxhlet vai enchendo de solvente até o momento de retornar para o balão através do sifão. Neste momento o solvente carrega os compostos extraídos da matéria vegetal, concentrando-os no balão.

Figura 4. Etapas de extração pelo soxhlet

2.3. Extração de óleos vegetais

Os óleos vegetais são lipídios que podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como de folhas, sementes, frutos, flores, raízes e caules. Somados a esses lipídios, porém em menor quantidade, têm-se outras substâncias, como esteróis, carotenoides, vitaminas, terpenos, minerais e proteínas, que conferem a esse óleo propriedades físico-químicas e organolépticas. Devido a essas combinações, cada óleo

vegetal irá apresentar uma característica e propriedade diferente, com aplicações nas mais diversas áreas, como em cosméticos, terapêuticos, alimentos, combustível, entre outros.

Existem basicamente dois tipos de óleo vegetal – os óleos essenciais e os fixos –, que são obtidos a partir de processos de extração. Entretanto, deve-se aplicar as devidas técnicas, garantido e mantendo as características e propriedades dos óleos vegetais.

2.3.1. Extração de óleos essenciais

Óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtida de matérias-primas de origem vegetal. Os métodos de extração dos óleos voláteis variam de acordo com o local em que o óleo se localiza na planta. As técnicas mais utilizadas são: enfloração, destilação, arraste por vapor d'água, prensagem a frio e extração por CO₂ supercrítico.

2.3.1.1. Enfloração

Também conhecido como *enfleurage*, esse método é muito utilizado pelas indústrias de perfumes para plantas que apresentam baixo teor de óleo, mas que têm alto valor comercial. Muito usado para extração de óleo de matérias-primas mais delicadas, como pétalas de flores. As pétalas são depositadas sobre uma camada de gordura animal ou vegetal inodora, permanecendo

ali por determinado período de tempo, e sendo substituídas por pétalas frescas até que ocorra a saturação total da gordura. Essa gordura é então destilada, obtendo-se um concentrado oleoso aromático.

2.3.1.2. Destilação

Esse método consiste em colocar a matéria-prima vegetal diretamente dentro de um recipiente em contato com água, e aquecê-lo até a formação de vapor. Com isso, as substâncias voláteis serão arrastadas juntamente com o vapor d'água até chegar ao condensador, no qual a mistura retornará ao estado líquido. A mistura de óleo e água é separada por diferença de densidade. A maior desvantagem dessa técnica é o contato direto do material vegetal com a água fervente, que contribui para o surgimento de processos hidrolíticos. A extração é realizada em laboratório com o aparelho de clewenger, utilizando principalmente matérias-primas vegetais frescas.

