



ANNA CLARA CARNEIRO LIMA DAMASCENO

**DESENVOLVIMENTO DO MANUAL DE BOAS PRÁTICAS
DA COLEÇÃO DE CULTURA DE MICRORGANISMOS DO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

**LAVRAS – MG
2020**

ANNA CLARA CARNEIRO LIMA DAMASCENO

**DESENVOLVIMENTO DO MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DA COLEÇÃO DE
CULTURA DE MICRORGANISMOS DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

Monografia apresentada ao Departamento de
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do curso de
Engenharia de Alimentos, para a obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

ANNA CLARA CARNEIRO LIMA DAMASCENO

**DESENVOLVIMENTO DO MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DA COLEÇÃO DE
CULTURA DE MICRORGANISMOS DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

Monografia apresentada ao Departamento de
Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do curso de
Engenharia de Alimentos, para a obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

APROVADO em 20 de agosto de 2020
Prof. Dr. Luís Roberto Batista UFLA
Dra. Suzana Reis Evangelista UFLA
Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS – MG
2020**

À minha família por toda dedicação,
cuidado e amor. Por viverem comigo os
meus sonhos e serem fonte de coragem.
Com toda admiração e gratidão,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser fonte inesgotável de força e sabedoria e por permitir a conclusão desse ciclo.

Aos meus pais, Ingrid e Osman, por sempre priorizarem o meu estudo, por toda paciência, apoio e amor dedicados a mim. Por não medirem esforços para que este sonho de realizasse.

Aos meus irmãos, João Vitor e Pedro Henrique, por todo apoio e torcida pelo meu sucesso.

À minha avó, Maria Ildete, por estar sempre ao meu lado, por toda oração e por ser meu exemplo de fé e perseverança.

À minha tia, Ivana, por todo apoio e suporte. Seus conselhos foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui.

Ao meu esposo, Caio, que de forma especial me deu força e coragem, suportando a correria de cada semestre.

À minha filha, Alice, que é minha principal motivação para superar os desafios e me tornar uma pessoa melhor. Grata pela sua compreensão em minhas horas de ausência.

Aos meus amigos da graduação, pela cumplicidade, paciência e todos os momentos compartilhados.

Ao meu orientador, Professor Luís Roberto, por toda dedicação, ensinamento, comprometimento e atenção ao longo da graduação. Por acreditar no meu potencial desde o começo.

A todos os professores, colaboradores e auxiliares da Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos, por tanto contribuírem para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de Boas Práticas de Laboratório na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, por meio do desenvolvimento de um manual de boas práticas e segurança. Os materiais utilizados no desenvolvimento da pesquisa atendem aos requisitos de adequação em boas práticas aplicáveis a todos os Centros de Recursos Biológicos e ao domínio microrganismos. Utilizou-se como referência, estudos com publicações após o ano 2000, que abordam as Boas Práticas no título ou resumo. Portanto, com o intuito de adequar, tanto o material biológico quanto os dados a ele relacionado, foi elaborado um manual reunindo os pontos de maior relevância envolvendo boas práticas de qualidade e segurança. Através da pesquisa, foi possível perceber o quanto as legislações tratam minuciosamente cada ponto dentro do laboratório, e garante a qualidade, desde que aplicadas de forma correta. É possível basear-se na legislação para realização de praticamente todos os processos que envolvem a coleção de cultura, o que garante uma agilidade de processamento e uma padronização.

Palavras-chave: **Boas Práticas de Laboratório. Manutenção de microrganismos. Métodos de preservação. Biossegurança.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1. Coleções de Cultura de Microrganismos	11
2.2 Centro de Recursos Biológicos.....	14
2.3 Boas Práticas e Segurança em Laboratório	15
2.4 Métodos de Preservação	21
2.4.1. Métodos de Preservação a curto prazo.....	22
2.4.1.1. Repicagem contínua ou periódica	22
2.4.2. Métodos de Preservação a médio prazo.....	24
2.4.2.1. Preservação em óleo mineral	24
2.4.2.2. Preservação em água esterilizada.....	25
2.4.2.3. Congelamento comum.....	26
2.4.2.4. Métodos de preservação por secagem.....	26
2.4.3. Métodos de Preservação a longo prazo.....	27
2.4.3.1. Liofilização.....	27
2.4.3.2. Criopreservação	28
2.4.3.2.1. Congelamento em ultrafreezer	29
2.4.3.2.2. Congelamento em nitrogênio líquido	30
2.5. Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos	30
2.5.1. Histórico	30
2.5.2. Funções da CCDCA/UFLA.....	33
2.5.3. Avaliação de risco dos microrganismos presentes na coleção de cultura.....	34
2.5.4. Métodos utilizados para identificação dos fungos filamentosos da CCDCA	35
2.5.4.1. Avaliação das características macroscópicas	35
2.5.4.2. Avaliação das características microscópicas.....	35
2.5.5. Métodos de preservação de microrganismos utilizados na CCDCA	36
3 METODOLOGIA	38

SUMÁRIO

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE A – Manual de Boas Práticas e Segurança da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos.....	49

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, microrganismos e materiais biológicos foram preservados e distribuídos pela coleta de culturas microbianas, bancos de sementes e bancos de tecidos de células humanas e animais (VAZOLLER & CANHOS, 2005). A coleta biológica é uma das ferramentas mais importantes para obter informações sobre a composição e distribuição da biodiversidade em um determinado ambiente. Essas informações são indispensáveis para o desenvolvimento de pesquisas científicas, modelagem ambiental, apoio às decisões do governo no planejamento territorial, definição de estratégias de proteção e uso da base de recursos do país.

Para padronizar a informatização do registro, monitoramento e exploração dos elementos da biodiversidade no processo biotecnológico, surgiu o conceito de Centro de Recursos Biológicos (CRBs). A norma NIT-DICLA-061 (2020) define o Centro de Recursos Biológicos (CRB) como uma parte importante da infraestrutura de suporte à biotecnologia. Eles incluem prestadores de serviços e bancos de dados de células vivas, genomas biológicos e informações relacionadas à genética e funções do sistema biológico. Os CRBs contêm organismos cultiváveis (por exemplo, microrganismos, plantas, animais e células humanas); partes replicáveis desses organismos (por exemplo, genomas, plasmídeos, vírus, cDNA), células e tecidos de organismos viáveis, mas ainda não cultiváveis, e um banco de dados contendo informações moleculares, fisiológicas e estruturais relacionadas a essas coleções e bioinformática associada.

As principais funções dos CRBs são: resguardar e fornecer recursos biológicos (garantia de qualidade) para pesquisa e desenvolvimento e aplicações nos departamentos de ciência, indústria, agronegócio, meio ambiente e saúde; conduzir pesquisa e desenvolvimento dos recursos biológicos mantidos e proteger recursos biológicos. No entanto, para se tornar um CRB, a coleção deve atender aos padrões de certificação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e de outras instituições (PNCQ, 2015).

Para atender aos requisitos das instituições responsáveis pela criação dos CRBs, é necessário implementar um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ). O SGQ garante a padronização do processo, a minimização de erros e a geração de resultados confiáveis (CARVALHO, 2012).

O sistema de qualidade ao ser implementado em laboratório, proporciona a

obtenção de dados corretos, promove a confiabilidade do relatório publicado, a credibilidade e o respeito da comunidade científica são aprimorados, erros e retrabalhos são evitados e a rastreabilidade é promovida (CAMPOS, 2004).

Como sistema de qualidade, podemos destacar as Boas Práticas de Laboratório (BPL) que consiste em um conjunto de padrões relacionados à organização e condições de pesquisa de laboratório que podem ser planejados, conduzidos, monitorados, registrados, relatados e arquivados (INMETRO, 2019).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo elaborar uma proposta para a implementação de um sistema de Boas Práticas de Laboratório com enfoque na coleção de cultura de microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), através da criação de um Manual de Boas Práticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Coleções de Cultura de Microrganismos

Através da necessidade do estabelecimento de depósitos de biomateriais e o desenvolvimento de suas tecnologias de preservação e manutenção, além do crescente interesse na pesquisa em ciências da vida, especialmente devido ao enorme potencial biotecnológico que pode ser obtido a partir de biomateriais, surgem as Coleções de Culturas. A disponibilidade e a qualidade dos materiais biológicos desempenham um papel decisivo na qualidade da pesquisa (HALLUIN, 1996).

A primeira coleção de cultura foi definida para coletar, preservar e distribuir microrganismos pelo Dr. Frantisek Kral (1846-1911) no ano de 1890 em Praga, República Tcheca. Essa coleção de cultura, inicialmente, foi destinada ao ensino de bacteriologia clínica. Primeiro, ele preparou uma exposição de culturas como em um museu, então ele percebeu a importância de fornecer aos cientistas culturas biológicas. Após esse acontecimento, muitas coleções de cultura foram estabelecidas em todo o mundo, como o *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) na Holanda em 1904, a *American Typical Culture Collection* (ATCC) nos Estados Unidos em 1925 e o *Institute for Fermentation* (atualmente, NBRC) no Japão em 1944 (SUZUKI, 2017).

No Brasil por muito tempo ao desejar trabalhar com culturas puras era necessário à compra de culturas biológicas de países estrangeiros. Além de exigir mais tempo para iniciar a pesquisa, essa prática normalmente não era eficaz por deparar com culturas que não eram compatíveis ao nosso ecossistema. Como alternativa para essas dificuldades e para suprir as demandas de pesquisa e ensino do país, deu-se origem às coleções de culturas existentes no Brasil.

Atualmente, o Brasil segue em evidência no cenário mundial, pela evolução das coleções de cultura brasileiras quando comparado a outros países com mesmo desenvolvimento. É possível citar instituições brasileiras com coleções de cultura de referência que vêm continuamente avançando em pesquisa, como a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello (FAT),

dentre outras.

Para garantir a conformidade com os regulamentos relativos à coleta biológica, transporte e armazenamento desses materiais, é imprescindível seguir a legislação que vigora sobre essas atividades, como as Instruções Normativas (IN) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), além da Lei do Acesso ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Lei da Biodiversidade) (FIOCRUZ, 2020).

Com o intuito de evitar a biopirataria e garantir que os benefícios do uso da biodiversidade fossem compartilhados de maneira justa e equitativa, o Brasil foi um dos países pioneiros a implementar leis sobre acesso ao patrimônio genético, conhecimento tradicional associado e compartilhamento de benefícios, de acordo com a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB): MP 2186-16, 2001. Apesar dos impactos positivos em relação à proteção das informações, a lei possuía regras de difícil entendimento pela comunidade civil e científica, além de métodos burocráticos que influenciou negativamente na cooperação internacional e transformou-se em obstáculo para pesquisa e desenvolvimento (P&D) do país.

