

MATERIAL PARA ESTUDO – AULAS PRÁTICAS DO LABORATÓRIO DE CIÊNCIAS

2º ANO – A,B e C

Professor: Herbert Arrais

Assuntos: Biossegurança, microscopia e vidrarias de laboratório.

BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIOS

O conceito de biossegurança teve início na década de 70, quando estudos identificaram que profissionais de laboratórios clínicos e da área da saúde apresentavam uma taxa maior de certas doenças que outros profissionais.

A biossegurança não está relacionada apenas aos modernos sistemas de esterilização do ar ou câmaras de desinfecção das roupas de segurança. Um profissional de saúde que não lava suas mãos com a frequência adequada ou descarta resíduos de maneira incorreta contribui para o surgimento de riscos de contaminação e de acidentes.

As práticas de biossegurança adotadas em laboratórios se baseiam na necessidade de proteger os colaboradores, o meio ambiente e a comunidade da exposição a agentes presentes nestes locais e que representam possíveis riscos. Por isso, os profissionais que atuam nessa área necessitam receber treinamento adequado e atualizações constantes sobre as técnicas que devem ser adotadas para manter o ambiente seguro.

Cada laboratório deve desenvolver ou adotar um manual de biossegurança ou de operações que identifique os riscos que podem ser encontrados e que especifique também as práticas e os procedimentos específicos para minimizar ou eliminar a exposição ao perigo.

A Legislação

No Brasil, a legislação de Biossegurança foi instituída pela lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, que criou a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Esta lei denomina os níveis de biossegurança em NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4. Eles estão relacionados às exigências de segurança na manipulação de agentes biológicos.

Alguns critérios são importantes para avaliação e definição do nível de biossegurança, como a virulência do agente, modo de transmissão, estabilidade no ambiente, concentração e volume trabalhados, origem do agente (humano, animal, localização geográfica, endemicidade e natureza do vetor), disponibilidade de medidas profiláticas e tratamento eficazes, dose infectante, manipulação do agente patogênico, vias de eliminação e fatores referentes ao trabalhador (como o estado imunológico).

Os equipamentos requeridos

Equipamentos de contenção para NB-1 (laboratórios que manipulam microrganismos que apresentam baixo risco individual e para a coletividade): Luvas, avental, uniforme ou jaleco com mangas compridas. Obrigatório uso de calçados fechados; óculos de segurança e protetores faciais devem ser utilizados sempre que necessário. O laboratório deve possuir dispositivo de emergência para lavagem de olhos, além de chuveiros de emergência localizados em pontos de fácil acesso.

Equipamentos de contenção para NB-2 (laboratórios que manipulam microrganismos que apresentam moderado risco individual e limitado risco para a comunidade): Além dos equipamentos de proteção individual indicados no nível 1, os profissionais devem fazer uso de luvas de látex descartáveis. Sempre que o procedimento puder gerar respingos provenientes de materiais biológicos, deverá ser utilizada proteção para o rosto (máscaras, protetor facial e óculos de proteção). A centrifugação, fora da cabine de segurança biológica (CSB), só poderá ser efetuada em centrífuga de segurança e com frascos lacrados, os quais só deverão ser abertos no interior da cabine. Uma autoclave deve estar disponível para que os materiais utilizados e resíduos gerados possam ser descontaminados.

Equipamentos de contenção para NB-3 (laboratórios que manipulam microrganismos que apresentam alto risco individual e moderado risco para a comunidade): É obrigatório o uso de roupas de proteção apropriadas, além de máscaras, gorros, luvas, sapatilhas, óculos de proteção ou protetores faciais. Devem ser utilizadas CSBs (classe II, B2 ou III) em quaisquer operações com agentes biológicos que incluam manipulação de culturas e de material clínico ou ambiental. Quando um procedimento ou um processo não puder ser conduzido dentro de uma CSB, devem ser utilizadas combinações apropriadas de EPIs, como respiradores e protetores faciais associados aos dispositivos de contenção física como as centrífugas de segurança e frascos selados. A autoclave, preferivelmente a de dupla porta, deve estar localizada no laboratório ou dentro da área de apoio da instalação de biocontenção.