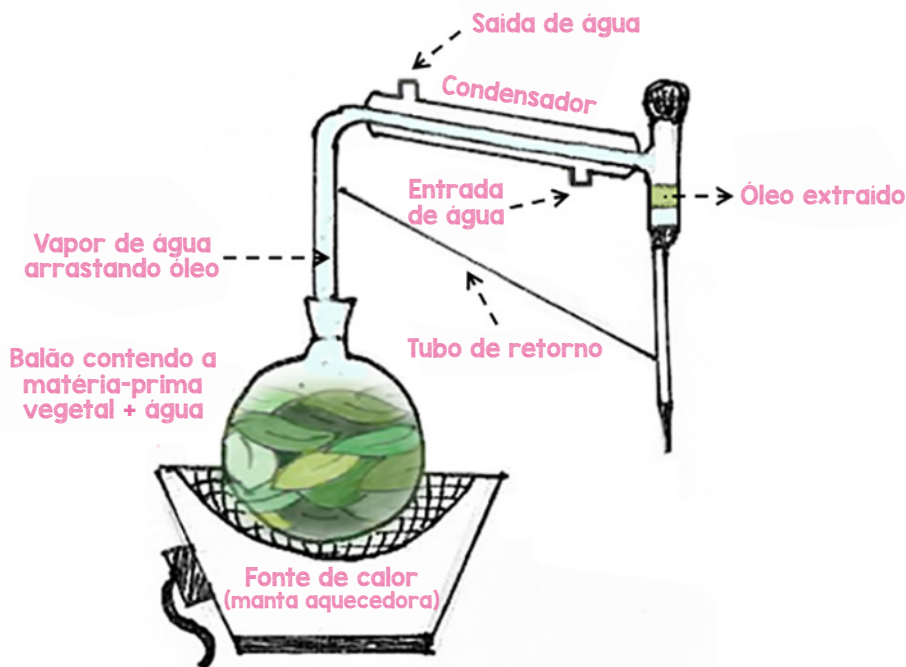


Figura 5. Extração de óleos essenciais por destilação

2.3.1.3. Arraste por vapor d'água

Essa técnica é muito semelhante à citada anteriormente, no entanto, não ocorre contato direto da matéria-prima vegetal com a água fervente. Nesse caso, o aquecimento da matéria-prima ocorre de forma indireta pela passagem do vapor d'água pela matéria-prima vegetal, que se encontra em outro recipiente.

Nesse processo, a água, que está em um balão, é aquecida até formar vapor.

Esse vapor entra em contato com a matéria-prima vegetal, que se encontra em um outro recipiente juntamente com uma pequena porção de água. Ao entrar em contato com a matéria vegetal, o vapor libera e arrasta o óleo essencial consigo. Esse vapor carregado de óleo essencial é então condensado, e posteriormente coletado. Como água e óleo são substâncias imiscíveis, são facilmente separados.

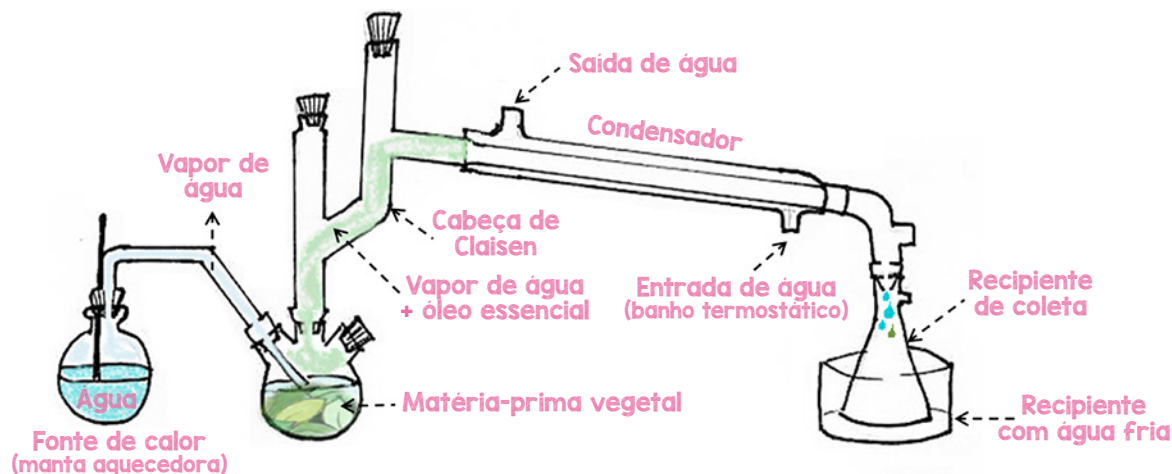


Figura 6. Extração de óleos essenciais pela destilação de arraste por vapor

2.3.1.4. Prensagem a frio

A técnica de prensagem a frio é amplamente utilizada para extrair óleos do pericarpo das frutas, principalmente das cítricas.

Nessa técnica são empregadas prensas hidráulicas para esmagar os frutos. Ao serem esmagados, o suco e o óleo essencial são expelidos simultaneamente. Para separar o óleo essencial do suco, aplicam-se jatos de água que formam uma emulsão constituída de 1 a 3% de óleo essencial, fragmentos sólidos e detritos, posteriormente separados com um ciclone. A próxima etapa consiste em colocar o óleo em um conjunto de centrífugas, para que ocorra sua clarificação, deixando-o em três fases: a fase leve (rica em óleo), fase intermediária (rica em água) e a fase pesada

(rica em sólidos pesados). A fase leve, com aproximadamente 80% de óleo essencial, é conduzida para tanques decantadores, nos quais ocorre a separação final.

O benefício dessa técnica é que não se utiliza nenhum aquecimento. No entanto, o rendimento de óleo obtido é baixo.