Tendo em vista as dificuldades encontradas na primeira legislação brasileira sobre o tema e buscando estabelecer um ambiente pacífico e legalmente seguro para estimular a inovação através da pesquisa e desenvolvimento tecnológico, no ano de 2015 entra em vigor a Lei nº 13.123 (Lei da Biodiversidade).

[...] Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências (BRASIL, 2015).

Depois que a nova legislação entrou em vigor, pode-se perceber um avanço em relação aos pontos críticos da Medida Provisória anterior. A Lei 13.123/2015 extingue a obrigatoriedade de permissão prévia para realizar pesquisas sobre patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, sendo necessário apenas o registro eletrônico das atividades de acesso por meio de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético - SISGen. Já os requisitos legais para a exploração econômica de produtos acabados ou materiais reprodutivos proveniente do acesso ao patrimônio genético ou a conhecimento tradicional associado, devem ser previamente submetidos ao

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) sob forma de notificação, antes do desenvolvimento econômico do produto acabado ou do material reprodutivo decorrente da aquisição do patrimônio genético nacional e da aquisição de conhecimento tradicional relacionado. Em outras palavras, a participação nos benefícios ocorre apenas quando esses produtos são lançados.

Outra mudança considerável da nova legislação foi à alteração da composição de membros do CGEN, incluindo participantes da sociedade civil, dando-lhes o direito a voz e voto.

Art. 6º Fica criado no âmbito do Ministério do Meio Ambiente o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - CGen, órgão colegiado de caráter deliberativo, normativo, consultivo e recursal, responsável por coordenar a elaboração e a implementação de políticas para a gestão do acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado e da repartição de benefícios, formado por representação de órgãos e entidades da administração pública federal que detêm competência sobre as diversas ações de que trata esta Lei com participação máxima de 60% (sessenta por cento) e a representação da sociedade civil em no mínimo 40% (quarenta por cento) dos membros, assegurada a paridade entre: I - setor empresarial; II - setor acadêmico; e III - populações indígenas, comunidades tradicionais e agricultores tradicionais (BRASIL, 2015).

Adicionalmente a Lei 13.123/2015, é indispensável seguir os regulamentos sobre atividades de coleta biológica presentes nas Instruções Normativas relacionadas ao tema. Alguns regulamentos podem ser enfatizados na legislação, como a IN nº 141/2006/IBAMA, IN nº 146/2007/IBAMA, IN nº 160/2007/IBAMA e IN nº 03/2014/ICMBio (FIOCRUZ, 2020).

A IN nº 141/2006/IBAMA regulamenta o controle e manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. A IN nº 146/2007/IBAMA visa estabelecer padrões e padronizar procedimentos relacionados à fauna no campo das licenças ambientais para empresas e atividades que afetam a vida selvagem. Além de determinar em seu artigo 4º, parágrafo VI, que cada investigação da fauna deve incluir informações sobre o destino pretendido para o material biológico a ser coletado, com a permissão da instituição de armazenamento do material.

A IN nº 160/2007/IBAMA, institui o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO) e disciplina o transporte e a troca de materiais biológicos consignados às coleções. A IN nº 03/2014/ICMBio, estabelece padrões para a utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) e

regulamenta a disponibilidade de dados e informações recebidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

2.2 Centro de Recursos Biológicos

Recursos biológicos - organismos, células, genes e informações relacionadas - são matérias-primas importantes para a tecnologia, saúde humana e pesquisa. A revolução na biologia molecular proporcionou maior capacidade de adquirir e modificar esses recursos biológicos e usá-los para o benefício de toda a humanidade. Garantir acesso e manutenção de recursos biológicos requer investimento financeiro substancial. Para não perder esses investimentos, o acesso aos dados de resultados dessas pesquisas deve estar sempre disponível e direcionado aos interesses científicos, econômicos e médicos (OECD, 2007).

Nesse contexto, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) lançou o conceito de Centro de Recursos Biológicos (CRBs) em 2001 para fornecer os padrões de qualidade e materiais biológicos necessários aos cientistas e à indústria internacional para fornecer informações e garantir a sobrevivência dessas coleções. Em resposta ao desenvolvimento de muitos campos, da biologia molecular à bioinformática, muitas coleções de serviços evoluíram para o CRBs. Nos últimos anos, as pessoas reconheceram a importância da cooperação internacional entre vários CRBs, cujo objetivo é agregar valor à coleção, incluindo materiais, serviços, conhecimentos e habilidades, para garantir sua auto sustentabilidade (CARVALHO, 2012).

Embora os CRBs tenham múltiplas funções e assumam diversas formas, o desenvolvimento, expansão e sobrevivência desses centros enfrentam muitos desafios. Isso inclui a revolução molecular (informações reveladas pela genômica e sequenciamento de DNA), os esforços para proteger a biodiversidade, o financiamento da incerteza que ameaça a estabilidade, a necessidade de garantia de qualidade apropriada e as consequências das restrições de acesso. Proteger o investimento da empresa privada e o sigilo industrial, regulamentos de importação e exportação, direitos de propriedade intelectual, questões de segurança e questões éticas relacionadas ao uso de genes e outros recursos biológicos, transcendendo assim as fronteiras internacionais (OECD, 2007).

Para estabelecer boas práticas em relação ao acesso, manutenção e fornecimento de materiais biológicos, além de gerenciamento para centros de

recursos biológicos, a OCDE emitiu um documento de orientação intitulado "Diretrizes da OCDE para Boas Práticas em Centros de Recursos Biológicos". Posteriormente, promoveu a auto avaliação das coleções de culturas e divulgou um conjunto de três documentos contendo listas com base nessas diretrizes (OCDE, 2009a, b, c).

Para alcançar a excelência na tecnologia e nos serviços prestados, as coleções de cultura dos CRBs deve atender a uma série de normas nacionais e internacionais, entre as quais a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 se destaca como requisito geral para a competência de laboratórios de ensaio e calibração (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017); as Diretrizes da OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 2007); NIT-DICLA-061 Requisitos sobre a Acreditação dos Laboratórios de Ensaio e dos Produtores de Materiais de Referência dos Centros de Recursos Biológicos (INMETRO, 2020); e ABNT NBR ISO 17034:2017 – especifica os requisitos gerais para a competência e a operação consistente de produtores de material de referência (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017).

2.3 Boas Práticas e Segurança em Laboratório

Os princípios de Boas Práticas de Laboratório compõe um sistema de qualidade que abrange processos e condições organizacionais sob os quais os estudos não clínicos sobre saúde humana e segurança ambiental são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados. Eles consistem em testes normalmente exigidos pelas agências reguladoras, projetados para avaliar e registrar produtos (por exemplo, pesticidas, seus ingredientes etc.), produtos farmacêuticos, cosméticos, conservantes de madeira, aditivos para alimentos e rações, produtos veterinários, desinfetantes, produtos químicos com aplicação industrial e organismos geneticamente modificados (DOQ-CGCRE-023, 2019).

O principal objetivo da implementação e consolidação do sistema de qualidade e Boas Práticas de Laboratório (BPL) é garantir excelentes resultados técnicos e manter a competitividade do departamento em geração de tecnologia e prestação de serviços, além de buscar reconhecimento por seus laboratórios, seguindo o estabelecido na legislação vigente e nas "Diretrizes de Boas Práticas da

OCDE para Centros de Recursos Biológicos".

Em 2007 a OCDE publicou um relatório, após ampla consulta à comunidade científica, detalhando uma série de melhores práticas para CRB. Essas práticas recomendadas visam gerenciar a qualidade das coleções e fornecer orientações para aqueles que procuram melhorar o nível de qualidade associado à total conformidade com essas práticas (OECD, 2020).

O relatório possui recomendações gerais aplicáveis a todos os CRBs, sendo eles: "Diretrizes de Boas Práticas Gerais para todos os CRBs" e "Diretrizes de Boas Práticas em Bioproteção para CRBs". Existem ainda, conjuntos de diretrizes de boas práticas adicionais para os CRBs, que mantêm e fornecem materiais biológicos em domínios específicos, estes são "Diretrizes de Boas Práticas para o Domínio Microrganismo" e "Diretrizes de Boas Práticas para Material Derivado de Humano" (OECD, 2007).

A Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre), como Autoridade Brasileira de Monitoramento da Conformidade aos Princípios das Boas Práticas de Laboratório, baseou-se em publicações de documentos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para estabelecer padrões, documentos normativos e orientativos para verificar a conformidade de instalações de teste aos princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL) (NIT-DICLA-035, 2019).

Os principais documentos normativos que são utilizados no processo de verificação da conformidade de instalações teste aos princípios de BPL são: NIT-DICLA-035 Princípios de Boas Práticas de Laboratório - BPL; NIT-DICLA-034 Aplicação dos Princípios de BPL aos Estudos de Campo; NIT-DICLA-036 Papel e Responsabilidade do Diretor de Estudo em Estudos BPL; NIT-DICLA-037 Aplicação dos Princípios de BPL a Estudos de Curta Duração; NIT-DICLA-038 A Aplicação dos Princípios BPL aos Sistemas Informatizados; NIT-DICLA-039 O Papel e Responsabilidade do Patrocinador na Aplicação dos Princípios BPL; NIT-DICLA-040 Fornecedores e BPL; NIT-DICLA-041 Garantia da Qualidade e BPL; NIT-DICLA-043 Aplicação dos Princípios de BPL a Organização e ao Gerenciamento de Estudos em Múltiplas Localidades (Multi-Site); NIT-DICLA-071 Princípios das BPL e Estudo in Vitro; NIT-DICLA-072 Estabelecimento e Controle de Arquivos que Operam em Conformidade com os Princípios das BPL (DOQ-CGCRE-023, 2019).

A norma NIT-DICLA-035 trata-se da versão brasileira da publicação Número 01 – Princípios da OCDE sobre Boas Práticas de Laboratório (revisado em 1997) –

Paris 1998. Essa norma é a mais amplamente utilizada em laboratórios e estabelece as suas diretrizes considerando às necessidades das organizações de acordo com cada estudo em específico.

De acordo com essa mesma norma, para cada estudo será necessário à elaboração de um Plano de Estudo, que deve preceder ao início do experimento. O Plano de Estudo deverá conter as informações referentes à identificação do Estudo (título descritivo, além da declaração da natureza e propósito do estudo), identificação da Substância Teste e Substância de Referência a ser utilizada. Além disso, devem constar informações referentes ao Patrocinador, Diretor de Estudo, Pesquisador(es) Principal(is) e à Unidade Operacional. A Data de Aprovação do plano de estudo por assinatura dos responsáveis, Datas Propostas para início e término do experimento, e os Métodos de Testes são indispensáveis na construção do Plano de Estudo.