Equipamentos de contenção para NB-4 (laboratórios que manipulam microrganismos que apresentam alto risco individual e alto risco para a comunidade): A manipulação de agentes biológicos da classe de risco 4 é efetuada em dois modelos de laboratório de contenção: laboratórios para manipulações conduzidas em CSB de classe III e laboratórios para manipulações conduzidas em CSB de classe II, B2; neste caso, realizadas em associação à roupa de proteção pessoal, peça única, ventilada, de pressão positiva, munida de um sistema de suporte à vida protegido por filtros Hepa. Esse sistema deve incluir compressores de respiração de ar, alarmes e tanques de ar de reforço de emergência.

No Brasil, a legislação básica sobre EPI e EPC é a Norma Regulamentadora nº 6 (Equipamento de proteção individual), aprovada pela Portaria GM nº 3.214, de 08 de junho de 1978.

A classificação dos riscos

Os riscos individuais e coletivos podem ser classificados em riscos químicos, físicos, biológicos, ergonômicos e de acidentes.

Físicos: caracterizados pelos ruídos, vibrações, radiações, umidade, temperatura, que podem ser gerados por máquinas, equipamentos e condições físicas, além de quedas, escorregões e exposição à material radioativo e a temperaturas altas ou baixas

Químicos: inerentes à manipulação de produtos químicos que podem penetrar no organismo pela via respiratória nas formas de poeira, fumaças, gases, vapores, ou que podem penetrar no organismo por contato e absorção através da pele ou ingestão das substâncias tóxicas.

Biológicos: ocorrem pela manipulação de seres vivos em laboratórios (bactérias, fungos, parasitos e vírus) que são capazes de desencadear doenças devido à contaminação.

Ergonômicos: derivados da posição inadequada de mesas, bancadas, cadeiras e movimentos repetitivos.

Acidentes: são todos os fatores que colocam em risco o trabalhador. Exemplo: máquinas e equipamentos sem proteção, possibilidade de incêndio e explosão, armazenamentos inadequados etc.

MICROSCOPIA

O microscópio é um instrumento utilizado para ampliar e observar estruturas pequenas dificilmente visíveis ou invisíveis a olho nú. O **microscópio óptico** utiliza luz visível e um sistema de lentes de vidro que ampliam a imagem das amostras.

Os primeiros microscópios ópticos datam de 1600, mas é incerto quem terá sido o autor do primeiro. A sua criação é atribuída a vários inventores: Zacharias Janssen, Galileio Galilei, entre outros. A popularização deste instrumento, no entanto, é atribuída a Anton van Leeuwenhoek

Os microscópios ópticos são constituídos por uma componente mecânica de suporte e de controlo da componente óptica que amplia as imagens. Os microscópios atuais que usam luz transmitida partilham os mesmo componentes básicos

1. Lentes oculares

2. Revólver

3. Lentes objetivas

4. Parafuso macrométrico

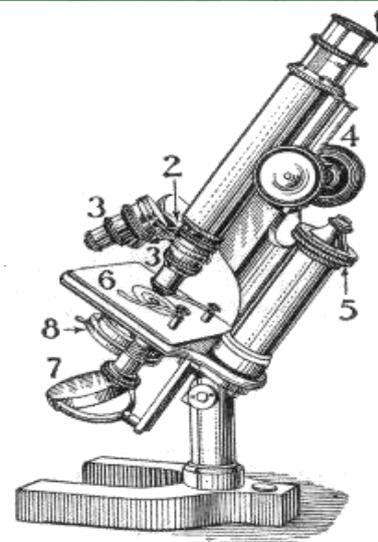
5. Parafuso micrométrico

6. Platina

7. Foco luminoso (Lâmpada ou espelho)

8. Condensador e diafragma

9. Braço



Componentes mecânicos

- **pé ou base** – apoio a todos os componentes do microscópio
- **braço** – fixo à base, serve de suporte às lentes e à platina
- **platina** – base de suporte e fixação da preparação, tem uma abertura central (sobre a qual é colocada a preparação) que deixa passar a luz. As pinças ajudam à fixação da preparação. A platina pode ser deslocada nos microscópios mais modernos, nos antigos tinha que se mover a própria amostra, segura pelas pinças.
- **revólver** – suporte das lentes objetivas, permite trocar a lente objetiva rodando sobre um eixo
- **tubo ou canhão** – suporta a ocular na extremidade superior
- **parafuso macrométrico** – permite movimentos verticais da grande amplitude da platina
- **parafuso micrométrico** – permite movimentos verticais lentos de pequena amplitude da platina para focagem precisa da imagem