2.3.1.5. Extração por fluidos supercríticos

Esse método vem sendo muito utilizado em processos industriais, pois apresenta uma tecnologia limpa e não residual, além de manter de modo bastante eficiente os aromas naturais, voláteis e fixos das matérias-primas. Consiste em utilizar gases supercríticos, ou seja, gases que, em determinada temperatura

e pressão, permanecem em um estado físico entre o líquido e o gasoso (estágio supercrítico), capazes de agir como um solvente, extraindo os compostos da matéria-prima. O gás mais utilizado nesse processo é o CO₂ supercrítico, atuando a uma temperatura de 31,04 °C e 73,8 bar de pressão.

Uma das vantagens de utilizar o CO₂ supercrítico é seu baixo custo, alta disponibilidade, densidade relativamente alta, baixa viscosidade, alto poder de penetração e baixo risco de reações secundárias. Entretanto, o equipamento necessário é muito caro, sendo um método utilizado, basicamente, em processos de extração em escala industrial.

2.3.2. Extração de óleos fixos

Os óleos fixos são compostos constituídos principalmente de triacilgliceróis e podem ser obtidos de plantas ou animais. São produtos com variada aplicação industrial, nutricional e farmacológica. Os óleos fixos se diferenciam das gorduras somente no seu ponto de fusão, sendo líquidos em temperatura ambiente. Podem ser obtidos de diversas partes da planta, mas principalmente das sementes. A principal técnica para obtenção de óleos fixos é a prensagem.

2.3.2.1. Prensagem

Essa técnica consiste na aplicação de força mecânica, por meio de prensas mecânicas ou hidráulicas, para retirar o óleo contido

nas matérias-primas de origem vegetal ou animal. Dependendo do tipo da matéria vegetal, a prensagem pode ser realizada a frio, em temperatura ambiente ou mesmo sob temperatura elevada. O produto extraído deve ser purificado, devido à presença de impurezas resultantes do processo extrativo. É a técnica mais utilizada para extração de óleos fixos.

2.3.2.2. Extração por solventes

Ainda existem técnicas de extração baseadas na utilização de solventes que tenham afinidade com a parte lipofílica dos óleos. No entanto, o uso de solventes apresenta muitos inconvenientes, sendo o principal deles a presença de resíduos de solventes que podem levar a um risco tóxico. Dessa forma, é necessária a completa evaporação do solvente, mas com isso pode ocorrer a perda de substâncias importantes.

2.4. Técnicas de isolamento e análise de moléculas bioativas

As plantas são compostas por um sistema biossintético, que resulta na geração de uma complexa mistura de compostos bioativos provenientes de seu metabolismo secundário. Com o objetivo de identificar e melhor investigar esses compostos bioativos, desenvolveu-se diferentes técnicas para seu isolamento. As principais técnicas existentes para o isolamento e identificação de moléculas bioativas são baseadas nos fundamentos da cromatografia.

2.4.I. Cromatografia

Cromatografia deriva das palavras gregas *chroma* (cor) e *graphein* (escrever), referindo-se às primeiras observações de uma coluna cromatográfica, em que a visualização de anéis multicoloridos confirmava a separação de misturas. Atualmente sabe-se que a confirmação da separação dos componentes de uma mistura não depende apenas da visualização de cores, devendo-se considerar muitas outras características e propriedades desses componentes.

A cromatografia é um método físico-químico para separação de uma mistura em que os componentes a serem separados são distribuídos sobre uma fase estacionária, de ampla área superficial, e submetidos à ação de uma fase móvel que, por sua vez, passa através da fase estacionária, separando seletivamente os componentes dessa mistura. Assim, a cromatográfica é, de modo geral, baseada nas diferentes interações que ocorrem entre os componentes da mistura, a fase estacionária e a fase móvel.

A forma física do sistema é o que define a técnica a ser empregada, podendo a fase estacionária ser disposta sobre uma superfície planar (cromatografia planar) ou em tubo cilíndrico (cromatografia em coluna). A fase móvel também varia, podendo ser líquida, gasosa ou supercrítica.

2.4.I.I. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método líquido-sólido no qual a separação dos componentes de uma mistura é fundamentada no fenômeno da adsorção. Diferentemente da cromatografia em coluna, nesse caso a fase estacionária encontra-se retida sobre uma superfície plana (placa), que pode ser constituída de sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3), celulose, poliamida ou terra diatomácea. É um método bastante simples, rápido, econômico e de fácil visualização, sendo a principal escolha para o acompanhamento de reações orgânicas e identificação das frações obtidas com a cromatografia de coluna a partir de placas analíticas, além de ser utilizado para a purificação de substâncias, com uso de placas preparativas.