A norma NIT-DICLA-035 detalha a responsabilidade de cada personagem envolvido no estudo (Gerência da Instalação de Teste, Diretor de Estudo, Pesquisador Principal e Pessoal do Estudo), as exigências e responsabilidades do pessoal da Garantia da Qualidade, os requisitos das Instalações, Equipamentos, Materiais e Reagentes, as condições necessárias para Sistema Teste, Substância Teste e Substância de Referência, Procedimentos Operacionais Padrão, Execução do Estudo, conteúdo do Relatório de resultados do estudo e Armazenamento e Retenção de Registro e Materiais.

O atendimento aos requisitos básicos de qualidade dos usuários promove o intercâmbio de materiais biológicos autênticos com características originais reproduzíveis e acesso aos dados de recursos biológicos em âmbito mundial. Essa rede de conhecimento construída através da cooperação mútua entre CRBs propicia avanços na pesquisa e desenvolvimento em todos os campos da medicina básica, ciências biomédicas e biotecnologias aplicadas (EMBRIC, 2015).

Apesar dos consideráveis benefícios à humanidade nos mais diversos setores, conquistados através do conhecimento avançado sobre os sistemas biológicos, alguns microrganismos patogênicos podem ser usados como ameaça à população, seja afetando o status social, econômico e/ou político. Conseqüentemente, regulamentações de bioproteção (do inglês biosecurity), estão em uso em todo o mundo, o que restringe o acesso não autorizado a esses componentes disponíveis em laboratórios biológicos (SILVA, 2012).

Objetivando maior controle no suprimento de microrganismos perigosos, é necessário adotar medidas de biossegurança definidas para CRBs. O conceito de biossegurança é fragmentado em dois aspectos, a saber, biossegurança (*biosafety*) e bioproteção (*biosecurity*). *Biosafety* refere-se a mecanismos de prevenção da disseminação de agentes biológicos potencialmente infecciosos e toxinas para população e meio ambiente. *Biosecurity* está relacionado à proteção dos agentes biológicos, toxinas e suas informações para impedir seu uso ilícito (LIMA, 2007).

As Diretrizes de Boas Práticas em Bioproteção para CRBs (OECD, 2007) tem como objetivo orientar os CRBs a alcançar o equilíbrio entre o desenvolvimento da pesquisa e a segurança do material biológico e suas informações. Essas diretrizes devem ser implementadas juntamente com as diretrizes gerais e boas práticas aplicáveis ao domínio dos microrganismos.

Essas diretrizes propõem uma estrutura de avaliação de risco de matérias mantidos dentro de um CRB, bem como uma estrutura que define boas práticas para gestão de tal risco. Para a avaliação de riscos de bioproteção do material biológico é conveniente que os CRBs garantam que exista um inventário detalhado dos diferentes materiais biológicos que mantêm, com a finalidade de atribuir a tais materiais os níveis de risco de bioproteção, os quais podem ser designados como alto, moderado, baixo ou desprezível.

O nível de risco de bioproteção do material biológico é determinado em função do seu potencial de uso indevido doloso e sua virulência.

As Diretrizes de Boas Práticas em Bioproteção para CRBs (OECD, 2007) determina que o potencial de uso indevido doloso do material biológico seja baseado em fatores chaves, como:

- a) Disponibilidade: o número de instalações que estocam o material biológico e sua distribuição geográfica;
- b) Amplificação: a facilidade com a qual o material biológico pode ser replicado;
- c) Habilidades e conhecimento: a ubiquidade ou raridade de habilidade e conhecimentos necessários para amplificar e/ou modificar geneticamente o material biológico;
- d) Dispersão: a facilidade e a efetividade com que o material biológico pode ser disperso, seja pelo ar, água, alimentos ou por outros meios para o ambiente;
- e) Viabilidade ambiental: a robustez do material biológico através de intervalos de temperaturas, níveis de umidade, exposição à luz;

- f) Contramedidas: a existência e a facilidade de acesso às profilaxias, tratamentos pós-exposição, e detecção e medidas de descontaminação;
- g) Consequências econômicas: a extensão em que o material biológico pode ser usado para causar prejuízos econômicos aos humanos, culturas agrícolas, rebanhos ou infraestrutura.

A virulência deve ser avaliada com base nos seguintes fatores:

- a) Dose de infecção: a menor quantidade de material biológico necessário para causar infecção;
- b) Patogenicidade: a capacidade do material biológico de causar doenças;
- c) Letalidade: a capacidade do material biológico em causar a morte do hospedeiro;
- d) Transmissibilidade: a facilidade com que o material biológico pode disseminar-se tanto do vetor para o hospedeiro, como de um hospedeiro para outro.

É adequado que sempre quando houver novas aquisições de material biológico, o CRB remetente envie um resumo da avaliação de risco do material biológico disponibilizado para o CRB destinatário. Uma nova avaliação de risco só será necessária se houver novas circunstâncias ou informações que afetem a avaliação original.

As práticas de gestão de risco em biotroteção (OECD, 2007) serão desenvolvidas de acordo com a avaliação de risco do material biológico e deverão ser aplicadas em todos os momentos, incluindo recepção, armazenamento, utilização, transferência e descarte de materiais.

As instalações físicas para condução das atividades com o material biológico deverá ter o nível de contenção correspondente ao nível de risco de bioproteção, sendo necessária área de segurança geral para nível de risco desprezível ou baixo, área restrita para nível de risco moderado e área de alta segurança para nível de risco alto.

Como forma de controlar o acesso às áreas de segurança e garantir a proteção dos materiais biológicos, é recomendado que todos os membros da equipe de um CRB recebam um item de identificação, de preferência com uma fotografia de seu titular e informações quanto ao seu nível de acesso.

Além da gestão de segurança da equipe do CRB, é importante definir um sistema de controle de segurança para visitantes que inclua uma lista do perfil de visitantes que tem permissão para entrar em suas instalações e a exigência de estar

acompanhado ou não. É conveniente que os visitantes transitem as instalações com item de identificação de acordo com o nível de risco de bioproteção a que eles tenham acesso.

As boas práticas em bioproteção (OECD, 2007) também recomenda a elaboração de um Plano de Respostas a Incidentes, que estabeleça o protocolo a ser seguido pela equipe do CRB para registro, relato e investigação de violações de segurança. É imprescindível que todos os membros, incluindo pessoal não técnico, estejam completamente informados e treinados sobre as ações do plano.

A respeito do controle do material biológico, convém que os CRBs estabeleçam um sistema de controle e responsabilidade pelo material, que inclua conduzir e manter inventários dos materiais biológicos em seus acervos e identificar indivíduos que tenham acesso ou custódia do material biológico a qualquer momento.

Os CRBs podem aceitar solicitações de instituições que visem a aquisição, utilização e manutenção de material biológico que apresentem um risco baixo ou desprezível, sujeito a legislação nacional. Para material biológico que apresente risco de bioproteção moderado ou alto deve-se assegurar que as instituições estejam em prática com as medidas de bioproteção adequadas para lidar com esses materiais antes do envio.

Para garantir que o uso das informações relacionadas ao material biológico, não seja usado para fins malévolos, é necessário realizar uma avaliação de risco da informação. Através dessa avaliação é possível definir quais informações apresentam risco de bioproteção e tomar a sequência de medidas necessárias para proteger as informações plausíveis de serem utilizadas para facilitar o roubo de material de risco de bioproteção moderado ou alto. A questão chave na condução da avaliação de risco da informação é se ao possuir a informação isso permitiria ao seu detentor comprometer gravemente a saúde de humanos, culturas agrícolas, rebanhos ou infraestrutura.

A norma NIT-DICLA-061 (2020), tendo como referência as “Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos”, também aborda os princípios de bioproteção para CRBs, sendo avaliação de risco, segurança física, gestão de segurança de pessoal, gestão de segurança de visitantes, controle do material biológico, fornecimento do material biológico, segurança de transporte interno e externo, segurança da informação e plano de resposta a incidentes.

Apesar de biossegurança (*biosafety*) e bioproteção (*biosecurity*) evidenciarem riscos diferentes, eles compartilham um objetivo em comum que é garantir a segurança do material biológico em seu local de armazenamento e manipulação. A implementação de boas práticas de biossegurança contempla algumas exigências de bioproteção. Ao aplicar práticas para prevenir o risco de exposição acidental a agentes patogênicos e toxinas, é possível minimizar perda, roubo ou uso indevido desses microrganismos (SILVA, 2012).

Acesso restrito, separação física das áreas de circulação e plano de resposta à emergência são recomendações de biossegurança (*biosafety*) estabelecidas para trabalhos com microrganismos classificados como nível de risco 3 e que são também medidas de bioproteção (*biosecurity*) (SILVA, 2012).

Por fim, é necessário que a bioproteção seja estrutura sobre uma fundação sólida de biossegurança. É imprescindível que uma forte cultura de segurança seja instalada e seguida por toda a equipe, técnica ou não técnica, do CRB (SILVA, 2012).

2.4 Métodos de Preservação

A conservação de culturas biológicas e suas características são imprescindíveis para o desenvolvimento biotecnológico e científico. Como forma de manter inalteradas as características dos microrganismos ao longo do tempo, existe técnicas de preservação a curto, médio e longo prazo (SOLA et al., 2012).

O objetivo principal da preservação de microrganismos é manter o material biológico em seu estado original, garantindo sua viabilidade, pelo maior tempo possível. A escolha da técnica de preservação deve ser baseada nas características específicas da linhagem, importância do microrganismo para o acervo, custo para execução e manutenção do método e disponibilidade de pessoal e equipamentos (ABREU & TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Os métodos utilizados para preservação e manutenção devem garantir: alta viabilidade/recuperação da cultura preservada; ausência de contaminantes na cultura preservada (isto não inclui qualquer co-cultura reconhecida, p.ex. microrganismos simbióticos que não são considerados como contaminantes enquanto os constituintes estejam corretamente especificados e verificados por meio de análise morfológica e molecular, conforme o caso) e autenticidade da cultura preservada e integridade do genoma (análises fenotípica e molecular), quando aplicável (NIT-

DICLA-061, 2020, p.11).

A OECD (2007), através da publicação do documento “Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos”, recomenda que o CRB escolha a técnica de preservação e manutenção seguindo as orientações do depositante ou através da experiência adquirida pelo próprio centro e documente todos os procedimentos para garantir sua reprodutibilidade e o registro e monitoramento dos principais parâmetros.

Outra recomendação descrita no documento é que o material biológico seja conservado por, no mínimo, dois métodos distintos e sob a forma de estoques mestres de células e de estoques destinados à distribuição. Quando houver impossibilidade de utilizar dois métodos distintos na preservação do microrganismo, constitui boa prática manter estoques criopreservados em locais diferentes.