Componentes ópticos

- **condensador** – sistema de duas lentes (ou mais) convergentes que orientam e distribuem a luz emitida de forma igual pelo campo de visão do microscópio
- **diafragma** – regula a quantidade de luz que atinge o campo de visão do microscópio, através de uma abertura que abre ou fecha em diâmetro (semelhante às máquinas fotográficas)
- **fonte luminosa** – atualmente utiliza-se luz artificial emitida por uma lâmpada incluída no próprio microscópio com um interruptor e algumas vezes com um reóstato que permite regular a intensidade da luz. Os modelos antigos tinham um espelho de duas faces: a face plana para refletir luz natural e a face côncava para refletir luz artificial.
- **lente ocular** – cilindro com duas ou mais lentes que permitem ampliar a imagem real fornecida pela objetiva, formando uma imagem virtual mais próxima dos olhos do observador. As oculares podem ser de diferentes ampliações sendo a mais comum de 10x. A imagem criada pela ocular é ampliada, direita e virtual.
- **lente objetiva** – conjunto de lentes fixas no revolver, que girando permite alterar a objetiva consoante a ampliação necessária. É a lente que fica mais próxima do objeto a observar, projetando uma imagem real, ampliada e invertida do mesmo. As **objetivas secas**, geralmente com ampliação de 10x, 40x e 50x, são assim designadas porque entre a sua extremidade e a preparação existe somente ar. As **objetivas de imersão** (ampliação até 100x), pelo contrário, têm a sua

extremidade mergulhada em óleo com o intuito de aumentar o poder de resolução da objetiva: como o índice de refração de óleo é semelhante ao do vidro o feixe de luz não é tão desviado para fora da objetiva.

Como funciona o microscópio óptico

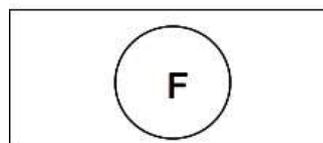
A intensidade da luz pode ser regulada diretamente através do reóstato que atua na própria fonte luminosa ou indiretamente através do condensador e do diafragma: a intensidade aumenta de se subir o condensador e abrir o diafragma e diminui se se descer o condensador e fechar o diafragma.

A ampliação – número de vezes que a imagem é aumentada em relação ao objeto real – é função conjunta do poder de ampliação da objetiva e ocular utilizadas. A ampliação total é o produto da ampliação da objetiva pela ampliação da ocular (exemplo, ampliação da ocular 10x, ampliação da objetiva 20x, ampliação total é $10 \times 20 = 200x$).

A imagem observada depende também do poder de resolução, isto é, a capacidade que as lentes têm de discriminar objetos muito próximos. O poder de resolução depende do comprimento de onda da luz utilizada, e o seu valor teórico para um microscópio óptico é de cerca de $0,2 \mu\text{m}$ – ou seja, dois objetos têm de estar pelo menos a uma distância um do outro de $0,2 \mu\text{m}$ para poderem ser discriminados ao microscópio óptico. Este valor, contudo, só é alcançável com lentes de elevada qualidade e preço!

A preparação é colocada na platina e fixa com o auxílio das pinças. Com os parafusos existentes na platina move-se a preparação até esta estar sobre a abertura por onde passa a luz. Olhando através da ocular (monocular ou binocular, respectivamente com uma ou duas lentes) e com a objetiva de menor ampliação foca-se a imagem, preferencialmente no centro do campo de visão, utilizando os parafusos macrométrico e micrométrico. Após esta primeira focagem, podem-se utilizar objetivas de maior poder de ampliação, de forma sequencial repetindo todo o processo já descrito. A imagem final observada será ampliada, virtual e invertida. Dependendo do microscópio, em alguns casos, a imagem final pode ser direita e não invertida.

Por exemplo, se utilizarmos uma preparação da letra F, tal como na figura, as imagens formadas pela objetiva e pela ocular são como descritas



Preparação da letra F

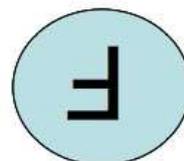


Imagem da objetiva:

- Ampliada
- Virtual
- Invertida

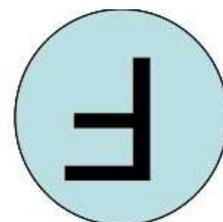


Imagem da ocular:

- Ampliada
- Real
- Invertida

Figura 1. Imagens obtidas por uma lente objetiva e ocular a partir de uma preparação com a letra F.