Atualmente existem no mercado placas analíticas e preparativas pré-montadas, em que a fase estacionária se encontra depositada sobre placas de vidro, alumínio ou plástico. A fase móvel deve ser selecionada de acordo com a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade dos eluentes, uma vez que há competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente.

O passo a passo para a preparação de uma placa pré-fabricada é o seguinte:

1º Vista os devidos EPIs e prepare a placa, preferencialmente dentro de uma capela de exaustão, devido à utilização de solventes orgânicos.

2º Delimite com grafite as margens da placa, considerando 0,5 cm para as bordas esquerda, direita e superior, e 1 cm para a borda inferior.

Nota 1: a borda superior será o limite máximo para a chegada da fase móvel.

Nota 2: a borda inferior deverá estar acima do nível da fase móvel, que se encontra dentro de uma cuba.

3º Selecione as amostras desejadas e, com o auxílio de capilares de vidro, goteje sobre a borda inferior.

Nota 1: cuide para que o diâmetro da mancha não se estenda muito.

Nota 2: caso tenha mais de uma amostra, respeite certa distância entre as aplicações.

4º Coloque a placa verticalmente em uma cuba contendo o solvente (ou a mistura de solventes) pré-selecionado.

Nota 1: recomenda-se selecionar misturas de solventes a fim de se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra e da fase estacionária.

Nota 2: para que ocorra uma saturação do meio e melhor ação da fase móvel, o ideal é recobrir as paredes da cuba e ela própria com papel filtro.

5º Deixe a placa nessa condição até que o eluente atinja a borda superior.

6º Retire a placa da cuba, deixando-a secar a temperatura ambiente.

7º Visualize o resultado.

Vale destacar que muitos compostos se tornam fluorescentes ao serem excitados e, assim, podem ser facilmente visualizados sob luz ultravioleta. Entretanto, a maioria dos compostos é transparente, e a placa deve ser submetida à ação de substâncias cromogênicas, que tornarão visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. Nesse caso, deve-se primeiramente borrifar a substância reveladora, da maneira mais uniforme possível, sobre a placa. Depois, coloque a placa por um curto período de tempo em uma estufa aquecida. Ao final desse processo, os compostos serão revelados. As substâncias reveladoras mais comuns são Dragendorff e iodoplatinado (para alcaloides), NPPEG (para flavonoides), anisaldeído sulfúrico (para saponinas, terpenos e esteroides), vapor de amônia (para antraquinonas e cumarinas), vapor de iodo e sulfato cérico (para compostos fenólicos, saponinas e terpenoides) e cloreto de ferro (para compostos fenólicos).

Nessa técnica, o solvente sobe por capilaridade, arrastando os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos.