O rótulo de identificação do material biológico deve incluir data ou número do lote, número de acesso no CRB, data de validade (sempre que possível) e destaque para o risco do material biológico quando necessário.

Ainda de acordo com as boas práticas estabelecidas pela OECD (2007), o armazenamento do material biológico preservado deve ser feito sob condições ambientais capaz de garantir a estabilidade das propriedades do microrganismo. Além disso, é necessário documentar os detalhes do controle de inventário, prazos de entrega e práticas de re-estocagem e manter uma coleção em duplicata, em local distinto, para garantir a segurança das informações e microrganismos em caso de perda acidental da coleção principal.

Quando se deseja escolher um método de preservação adequado para conservar o material biológico, é necessário considerar que não existe uma fórmula padrão para isso, considerando que a preservação deve assegurar a viabilidade, a ausência de contaminantes e imutabilidade das células microbianas (DELLARETTI, 2014). A seleção da técnica a ser utilizada para conservação do material biológico deve ser orientada pelas particularidades da estirpe, bem como vantagens e desvantagens dos métodos disponíveis (QUINN et al., 2005).

2.4.1. Métodos de Preservação a curto prazo

2.4.1.1. Repicagem contínua ou periódica

A repicagem contínua, repicagem periódica ou subcultivo é um dos processos mais antigos e tradicionais de preservação e seu uso é justificado pela facilidade de

aplicação, baixo custo e por não requerer um arsenal sofisticado de equipamentos (ROMEIRO, 2006). A técnica envolve a transferência de fragmentos da cultura microbiana para outro meio de cultivo compatível, com incubação em ambiente que propicie à multiplicação do microrganismo e, após sua multiplicação, estocagem das culturas em baixas temperaturas (5 a 8°C) com o objetivo de reduzir sua atividade metabólica e aumentar os intervalos de repique da cultura (GREEN, 2008; SOLA et al., 2012).

O processo de transferência de fragmentos da cultura microbiana para outro meio de cultivo, deve ser repetido obedecendo ao intervalo de tempo que atenda as particularidades de cada microrganismo, avaliando as melhores condições e prazos para preservar suas características. É importante atentar-se para que o repique ocorra antes que o meio de cultivo seja completamente consumido pelo microrganismo ou desidrate (ROMEIRO, 2006).

MURRAY (2003) orienta que os microrganismos isolados sejam armazenados em tubos de ensaio vedados com tampas de rosca ou selados com parafina, em um ambiente protegido da luz e mantidos em temperatura de 5 a 8°C, afim de retardar a desidratação do meio de cultura. De acordo com ALFENAS & MAFIA (2007), é preferível utilizar tubos de ensaio para armazenamento dos microrganismos pela facilidade no transporte e por ter superfície exposta menor quando comparado a placa de Petri, portanto, apresenta menor risco de contaminação.

Para a escolha desse método de conservação é preciso atentar-se a dois parâmetros importantes, sendo eles: a composição do meio de cultura e a idade das culturas. A composição nutricional do meio de cultura está intimamente relacionada à resistência celular, sendo assim para manutenção de fungos, os meios de cultura devem ser pobres em concentração de açúcares fermentadores, buscando adequar o crescimento micelial e evitar alterações morfológicas, da mesma maneira que se recomenda utilizar esporos durante o processo de repicagem pela tendência em preservar as características genéticas originais (PEREIRA et al., 2008; COSTA et al., 2009; PASSADOR et al., 2010). O outro aspecto relevante na utilização do método repique contínuo, é que, da perspectiva morfológica e genética, culturas antigas tendem a produzir culturas descendentes alteradas (GIRÃO et al., 2004; GREEN, 2008).

O método em questão traz como vantagens a simplicidade e o baixo custo de operação por não exigir equipamentos sofisticados e não requerer reativação dos

microrganismos o que evita o estresse e injúria celular, além de possibilitar a viabilidade das células no período de 5 a 12 meses para bactérias e de 1 a 3 meses para leveduras (ALFENAS; MAFIA, 2007). Contudo, por ser um método de manipulação contínua da cultura apresenta maior risco de contaminação, perda de características genéticas causada por mutações devido à intensa proliferação celular, necessidade de maior espaço físico para armazenamento da cultura e a necessidade de adaptar os intervalos de repiques para cada microrganismo armazenado (GIRÃO et al., 2004; ROMEIRO, 2006).

2.4.2. Métodos de Preservação a médio prazo

2.4.2.1. Preservação em óleo mineral

O princípio desse método baseia-se em limitar a quantidade de oxigênio disponível para o microrganismo através da adição de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre a cultura, retardando o metabolismo e, conseqüentemente a multiplicação do microrganismo (ROMEIRO, 2006).

É recomendado o cultivo de microrganismos em meio inclinado, utilizando como referência o ponto mais alto do tubo de ensaio, para adicionar o óleo mineral esterilizado, certificando-se que todo o meio esteja coberto (ROMEIRO, 2006). Camadas de óleo mineral superiores a 1 cm, não devem ser utilizadas por possibilitar a perda da viabilidade dos microrganismos em condições de esgotamento total de oxigênio (ROMEIRO, 2006; ALFENAS & MAFIA, 2007).

A escolha dos óleos utilizados nessa técnica deve atender aos requisitos de qualidade, pureza, alta viscosidade e apresentar densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à temperatura de 20°C, além de não conter produtos tóxicos, sendo a parafina e a vaselina os mais difundidos (BARKER, 2002; ROMEIRO, 2006). Outro ponto de atenção diz respeito ao processo de esterilização dos óleos utilizados. Nesse processo, é importante evitar a produção de umidade, minimizando os riscos de contaminação e aumentando o controle de temperatura, uma vez que a sua elevação pode resultar na criação de produtos tóxicos aos microrganismos (ROMEIRO, 2006). CEFAR (2006) recomenda que a técnica mais adequada para esse tipo de esterilização seja aquecimento por meio de forno à temperatura de 170°C por uma a duas horas. Paralelamente, ROMEIRO (2006) relatou a existência de dois procedimentos possíveis para a esterilização do óleo mineral: autoclavagem a 1 atm por 30 minutos seguida de secagem a 150°C, ou aquecimento à 170°C por

uma hora.

Esse método de preservação ocasiona maior longevidade às estirpes e menor desidratação do meio de cultura, quando comparado ao método de repicagem contínua, por isolar seu contato com o ar e reduzir ao mínimo seu metabolismo. Além disso, a preservação em óleo mineral é um procedimento barato que não necessita de grandes investimentos financeiros (CANHOS et al., 2004; COSTA et al., 2009; PIRES et al., 2012). No entanto, esse método também apresenta deficiências comparáveis à tecnologia de repique contínuo, como possibilidade de contaminação e mutação, dificuldade no uso, manuseio e esterilização do óleo mineral e sensibilidade de alguns isolados ao óleo (CANHOS et al., 2004; COSTA et al., 2009; PIRES et al., 2012).

2.4.2.2. Preservação em água esterilizada

O método de preservação em água destilada estéril, também conhecido por método de Castellani, seu fundador, é indicado na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas. O método consiste no cultivo de células em meio composto por ágar e posterior transferência dos blocos de ágar contendo células para frascos de vidro adicionado de água estéril ou solução salina, sendo armazenado a baixas temperaturas ou temperatura ambiente (NEUFELD & OLIVEIRA, 2008).

Essa técnica de preservação deve ser, preferencialmente, utilizada em culturas jovens com cerca de 10 a 15 dias, a fim de atingir o estágio de insuficiência biológica, em face da redução do metabolismo e restrição nutritiva (ABREU & TUTUNJI, 2004).

PIRES et al. (2012) afirmaram que essa técnica de preservação reduz a probabilidade de modificações bruscas nas características originais da cultura, por não exigir muito manuseio do material. PASSADOR et al. (2010) e APARECIDO et al. (2012) ressaltam que as contaminações por ácaros também são reduzidas ao utilizar esse método e que tal técnica é simples, apresenta baixo custo por utilizar apenas água destilada, requer pequeno espaço físico para acondicionamento dos frascos de vidro e é aplicável a uma enorme variedade de fungos.

A grande desvantagem desse método é aplicação restrita a microrganismos que tenham aderência ao ágar, como é o caso de bolores e algumas leveduras (ROMEIRO, 2006).

2.4.2.3. Congelamento comum

O método de congelamento consiste na preservação dos microrganismos através da redução da temperatura para faixa entre -4 a -20°C, sendo apropriado para microrganismos que suportam o retorno para a temperatura ambiente após serem mantidos em temperaturas inferiores a -20 °C (TORTORA et al., 2011).

Trata-se de uma técnica simples, não implica grandes despesas e requer equipamentos acessíveis até mesmo para o preparo do material (SOLA et al., 2012). Além disso, o armazenamento de diversos microrganismos é feito com segurança por períodos de até dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular (TORTORA et al., 2011).

Como desvantagem deste método, podem-se mencionar os danos causados às células devido à formação de cristais de gelo e alterações eletrolíticas na faixa de temperatura utilizada, reduzindo assim a viabilidade de certos microrganismos (ROMEIRO, 2006). ALFENAS & MAFIA (2007) recomendam o uso de crioprotetores e modificações na técnica inerentes a espécie preservada para impedir a formação de cristais de gelo e, conseqüente perda da viabilidade.

2.4.2.4. Métodos de preservação por secagem

O método de preservação de microrganismos por secagem consiste em uma suspensão de reagentes sob um suporte sólido como solo, carvão ativado, papel filtro, gel sílica, etc., promovendo a redução do metabolismo por desidratação e baixa temperatura, uma vez que esses transportadores possuem grande superfície e capacidade absorvente (GREEN, 2008; ANJOS et al., 2012; LOPES, 2012).

No método de secagem por sílica gel é utilizado um pequeno frasco de vidro parcialmente preenchido pelo gel previamente esterilizado, para adicionar uma suspensão concentrada de microrganismos em leite desnatado. Posteriormente o frasco é agitado e armazenado em gelo pelo tempo médio de 30 minutos para evitar os efeitos da dissipação de calor. Depois disso, o frasco é mantido por 7 dias em temperatura ambiente e não havendo sinais de contaminação durante esse período, é inserido em exsiccador a 5°C. Esse método possui vantagens de uma implementação simples, baixo custo e resultar em culturas estáveis (ABREU & TUTUNJI, 2003; GREEN, 2008; ANJOS et al., 2012; LOPES, 2012).

O método de secagem em solo estéril baseia-se na utilização de amostra de solo autoclavada a 121°C por 1 h e seca até atingir cerca de 20% de umidade, como

meio de armazenamento. Deve-se transferir a amostra de solo (5 g) para um tubo de ensaio estéril, inocular a suspensão biológica (1 ml) e armazenar em baixas temperaturas. Esse método possui as vantagens de estabilidade microbiana em uma média de 5 a 10 anos, baixo custo e a possibilidade de realizar várias ativações através do mesmo tubo. Entretanto é importante atentar-se para utilização de solo estéril e seco, manter os cuidados para evitar contaminação e, ao utilizar suspensão líquida para inoculação usar baixos volumes para não prejudicar a secagem do solo (BUENO, 2004; ANJOS et al., 2012; LOPES, 2012; SOUSA et al., 2017).

O método de secagem em papel filtro equivale à imersão de tiras de papel filme pré-esterilizada em suspensão microbiana contidas em placas Petri. Posteriormente, os papeis já colonizados, são transferidos para outra placa esterilizada e secos em uma incubadora a 25°C por 10 dias. Após esse período, os papeis são transferidos para tubos de ensaio e acondicionados a -20°C ou -80°C. É um método simples e barato, além de manter a cultura preservada tão estável quanto aos isolados liofilizados. Para preservação de culturas em pequena escala em laboratório, é mais barato que o nitrogênio líquido e favorece a troca de amostras entre laboratórios pela facilidade no transporte (ALFENAS & MAFIA, 2007; LOPES, 2012; SOUSA et al., 2017).

2.4.3. Métodos de Preservação a longo prazo

2.4.3.1. Liofilização

A técnica de liofilização caracteriza-se pela dissecação a vácuo do material congelado por sublimação, impedindo a formação de cristais de gelo, capazes de originar o rompimento das estruturas celulares, além da degradação de enzimas presentes no citosol, e conseqüente morte dos agentes (MORGAN et al., 2006).

O processo de liofilização é dividido em três etapas, sendo elas: congelamento do material, desidratação primária e desidratação secundária. O congelamento promove a inércia do material a ser liofilizado, interrompendo as reações químicas e atividades biológicas, sendo considerada uma das etapas mais críticas. Finalizado esta etapa, a amostra biológica é desidratada por sublimação a vácuo e com adição de calor, e em seguida a temperatura de secagem é usada sob pressões reduzidas para remover a água absorvida pelo material (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Durante o processo por liofilização, devido ao comportamento intrínseco da

água em condições de baixa temperatura, um grande número de células sofrerão danos estruturais. Para preservar essas células, substâncias protetoras devem ser adicionadas antes do congelamento ou secagem, evitando modificações no processo. A escolha dos meios protetores varia conforme as características do microrganismo alvo, podendo ser utilizado soro bovino, leite desnatado, glicerol, trealose, betaína, adonitol, solução de 1% de sacarose, glicose, lactose e alguns polímeros como dextran e polietilenoglicol (CANHOS, 2003; HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005).

A vida útil dos materiais liofilizados está intimamente relacionada aos processos de armazenamento e embalagem. Buscando assegurar a estabilidade dos produtos liofilizados, recomenda-se que ao serem acondicionados em ampolas ou tubos de vidro, sejam armazenados em ambiente com baixa umidade, ao abrigo da luz, com ausência de oxigênio e mantidos a temperatura até -20°C (MORGAN et al., 2006; ALFENAS & MAFIA, 2007).

As principais vantagens do uso desse método de preservação são alta estabilidade do material conservado (em média de 17 a 20 anos), baixa taxa de variação e contaminação por ácaros, aplicável a muitas espécies de microrganismos, não necessita de monitoramento ou manutenção frequente, além de requerer pouco espaço para armazenamento. Além disso, o material liofilizado tem a possibilidade de ser transportado a longas distâncias sem refrigeração (MORGAN et al., 2006; CARVALHO, 2007; ANJOS et al., 2012; PIRES et al., 2012).

Contudo, a implementação desse método é complexa, exigindo nível técnico e domínio da tecnologia por parte dos colaboradores, além de demandar equipamentos com alto valor agregado para desidratação dos materiais e alto custo no preparo das culturas (PAOLI, 2005; ALFENAS & MAFINA, 2007; ANJOS et al., 2012).

2.4.3.2. Criopreservação

Essa técnica de preservação compreende a manutenção de diversos tipos celulares sob baixas temperaturas para minimizar os danos a materiais biológicos causados durante a etapa de congelamento e armazenamento a frio (WOLFE & BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009).

A tecnologia de criopreservação pode ser segmentada de acordo com a temperatura de armazenamento utilizada em seu processo, sendo possível manter

os materiais a baixas temperaturas (-20°C a -80°C) em freezers e em temperaturas ultrabaixas (-150°C a -196°C) em containers de nitrogênio líquido (WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

O processo de criopreservação inicia-se através da refrigeração do material biológico, previamente diluído em meio adequado, até a temperatura de 20°C. À medida que a temperatura diminui, é estabelecida uma faixa crítica, entre 19°C e 8°C, na qual os microrganismos podem sofrer lesões irreversíveis como danos à membrana plasmática, aumento da permeabilidade resultando em perda de íons e metabolismo reduzido, caso o resfriamento não seja realizado de maneira adequada (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009). O recomendado é que ocorra um declínio de 1°C por minuto durante o resfriamento para minimizar o surgimento de danos às células (ANJOS et al., 2012).

Quando o processo de resfriamento atinge a faixa de temperatura entre -6°C e -15°C ocorre a cristalização da água no meio, a concentração de soluto na fração descongelada aumenta e a membrana plasmática de controle impede a formação de cristal de gelo dentro da célula. No momento em que o material atinge a temperatura crítica de -60°C, a inércia da unidade é verificada para que o material possa ser imerso em nitrogênio líquido para armazenamento e preservação (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007).

A eficácia da criopreservação de microrganismos está relacionada a diversos fatores, como espécies, tipo de cepa, tamanho e estrutura celular, estágio e taxa de desenvolvimento, temperatura de incubação, composição do meio, pH, pressão e aeração osmótica, teor de água da célula, teor lipídico e a composição do meio de congelamento, taxa de resfriamento, temperatura e tempo de armazenamento, taxa de aquecimento e o meio de recuperação (COSTA et al., 2009; BELOTI, 2015).

2.4.3.2.1. Congelamento em ultrafreezer

O método de preservação por ultracongelamento baseia-se em submeter o microrganismo, veiculado a uma substância protetora ou não, a temperaturas extremamente baixas podendo chegar a até -100°C (ALFENAS & MAFIA, 2007).

A cultura isolada é cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura apropriado e, após um período de 7 dias, adiciona-se a suspensão preparada com água destilada às placas de Petri. Posteriormente, tiras de papel de filtro são colocadas em contato com a suspensão para que essa seja totalmente absorvida.

Após completa absorção, os papéis de filtro são retirados e inseridos em novas placas estéreis e acondicionados em caixa seca a aproximadamente 28°C por 8 dias. Em seguida, as tiras de papéis são transferidas para criotubos distribuídos ultrafreezer a uma temperatura de -80°C (APARECIDO & CAMILO, 2013; BELOTI, 2015).

A grande vantagem desse método consiste na preservação das células por longos períodos, ocasionado pela proteção que baixas temperaturas fornecem ao DNA e as proteínas contra danos e desnaturação (PRAKASH et al., 2013).

No entanto, embora a conservação empregando baixas temperaturas seja eficiente, a temperatura nos freezers podem sofrer constantes variações, o que prejudica a qualidade da amostra (PAOLI, 2005).

2.4.3.2.2. Congelamento em nitrogênio líquido

A técnica de congelamento em nitrogênio líquido inclui a manutenção de materiais em temperaturas ultrabaixas variando entre -150°C e -196°C acondicionadas em recipientes de nitrogênio líquido (WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

Esse método é considerado o mais apropriado para preservação de fungos filamentosos, uma vez que reduz a atividade metabólica desses microrganismos a níveis mínimos e não afeta sua morfologia e propriedades patogênicas (SINGLETON, 1992; SMITH, 1998). Contudo, a aplicabilidade dessa técnica depende da sensibilidade do microrganismo em suportar o resfriamento, seguido do congelamento a -196°C e posterior descongelamento na recuperação da cultura (BELOTI, 2015).

A conservação de microrganismos em nitrogênio líquido evita variações na temperatura de armazenamento e garante a preservação da espécie por longo prazo (WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005). Entretanto, essa técnica requer suprimento contínuo do nitrogênio em nível adequado e necessita de um local com ventilação adequada para armazenamento do barril, tornando-se onerosa (FONG et al., 2000).

2.5. Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos

2.5.1. Histórico

A Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) foi oficialmente criada pelo professor Dr. Luís Roberto Batista em 28 de abril de 2010 e aprovada em Assembleia Departamental, de acordo com a ATA de número 339 de 28/04/2010. Originalmente estava localizada no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A solicitação para credenciamento da CCDCA como instituição fiel depositária de amostras de componentes do patrimônio genético foi enviada em 2014, sendo o Aviso de Credenciamento nº 141/2015/SECEX/CGEN publicado no D.O.U. nº 219, de 17/11/2015, seção 3, página 129. O Regulamento Interno da Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos foi aprovado em assembleia Departamental, conforme ATA de número 382 de 04/12/2015. A Criação do Banco de DNA de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos foi aprovada em Assembleia Departamental, como consta na ATA 396 de 18/08/2017. E, de acordo com a ATA 401, em 26 de março de 2018, a CCDCA foi transferida para o Centro de Biodiversidade e Recursos Genéticos da UFLA, aprovada em assembleia Departamental.

O principal objetivo da CCDCA é desenvolver a preservação, manutenção, depósito, fornecimento, caracterização de microrganismos, além de identificação morfológica de fungos filamentosos, além do desenvolvimento de pesquisa e atividades de ensino nos cursos de graduação e pós-graduação, em conformidade com as normas e legislações nacionais e internacionais vigentes. A coleção é mantida financeiramente através de projetos de pesquisa. Atualmente possui em seu acervo 1593 cepas, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Lecanicillium*, *Monascus*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Talaromyces* sendo em maior número *Aspergillus* e *Penicillium*. Além de, possuir em seu acervo 136 leveduras pertencentes aos gêneros *Hanseniaspora*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hyphopichia*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota* e 36 Bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Gluconobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* e *Bacillus*.

O método utilizado para a preservação dos microrganismos da CCDCA é a criopreservação a -80°C. Os isolados foram obtidos em diferentes substratos, principalmente de alimentos como café, uva, cacau e especiarias. O acervo também

apresenta fungos isolados de cavernas e solos de Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e de áreas de mineração.

A CCDCA está registrada junto a Federação Mundial de Coleções de Cultura (World Federation for Culture Collection-WFCC) desde o ano de 2016, pelo Centro Mundial de Dados para Microorganismos (World Data Center for Microorganisms-WDCM) e pelo Centro de Recursos Microbianos (Microbial Resources Centres-MIRCEN), com a numeração WDCA 1081. Em 2017, a CCDCA foi credenciada junto a Federação Latino Americana de Coleções de Cultura (FELACC).