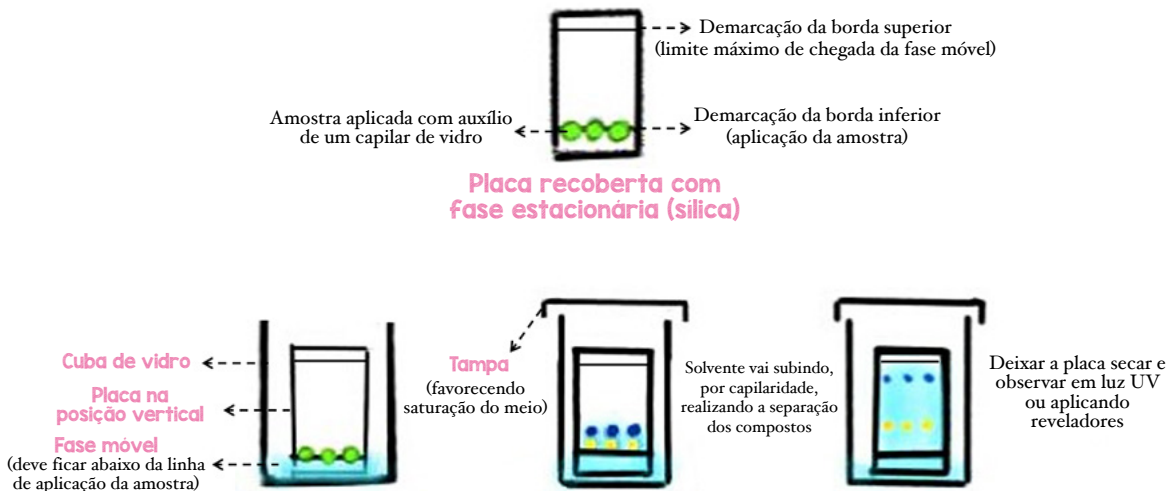


Figura 7. Cromatografia em camada delgada

2.4.1.2. Cromatografia em coluna aberta

A cromatografia em coluna (CC) é uma técnica cromatográfica que consiste em um tubo de vidro contendo a fase estacionária e posicionado verticalmente, com a extremidade superior aberta e a inferior afilada que, por sua vez, termina em uma torneira que permitirá o controle da vazão da fase. É uma técnica muito utilizada para o isolamento de compostos de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas.

Nessa técnica cromatográfica, a separação dos compostos também ocorre pelo

fenômeno de adsorção, pelo qual os componentes da mistura se aderem inicialmente à fase estacionária (adsorvente) por meio de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, entre outras. Os adsorventes mais empregados em CC também são SiO_2 , Al_2O_3 , celulose, poliamida, entre outros. A fase móvel, por sua vez, atua como um solvente, no qual as relações de solubilidade com os componentes da mistura farão com que estes sejam seletivamente removidos do adsorvente.

A escolha da fase estacionária deve levar em consideração a polaridade da amostra (mistura) e da própria fase estacionária,

considerando também a escolha por partículas adsorventes na faixa de 60-230 mesh, de modo a permitir um fluxo mais razoável do solvente através da coluna. Partículas menores (230-400 mesh) requerem a utilização de um sistema de bombeamento na hora do empacotamento e da eluição, neste caso chamado de “cromatografia em coluna flash”. Já a fase móvel deve ser escolhida de acordo com o seu poder de eluição. Recomenda-se fazer a escolha da fase móvel a ser utilizada na CC a partir da realização prévia de uma CCD que apresente o mesmo adsorvente empregado no preenchimento da coluna. Com isso, você irá testar a eficiência do sistema utilizando uma quantidade muito menor de fase móvel. Lembre-se que em fases estacionárias polares a dessorção é facilitada pelo uso de eluentes polares, e dificultada por eluentes de baixa polaridade. Ainda, o ideal é escolher solventes com baixo ponto de ebulição, a fim de facilitar sua evaporação. Na Tabela 1 estão dispostos os eluentes em ordem crescente de polaridade, com respectivos pontos de ebulição.

Tabela 1. Eluentes em ordem crescente de polaridade, e seus pontos de ebulição

Solvente	Ponto de ebulição inicial (°C)
Hexano	68
Éter de petróleo	30
Cicloexano	81
Tolueno	110,6
Diclorometano	39,6
Clorofórmio	61,2
Éter etílico	34,6
Acetato de etila	77,1
Acetona	56
Acetonitrila	82
Etanol	78,3
Metanol	64,7
Ácido acético	118,1
Água	100

A preparação de uma coluna chama-se empacotamento. A seguir está o passo a passo para o empacotamento de uma coluna, apresentando SiO_2 como fase estacionária:

1º Vista os devidos EPIs e realize o empacotamento da coluna, preferencialmente dentro de uma capela de exaustão, devido à utilização de solventes orgânicos.

2º Com o auxílio de um suporte universal e garras, posicione a coluna de vidro verticalmente, mantendo sua torneira fechada inicialmente.

3º Deposite na extremidade inferior um pedaço de algodão (aproximadamente 0,5 cm), que evitará a passagem de partículas sólidas.

4º Adicione aproximadamente $\frac{1}{3}$ de fase móvel (solvente).

5º Em um frasco, misture a fase estacionária (SiO_2) com uma porção da fase móvel até a formação de uma pasta homogênea.

6º Abra a torneira da coluna de vidro, deixando-a semiaberta, e posicione um frasco embaixo.

7º Com o auxílio de um bastão de vidro, imediatamente adicione a pasta à coluna, deixando-a escorrer pelas paredes, depositando-se assim o mais uniformemente possível.