Figura 1 Documento de credenciamento da CCDCA junto a FELACC



Para identificação dos isolados, são utilizadas técnicas propostas pela literatura especializada, tais como meios de cultivo específicos e manuais de identificação. O fornecimento das culturas preservadas da CCDCA realiza-se depois de efetivada o crescimento e a verificação da pureza, além da assinatura do termo de transferência de material pelo responsável.

2.5.2. Funções da CCDCA/UFLA

BATISTA et al., (2016) no Manual Sobre a Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras descreve minuciosamente as funções desempenhadas pela CCDCA/UFLA, como segue:

- **Coleção:** Continuar a incluir microrganismos relevantes em sua coleção para pesquisa científica e pedagógica (para escolas de segundo grau e instituições de ensino superior) e aplicações biotecnológicas de importância industrial. Principalmente, micotoxinas e microrganismos provenientes de projetos de pesquisas desenvolvidos pelo Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos. Identificar poluentes industriais e deterioração de produtos que afetam a produtividade e a segurança do agronegócio brasileiro.
- **Preservação de manutenção:** Através de diferentes métodos de preservação, garantir a sobrevivência, estabilidade e pureza de microrganismos durante longos períodos de tempo.
- **Parceria:** Cooperação entre pesquisadores ou instituições públicas ou privadas. Poderão ser mantidos no acervo microrganismos relacionados à pesquisa, ensino e preservação sigilosa de cepas utilizadas em processos industriais.
- **Distribuição:** Distribuição de culturas para grupos treinados na utilização dos microrganismos conforme demanda e sob restrição técnica e legal (ex: microrganismos patogênicos ou associados a processo de patentes). As Coleções de cultura institucionais, geralmente se restringem a atender aos interesses e necessidades das instituições que as mantêm.
- **Serviço de Identificação:** Identificação por taxonomia clássica, molecular e taxonomia Polifásica. Todos os isolados serão identificados por taxonomia clássica (características morfológicas). Para alguns serão utilizados também métodos moleculares e/ou taxonomia polifásica como ferramenta de identificação e caracterização. Permite a interação técnica e científica entre a coleção e seus usuários provenientes de instituições de pesquisa e/ou do setor industrial.
- **Informações:** As atividades de rotina e as pesquisas microbianas realizadas a partir da coleção produzem muitas informações científicas e técnicas. Caso não seja confidencial, será organizado de forma coerente e disponibilizado aos usuários (gratuitamente ou não).

- **Treinamento:** A coleção de cultura pretende desempenhar um papel importante em programas de treinamento, principalmente em áreas como preservação, manutenção, taxonomia e identificação de microrganismos importantes para a indústria de alimentos.
- **Acervo:** O acervo da coleção de cultura contará, inicialmente, com fungos filamentosos isolados de alimentos, produtos agrícolas, ambientes internos de processamento de alimentos e diferentes comunidades biológicas (principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*). Será adotada uma norma e um formulário para solicitação de linhagens, e outro para identificação das linhagens encaminhadas para esta coleção. Tais medidas objetivam controlar as finalidades de coleta, controlar o armazenamento, recursos humanos e financeiros.
- **Publicidade:** O *web site* na *internet* via Universidade Federal de Lavras, proporcionará a coleção maior visibilidade de seu acervo e serviços oferecidos. Participação em *workshop*, conferências, publicação de artigos e colaboração com outras instituições, também serão estratégias utilizadas para publicidade da coleção.
- **Pesquisas:** O principal objetivo da pesquisa envolvendo a coleção de cultura é fornecer mais pesquisas de inovação biotecnológica abrangendo a aplicação de microrganismos à produção de alimentos, produção de enzimas microbianas, degradação de resíduos e segurança alimentar. Além de aplicar os conhecimentos adquiridos na formação e educação técnica profissional, envolve também as áreas de microbiologia alimentar, microbiologia agrícola, biotecnologia, engenharia alimentar e ecologia.

2.5.3. Avaliação de risco dos microrganismos presentes na coleção de cultura

As práticas, os equipamentos de segurança e o projeto das instalações são adequados para o treinamento educacional, ou para treinamento de técnicos, alunos e professores. Todos os microrganismos presentes na coleção de cultura apresentam baixo risco para os técnicos, alunos e para o meio ambiente. Portanto, microrganismos estritamente patogênicos, não serão tratados no laboratório. Como a maioria dos microrganismos, aqueles presentes na coleção de cultura (CCDCA) são capazes de desenvolver uma infecção secundária.

Desta forma, a Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos é avaliada como nível 1 de biossegurança (NB-1), exigindo proteção

básica.

Todas as recomendações padrão de biossegurança (NB-1) estão detalhadas no Manual de Boas Práticas e Segurança (APÊNDICE A).

2.5.4. Métodos utilizados para identificação dos fungos filamentosos da CCDCA

A identificação dos fungos filamentosos é realizada por métodos clássicos, utilizando características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Quando necessário, é realizado o sequenciamento para que os fungos sejam identificados pela taxonomia molecular, por meio da cooperação com laboratórios de análise molecular da UFLA. Análises de metabólitos secundários também poderão ser utilizados para a identificação dos isolados.

2.5.4.1. Avaliação das características macroscópicas

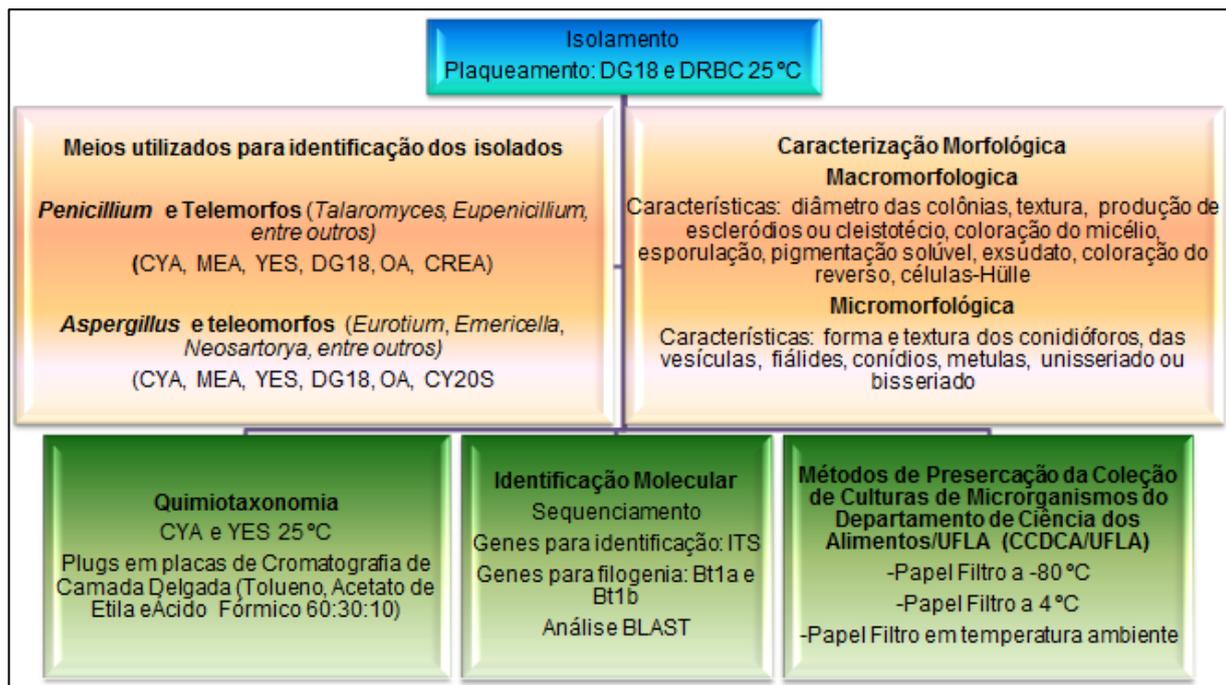
Para avaliar o diâmetro das colônias, são utilizados diferentes meios de cultivo: Czapeck Yeast Agar (CYA), Yeast Extract Agar (YES), Malt Extract Agar (MEA), Creatine Agar (CREA), Czapeck Agar (CZ) e Dichloran 18% glycerol Agar (DG18). Após o cultivo, os fungos são incubados a 25°C e 37°C por 7 dias. Além das características macroscópicas, a cor e a textura da colônia, a cor do reverso, presença de exsudato, presença ou ausência de pigmentação solúvel entre outros, também são observados para a caracterização das espécies.

2.5.4.2. Avaliação das características microscópicas

As características microscópicas dos fungos observadas em lâmina, com lamínula e corante (Azul de Metileno), são: tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos, comprimento e textura das métulas e fiálides, forma, tamanho e textura dos conídios, forma e cor dos cleistotécios/escleródios e forma e tamanho das vesículas para a caracterização das espécies.

Além das características morfológicas, outros métodos são utilizados para isolar, caracterizar e identificar fungos filamentosos da CCDCA, conforme exemplificado na Figura 2.

Figura 2 Métodos utilizados para a caracterização dos fungos filamentosos da CCDCA



Fonte: BATISTA et al., (2016, p. 31)

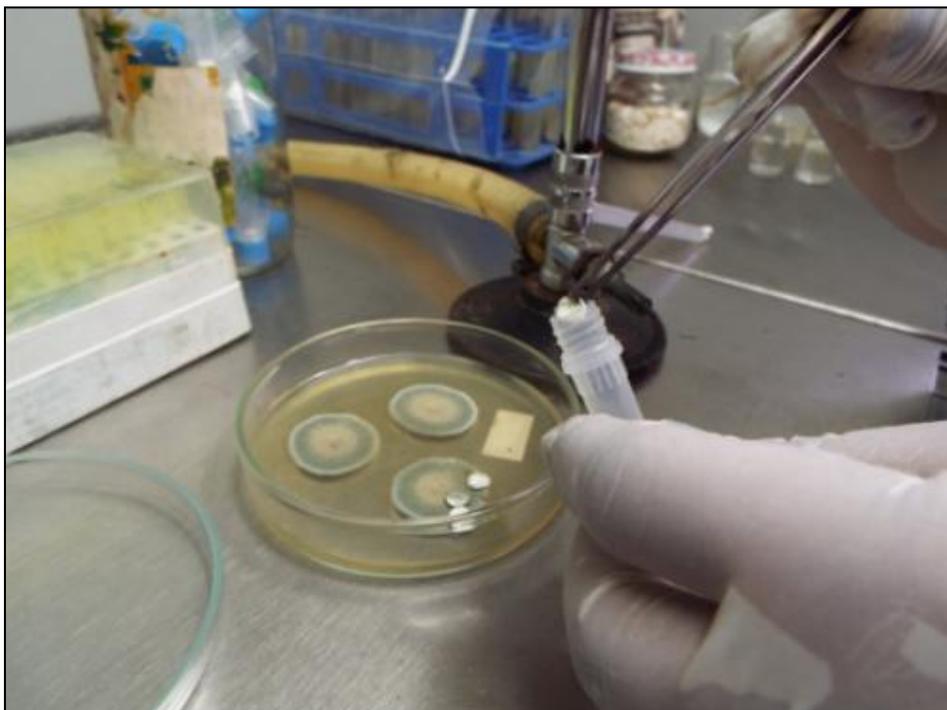
2.5.5. Métodos de preservação de microrganismos utilizados na CCDCA

Os métodos utilizados para a preservação das espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* do acervo da CCDCA, foram escolhidos de acordo com a disponibilidade do laboratório, longevidade da preservação, vantagens e desvantagens.