Nota: nesse momento é muito importante não permitir que se retenha ar entre as partículas da fase estacionária,

caso contrário, poderá haver a formação de canais que comprometerão a separação cromatográfica. Para isso, evite que a fase móvel desça abaixo do nível da fase estacionária.

8º Após o empacotamento, recomenda-se passar certa quantidade de solvente pela coluna (cerca de 2 a 3 vezes o volume da coluna), sempre cuidando para que o nível de solvente permaneça acima do SiO_2 .

9º Quando a fase móvel estiver próxima à linha da fase estacionária (mas ainda acima dela), adicione, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a amostra, que já deverá estar diluída em uma porção mínima do solvente.

10º Após adicionar todo o volume de amostra, adicione cuidadosamente a fase móvel até que se forme uma coluna líquida incolor e límpida acima do nível superior da amostra.

11º Continue adicionando a fase móvel.

12º Mantenha frascos abaixo da torneira coletando as frações.

Nota: não existe um número exato de frações e respectivos volumes a serem coletados. Isso irá depender da quantidade de amostra adicionada e do grau de dificuldade da separação, devendo cada pesquisador definir o seu ideal.

Nessa técnica, quando a fase móvel passa pela fase estacionária (adsorvente), ela arrasta consigo os componentes da amostra. Isso vai ocorrendo por ação da gravidade, e a velocidade de eluição de um

componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, ou seja, quanto mais fracamente o composto for adsorvido, mais rapidamente será sua passagem pela coluna e vice-versa.

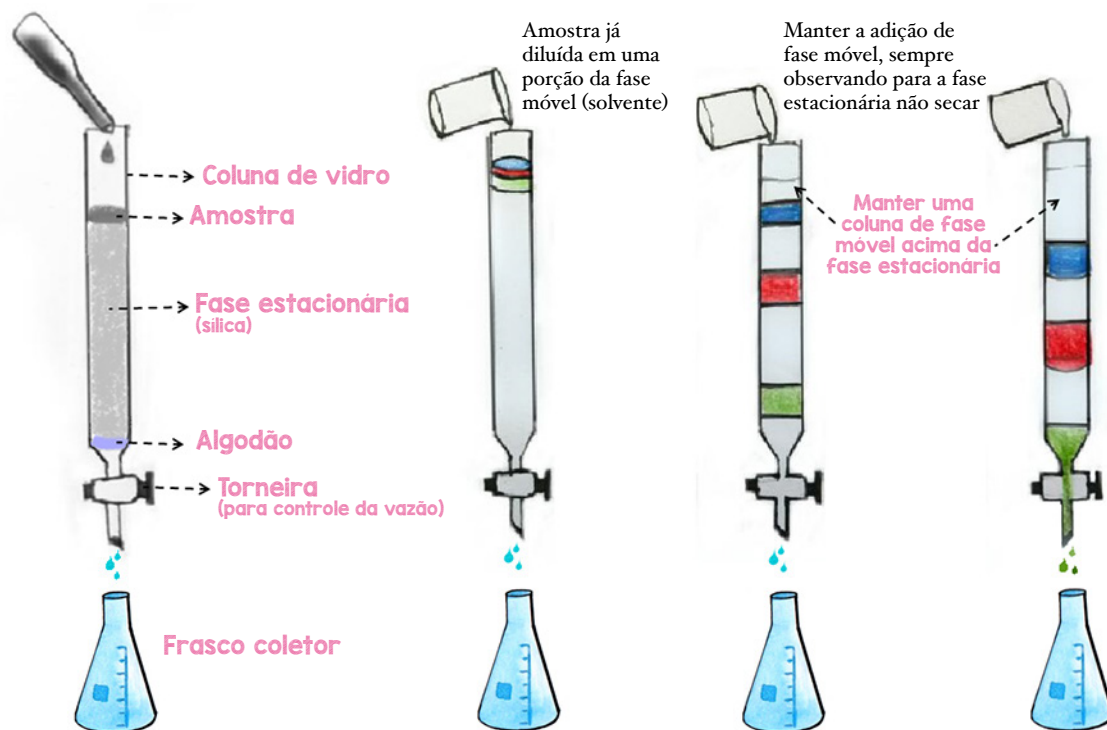


Figura 8. Cromatografia em coluna aberta

2.4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) é um método de separação muito eficiente e sensível, capaz de realizar determinações quantitativas, além de ser aplicável a diversos tipos de amostra.

O princípio básico de separação é o mesmo dos demais métodos cromatográficos, entretanto a CLAE é constituída por materiais mais robustos, como colunas de aço inoxidável recheadas com partículas diminutas, responsáveis pela alta eficiência; fases móveis com alto grau de pureza; sistema de bombeamento que permite uma adequada eluição da fase móvel; detectores para captação dos sinais; softwares para leitura dos dados, entre outros. Tudo isso permite a realização de separações e análises quantitativas em poucos minutos e com elevado nível de confiança, pois esse conjunto de ferramentas apresenta alta detectabilidade e resolução. Dessa forma, o uso de CLAE em laboratórios é indispensável. Seus componentes básicos são:

Reservatório da fase móvel: recipiente em que se encontram os solventes que irão atuar como a fase móvel no sistema.

Bomba: equipamento que irá gerar um fluxo contínuo da fase móvel no sistema. Deve

apresentar alta precisão e reprodutibilidade, garantindo resultados mais confiáveis.

Sistema de injeção: através de uma válvula de amostragem ou seringa de injeção. Injeta automaticamente a amostra no fluxo da fase móvel.

Coluna: onde encontra-se a fase estacionária. Geralmente pré-fabricada, deve ser adquirida de acordo com o adsorvente necessário.

Forno da coluna: faz com que a temperatura se mantenha constante durante a passagem da amostra e fase móvel pela coluna, permitindo melhor separação dos compostos e, consequentemente, maior reprodutibilidade da análise.

Detector: por meio de um sinal elétrico, realiza a detecção e a quantificação dos compostos. Pode ser um detector de ultravioleta, de fluorescência, de índice de refração, um eletroquímico, entre outros.

Software: sistema de tratamento de dados capaz de transformar os sinais elétricos emitidos pelo detector em picos. Esses picos correspondem aos componentes da amostra e, de acordo com a área apresentada por eles, podem representar a concentração desses compostos. O conjunto desses picos chama-se cromatograma.

Na CLAE há sete diferentes técnicas, definidas pelo tipo de separação ou fase estacionária. São elas:

Cromatografia liquido-sólido ou por adsorção: há competição entre os compostos da amostra e da fase móvel, os quais são adsorvidos pela fase estacionária, que pode ser SiO_2 ou Al_2O_3 , tal como na CCD. Os compostos facilmente separados são ácidos graxos, álcoois, alcaloides, aminas, antioxidantes, esteroides, vitaminas e fenóis.

Cromatografia liquido-liquido ou por partição: baseia-se nas solubilidades da amostra na fase móvel e estacionária, sendo a fase estacionária basicamente composta por um líquido imiscível na fase móvel. Os componentes mais solúveis ficam retidos na fase estacionária, e os menos solúveis são levados pela fase móvel. O contratempo dessa técnica é que há certa solubilidade da fase estacionária na fase móvel, ocorrendo rápida deterioração da coluna.

Cromatografia líquida com fase ligada: parte do mesmo princípio que a cromatografia líquido-líquido, porém não há problemas da solubilidade da fase estacionária na fase móvel, uma vez que a fase estacionária possui mais ativos polares.

Cromatografia líquida quiral: é empregada na separação de enantiômeros.

Cromatografia por troca iônica: a separação das moléculas ocorre com base em sua

carga. Nesse caso a fase estacionária, carregada de grupos funcionais ionizáveis, interage com os grupos iônicos da amostra.

Cromatografia por bioafinidade: a separação ocorre de maneira seletiva, na qual a fase estacionária apresenta ligantes específicos capazes de adsorver, por afinidade, as moléculas da amostra.

Cromatografia por exclusão: não é baseada nas interações entre as moléculas da amostra com a fase estacionária, e sim no tamanho das partículas. Dessa forma, não é possível separar misturas muito complexas.

Vale destacar que ainda existem outros tipos de métodos cromatográficos, como a cromatografia gasosa, que realiza a separação dos compostos de amostras voláteis, na qual a fase móvel constitui-se de uma substância gasosa, de alto grau de pureza, e a fase estacionária de substâncias líquidas. A cromatografia gasosa de alta eficiência, assim como a CLAE, é composta por materiais mais robustos, possibilitando alto poder de resolução e a detecção e quantificação em escala de nano a picogramas.