O método do Papel Filtro é usado há 14 anos para preservar espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O método é simples, e como já apresentado no tópico 2.4.2.4 deste trabalho, não requer equipamentos sofisticados, ou mesmo é complexo na preparação do material, apresenta baixo custo por utilizar somente papel filtro e necessita de pequeno espaço físico para acondicionar os microtubos. Não querer mão de obra especial, permite a preservação por longos períodos e diminui os riscos de contaminação.

Atualmente os isolados da CCDCA/UFLA são preservados em papel filtro em duas condições: em ultrafreezer a - 80°C e em temperatura ambiente e pelo método de Castellani. São mantidos pelo métodos duas cópias de cada isolado preservado.

Figura 3 Método de preservação em papel filme



Fonte: BATISTA et al., (2016, p. 39)

Figura 4 Fungos do gênero *Penicillium* preservados pelo método do papel filtro mantidos a -80 °C



Fonte: BATISTA et al., (2016, p.40)

3 METODOLOGIA

O desenvolvimento do Manual de Boas Práticas da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos foi motivado pela necessidade em padronizar a informatização de registro dos microrganismos depositados, preservação, monitoramento e a conformidade com as legislações nacional e internacional.

Esta pesquisa se propõe a entender as orientações de adequação dos laboratórios de pesquisa às boas práticas e segurança em laboratório. Dentro dessa abordagem pretende enforçar nos requisitos aplicáveis aos Centros de Recursos Biológicos para o domínio microrganismo, buscando atingir a colaboração global em pesquisa e colaboração entre as atuais coleções de cultura da UFLA, como, também padronizar e orientar a utilização de protocolos de preservação do material biológico e segurança.

Devido aos fins para ampliar a área de conhecimento em boas práticas de laboratório essa pesquisa se enquadra na natureza básica e se classifica como exploratória, tendo envolvimento profundo em literatura, sendo à base da pesquisa legislações, normativas, livros, artigos, relatórios técnicos e documentos que auxiliam na adequação dos laboratórios de pesquisa às boas práticas.

Baseado na ideia de transição de coleções de cultura de microrganismos para o conceito de centro de recursos biológicos, a unidade de recursos microbiológicas da UFLA irá trabalhar de acordo com as boas práticas de laboratório (NIT DICLA 035 e documentos publicados pelo OECD), além dos demais procedimentos comumente acordados e princípios estabelecidos no manual.

De início, foi realizado um esboço com perspectivas quanto à pesquisa, estabelecendo-se nesse momento os tópicos a serem trabalhados. Dessa forma definiu-se o que seria abordado em cada capítulo e quais as leis seriam analisadas, servido de critério a esta escolha o conteúdo aplicável a todos os centros de recursos biológicos e atendimento ao domínio microrganismo.

O material de estudo foi composto por livros, documentos e toda a literatura relacionada ao tema de estudo presente nos bancos de dados da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Scientific Electronic Library Online - SciELO, Google Livros, Medical Literature Analysis and Retrieval System Online - MEDLINE. O material foi selecionado a partir da variável de interesse, com preferência as publicações após o ano 2000.

Portanto, com o intuito de adequar, tanto o material biológico quanto os dados a ele relacionado, foi elaborado o manual reunindo os pontos de maior relevância envolvendo boas práticas de qualidade e segurança.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante das informações coletadas foi possível proceder à elaboração do Manual de Boas Práticas e Segurança da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos (APÊNDICE A). O manual conta com nove principais divisões, que visam adequar a unidade às boas práticas:

- a) Normas de segurança;
- b) Equipamentos de proteção coletiva e individual;
- c) Acesso e permanência ao laboratório;
- d) Manutenção das instalações;
- e) Manutenção dos equipamentos;
- f) Produtos químicos;
- g) Descarte de materiais e resíduos;
- h) Procedimentos de emergência e;
- i) Documentos.

Os decretos, portarias e instruções normativas elaboradas pelos principais órgãos fiscalizadores resultam em diversos benefícios para os laboratórios, desde que suas ações sejam implantadas. É uma forma de padronizar a necessária infraestrutura para a correta preservação, catalogação digital, e disponibilização dos acervos à comunidade científica em geral, viabilizando estudos de taxonomia a altura do conhecimento, principalmente por morfologia, fisiologia, filogenética molecular e marcadores moleculares.

No que diz respeito às principais legislações sobre boas práticas, a norma NIT-DICLA-035, revisão nº 04 aprovada em outubro de 2019 e as Diretrizes da OCDE de Boas Práticas para Centro de Recursos Biológicos, publicado em 2007, são a base para o gerenciamento em condições adequadas tanto em recursos humanos como em estrutura física e equipamentos para a Unidade de Recursos Microbiológicos. A implantação dos critérios estabelecidos nas legislações evidencia o comprometimento da unidade frente ao único organismo de acreditação reconhecido no Brasil, a Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro – Cgcre.

Ao reunir a base para boas práticas e segurança em laboratório, em harmonização com o cumprimento da legislação nos níveis nacional e internacional, o manual assegura o desenvolvimento de estruturas operacionais para facilitar o acesso seguro a materiais biológicos de referencia e informação associada, além do desenvolvimento de políticas comuns sobre questões de biossegurança.

É válido ressaltar que as legislações utilizadas como base para elaboração do Manual de Boas Práticas e Segurança do Departamento de Ciência dos Alimentos estão vigentes no momento da escrita da mesma, ficando sob responsabilidade da equipe da unidade buscar novas legislações e atualizações para as mesmas.

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos discutidos ao longo do trabalho, pode-se concluir que as legislações e normativas dos diversos órgãos de regulamentação existentes são muito relevantes no dia a dia dos centros de recursos biológicos e que sua utilização implica em diversos benefícios a empresa.

Através dos estudos foi possível perceber o quanto as legislações são amplas e detalhadas, o que facilita o funcionamento dos laboratórios, desde que aplicadas de forma correta. É possível basear-se nelas para realização de praticamente todos os processos que envolvem os centros de recursos biológicos, o que garante uma agilidade de processamento e uma padronização.

Este trabalho permitiu um aprofundamento nos conhecimentos de legislações envolvendo boas práticas e segurança em laboratórios. Além disso, foi aprimorada a busca por legislações nas plataformas dos diversos órgãos de regulamentação, o que auxiliará em futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. 3ª Ed. 19 de dezembro de 2017. 32 p.

ABNT NBR ISSO 17034:2017. **Requisitos Gerais para a Competência de Produtores de Material de Referência**. 1ª Ed. 14 de junho de 2017. 27 p.

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV. 382 p. 2007.

ANJOS, T. V.; TEBALDI, N. D. FAGIAN, C. C.; **Coleção preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Horizonte científico, Uberlândia, n. 1, p. 1-24, ago, 2012.

APARECIDO, C.C.; CAMILO, C.M. **Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *colletotrichum* em laboratório**. Biológico, São Paulo, v.75, n.1, p.17- 22, jan./jun., 2013.

APARECIDO, C. C.; PIRES, G.C.C ; FINATTI, D., CAMILO, C. de M. **Preservação de micro-organismos a -80° C**. Biológico, São Paulo, v.74, n.1, p.23-29, jan./jun., 2012.

BATISTA, L.R.; TERRA, M.F.; PASSAMANI, F.R.F.; SILVA, D.M. **Manual sobre a Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA (CCDCA/UFLA)**. Lavas: Universidade Federal de Lavras. 2016. 44f.

BARKER, K. **Na bancada. Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.

BELOTI I.F. **Viabilidade de fungos necrotróficos sob diferentes métodos de preservação**. Uberlândia: Universidade Federal De Uberlândia. 2015. 89f.

BRASIL. **Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015**. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea *j* do Artigo 8, a alínea *c* do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 de mai. 2015. Seção 1, p.1 (publicação original); 53 (veto).

BRASIL. **Medida Provisória nº 2.186, de 23 de agosto de 2001b**. Regulamenta o

inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, e os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e a transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 de ago. 2001. Seção I-E, p.11.

BUENO, C. J.; Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. 2004. xiii, 101 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2004.

CAMPOS, V.F. Gerenciamento da rotina do trabalho do dia a dia. Belo Horizonte: INDG – Tecnologia e Serviço Ltda, 2004. 266 p.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. Ciência e Cultura, Campinas, v. 55, n. 3, p. 27-29, 2003.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CARVALHO, C.A.S. Coleções de Culturas Microbianas como Centro de Recursos Biológicos: Desafios e Oportunidades. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova Lisboa. [Lisboa], 43 p. 2012.

CARVALHO, F. D. Indução de estruturações esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. Ciência Agrotécnica, Lavras, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

CEFAR EM NOTÍCIAS. Procedimentos para a conservação de microrganismos. Informativo Cefar de Microbiologia. Ano III - Ed. 13 - Jan/Fev/2006 – Circulação Bimestral.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. Ciência Animal, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DELLARETTI, E. M. Preservação de fungos em baixas temperaturas. 2014. 29 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado interdisciplinar em biosistemas). Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2014.

DOQ-CGCRE-023. Orientações para a atividade reconhecimento da conformidade das boas práticas de laboratório – BPL. Coordenação Geral de Acreditação. INMETRO. Mai/2019. 12 p.

DOQ-CGCRE-034. Versão Brasileira do Documento Diretrizes da OCDE de

Boas Práticas para Centros de Recursos Biológicos: documento de caráter orientativo. Coordenação Geral de Acreditação. INMETRO. Set/2012. 47 p.

EMBRIC. **Best Practice Methods for Biological Centres.** v.3. 57 p. 2017.