Esta revisão apresentada disponibiliza um instrumento de consulta para extrair ao máximo os metabólitos secundários da planta de interesse de estudo. Os vários métodos de extração apresentam vantagens e desvantagens, cabendo ao usuário analisá-los e optar por aquele que mais lhe convier, de acordo com a planta a ser estudada.

REFERÊNCIAS

- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- ARAÚJO, M. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). In: NUNES, P. *Knoow.net: enciclopédia temática*. [S. l.: s.n.], 14 jan. 2019. Disponível em: <http://bit.ly/32o7VMX>. Acesso em: 22 fev. 2019.
- BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. *Chromatographic methods*. 5. ed. London: Blackie Academic, 1996.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Ed. da Unicamp, 2006.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: Ed. da Unicamp, 1990.
- COSTA, C. L. *et al.* Caracterização físico-química de óleos fixos artesanais do coco babaçu (*orbignya phalerata*) de regiões ecológicas do estado do Maranhão, Brasil. *Pesquisa em Foco*, São Luís, MA, vol. 20, n. 1, p. 27-38, 2015. Disponível em: <http://bit.ly/2JE7cPj>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998. Disponível em: <http://bit.ly/2XJzoGT>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- GIANG, P. M.; OTSUKA, H. New Compounds and potential candidates for drug discovery from medicinal plants of Vietnam. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 493-505, 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2Y4c9dj>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <https://bit.ly/1J53V7i>. Acesso em: 19 jun. 2018.
- MARCONDERS, R. Cromatografia. In: INFOESCOLA: navegando e aprendendo. [S. l.: s.n.], 25 mar. 2011. Disponível em: <http://bit.ly/2LQWlnN>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- MAROYI, A. Traditional use of medicinal plants in south-central Zimbabwe: review and perspectives. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, New York, v. 9, n. 31, p. 1-18, 2011. Disponível em: <http://bit.ly/2xMbKNQ>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- MÜLLER, J.; HEINDL, A. Drying of medicinal plants. In: BOGERS, R. J.; CRAKER, L. E.; LANGE, D. (eds.). *Medicinal and aromatic plants: agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects*. New York: Springer, 2006. p. 237-252.
- MUNDO DOS ÓLEOS. Conheça quais são os métodos de extração de óleos essenciais. In: MUNDO dos óleos. Brasília, DF: [s.n.], 2 mar. 2017. Disponível em: <http://bit.ly/2XGKxqp>. Acesso em: 20 fev. 2019.

- OLIVEIRA, I. T.; ANJOS, W. Cromatografia em camada delgada (CCD). *In: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Cempecq*. Araraquara: Unesp, 28 jun. 2011. Disponível em: <http://bit.ly/2Y8Kh89>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- SANTOS, A. S. *et al.* Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Comunicado técnico*, Belém, PA, n. 99, p. 1-6, nov. 2004. Disponível em: <http://bit.ly/2LhUjxk>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- SALEHI, B. *et al.* Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 19, n. 5, p. 2-60, 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2S9E6uO>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos*. Santafé de Bogotá: Cytel, 2000.
- SILVA, C. M. *Estudo químico e biológico de Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh., Loranthaceae*. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: artmed, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001.
- SBFGNOSIA – SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. O que é farmacognosia? *In: SBFGNOSIA. Sociedade Brasileira de Farmacognosia*. Curitiba: SBFGnosia, 20 nov. 2009. Disponível em: <http://bit.ly/2xIIxUH>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- VIJAYAVENKATARAMAN, S.; INIYAN, S.; GOIC, R. A review of solar drying technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 2.652-2.670, 2012. Disponível em: <http://bit.ly/2JzuuHn>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- WOLDEAB, B. *et al.* Medicinal plants used for treatment of diarrhoeal related diseases in Ethiopia. *EvidenceBased Complementary and Alternative Medicine*, London, v. 2018, id 4630371, p. 1-20, 2018. Disponível em: <http://bit.ly/2Jux418>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- WRIGHT, C. W. Plant derived antimalarial agents: new leads and challenges. *Phytochemistry Reviews*, New York, v. 4, n. 1, p. 55-61, 2005. Disponível em: <http://bit.ly/2NPyiZ3>. Acesso em: 12 jul. 2019.

Financiamento:



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO
ECONÔMICO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA



PRÓ-SAÚDE