FIOCRUZ. **Legislação e Guias de Boas Práticas referentes às atividades das Coleções Biológicas.** Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/legislacao-e-guias-de-boas-praticas-referentes-atividades-das-colecoes-biologicas>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FIOCRUZ. **Lei da Biodiversidade.** Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/lei-da-biodiversidade>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FONG, Y. K.; ANUAR, S.; LIM, H.P.; THAM, F.Y.; SANDERSON, F.R. **A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures.** *Mycologist*, London, v. 4, p. 127–130, 2000.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.

GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology.** CRC: London, 2 ed. 2008.

HALLUIN, A. P. **The Biological Deposition Requirement.** In: HUNTER-CEVERA, J.C.; BELT, A. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry.* London: Academic Press, 1996. Cap.1, p. 1-13.

HUBÁLEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.** *Cryobiology*, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.

IBAMA. **Instrução Normativa nº 141, de 19 de dezembro de 2006.** Regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 dez. 2006.

IBAMA. **Instrução Normativa nº 146, de 10 de janeiro de 2007.** Estabelecer os critérios para procedimentos relativos ao manejo de fauna silvestre (levantamento, monitoramento, salvamento, resgate e destinação) em áreas de influencia de empreendimentos e atividades consideradas efetiva ou potencialmente causadoras de impactos à fauna sujeitas ao licenciamento ambiental, como definido pela Lei nº 6938/81 e pelas Resoluções Conama nº 001/86 e nº 237/97. Ministério do Meio Ambiente. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 jan. 2007.

IBAMA. **Instrução Normativa nº 160, de 27 de abril de 2007b.** Institui o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO) e disciplina o transporte e o intercâmbio de material biológico consignado às coleções. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 abr. 2007. Seção 1, p; 404-405.

ICMBIO. **Instrução Normativa nº 03, de 1 de setembro de 2014.** Fixar normas para a utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBio, na forma das diretrizes e condições previstas nesta Instrução Normativa, e regulamentar a disponibilização, o acesso e o uso de dados e informações recebidos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por meio do SISBio. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 set. 2014. Seção 1, p, 60.

ICMBIO. **Legislação Específica.** Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/sisbio/legislacao-especifica.html>. Acesso em: 30 jun. 2020.

INMETRO. **Princípios de Boas Práticas de Laboratório – BPL.** NIT-DICLA-035. Rev. 04. Outubro de 2019. 16 p.

INMETRO. **Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL.** Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/monitoramento_BPL/reconhecimento_BPL.asp. Acesso em: 2 jul. 2020.

INMETRO. **Requisitos sobre a Acreditação dos Laboratórios de Ensaio dos Produtores de Materiais de Referência dos Centros de Recursos Biológicos.** NIT-DICLA-061. Rev. 04. Março de 2020. 17 p.

LIMA, N. **Centros de Recursos Biológicos: Novos Desafios para as Coleções de Cultura.** In: Nunes, M.L.; Bandarra, N.M. Micologia, Avanços no Conhecimento: Atas do Congresso Brasileiro de Micologia. Universidade da UFPE, Recife, 2007. p. 173-80.

LOPES A.S. **Catálogo das Espécies Potencialmente Toxigênicas De Aspergillus: Ocorrência, Taxonomia Polifásica, Distribuição E Preservação.** São Paulo: Universidade Estadual De Campinas – Unicamp. 2012. 119f.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.** Disponível em: <https://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico>. Acesso em: 1 jul. 2020.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. **Preservation of microorganisms by drying – a review.** Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, aug. 2006.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 8th ed., ASM Press, Washington DC, 2003. 2113p.

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. **Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril.** Revista Brasileira Análises Clínicas, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

OECD. **OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres.** Disponível em: <https://www.oecd.org/sti/emerging->

tech/oecdbestpracticeguidelinesforbiologicalresourcecentres.htm. Acesso em: 4 jul. 2020.

OECD. **OECD best practice guidelines for biological resource centres**. Paris, 2007. 110 p.

OECD. **Self evaluation checklist for the OECD best practice guidelines for biological resource centres – general best practice guidelines for all BRCs**". v.1. 2009a.

OECD. **Self evaluation checklist for the OECD best practice guidelines for biological resource centres – General best practice guidelines for the micro-organism domain**". v.1. 2009b.

OECD. **Self evaluation checklist for the OECD best practice guidelines for biological resource centres – General best practice guidelines on biosecurity**". v.1. 2009c.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

PAOLI, DE P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research**. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 29, p. 897- 910, 2005.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. **Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo"**. *Biológico*, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos – Séries em Biotecnologia**, v. 1 . Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.

PIRES, G.C.C.; APARECIDO, C.C.; FINATTI, D. preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. *Biológico*, São Paulo, v.74, n.1, p.9- 16, jan./jun., 2012.

PNCQ. **EMBRAPA abrigará coleções de microrganismos no centro de recursos biológicos, em Brasília**. Disponível em: <https://www.pncq.org.br/Qualinews/BR/Index/202>. Acesso em: 29 jun. 2020.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. S. **Practice and prospects of microbial preservation**. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 1-9, 2013.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Artmed, p.512, 2005.

RODRIGUES, N. R.; SOUZA, A.P.F.; WATANABE, M. Implantação e implementação das normas das Boas Práticas Laboratoriais (BPL) no laboratório de análises de resíduos da Universidade Estadual de Campinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1276-1280, mar./2012. Disponível em: http://static.sites.sbq.org.br/quimicanova.sbq.org.br/pdf/Vol35No6_1276_37-AG11455.pdf. Acesso em: 2 jul. 2020.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SILVA, M. Programa de Acreditação de OAC: Coleções de Culura dos Centros de Recursos Biológicos. 2012. 86 slides. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/pdf/1_bioprotecao.pdf. Acesso em: 04 jul. 2020.

SINGLETON, L. L.; MIHAIL, J. D.; RUSH, C. M. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul: The American Phytopathological Society, 265p, 1992.

SMITH, D. **The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi**. Cryo- Letters, v. 19, p.79–90, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA. **Coleções de Culturas e Taxonomia**. Disponível em: <https://sbmicrobiologia.org.br/areas/colecoes-de-culturas-e-taxonomia/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

SOLA, C.M.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1398, 2012.

SOUSA, B.R.; SILVA, U.N.M.; SILVA, L.R.; SANTOS, G.M.R.; SILVA, A.S. **Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas**. Faculdades Integradas de Patos Curso de Medicina. v. 2, n. 3, out/dez 2017, p.827-842.

SUZUKI, K.-I. An Overview of Biological Resource Center-Maintenance of Microbial Resources and Their Management. In: KURTBÖKE, I. **Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications**. 1ª. ed. [S.l.]: Academic Press, 2017. Cap. 13, p. 257 - 274.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 964, 2011.

VAZOLLER, R.F.; CANHOS, V.P. **Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos**. CGEE. Nota Técnica. 2005.

WATSON, P. F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen**. Animal Reproduction Science, London, v.60/61, p.481-492, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects**. International Journal of Refrigeration, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

APÊNDICE A – Manual de Boas Práticas e Segurança da Coleção de Cultura do Departamento de Ciência dos Alimentos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS – DCA
SETOR DE MICOLOGIA DE ALIMENTOS

**MANUAL DE BOAS PRÁTICAS E SEGURANÇA DA
COLEÇÃO DE CULTURA DE MICRORGANISMOS DO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO.....	3
3. DIVULGAÇÃO DO MATERIAL	3
4. RESPONSABILIDADES	3
5. NORMAS DE SEGURANÇA.....	4
5.1. Normas básicas de segurança	4
5.2. Normas de segurança pessoal.....	5
5.3. Normas de segurança para utilização de materiais de vidro.....	6
6. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA E INDIVIDUAL (EPCS E EPIS) 6	6
7. ACESSO E PERMANÊNCIA AO LABORATÓRIO.....	7
8. MANUTENÇÃO DAS INSTALAÇÕES.....	8
9. MANUTENÇÃO DOS EQUIPAMENTOS	9
9.1. Equipamentos e instrumentos de precisão	9
9.2. Equipamentos elétricos	9
9.3. Bico de bunsen.....	10
10. PRODUTOS QUÍMICOS	10
10.1. Considerações gerais sobre manuseio, identificação e armazenamento de materiais e produtos químicos em laboratório:	10
11. DESCARTE DE MATERIAIS E RESÍDUOS	11
12. PROCEDIMENTOS DE EMERGÊNCIA.....	11
12.1. Derramamento de produtos químicos.....	12
12.2. Ferimentos	13
12.3. Ingestão de substâncias perigosas.....	13
12.4. Queimaduras	13
13. DOCUMENTOS.....	14
14. HISTÓRICO.....	14
15. CONTROLE DE APROVAÇÃO	15

1. INTRODUÇÃO

O “Manual de Boas Práticas e Segurança da Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos” da Universidade Federal de Lavras – UFLA tem como objetivo orientar funcionários e colaboradores sobre regras de conduta, segurança e boas práticas nas atividades de laboratório, visando manter a saúde e segurança da equipe, segurança ambiental e assegurar a validade dos resultados de pesquisa.

Este manual inclui recomendações sobre saúde e segurança, instalações, manutenção e uso de aparelhos elétricos, além de equipamentos de proteção coletiva (EPC) e individual (EPI), regulamentos sobre manuseio, armazenamento e transporte de produtos químicos, gerenciamento de resíduos e procedimentos de emergência.

O presente manual fornece diretrizes para garantir que indivíduos e organização cumpram os padrões, regulamentos e políticas relevantes de saúde e segurança ambiental. A preparação e implementação deste manual faz parte da implementação de medidas do Sistema de Gerenciamento Integrado (SIG).

2. OBJETIVO

Este manual tem como objetivo central estabelecer padrões de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e assegurar que todos os envolvidos entendam e cumpram tais normas e, desta forma garantir o funcionamento seguro dos laboratórios, a integridade da amostra, confiabilidade dos resultados e integridade dos colaboradores.

3. DIVULGAÇÃO DO MATERIAL

Este manual está disponível fisicamente para consulta no Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos da Universidade Federal de Lavras – UFLA.

4. RESPONSABILIDADES

- a. A Gerência da Instalação deve garantir que os princípios de boas práticas de laboratório descritos nesse manual sejam atendidos. Além disso, é necessário garantir que todo o pessoal da Unidade e suas responsabilidades sejam identificados. Certificar de que a equipe seja formada por pessoal,

instalações, equipamentos e materiais adequados para a correta condução dos estudos. Garantir que exista um Programa da Garantia da Qualidade composto por pessoal designado, e assegurar que as responsabilidades da garantia da qualidade sejam executadas de acordo com os princípios das BPL. Também é responsabilidade da Gerência da Instalação nomear o Diretor de Estudo, antes do início da pesquisa.

- b. O Diretor de Estudo tem a responsabilidade global pela condução do estudo e pelo seu relatório final. Deve aprovar e garantir que o plano de estudo, emendas e os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) estejam disponíveis ao pessoal envolvido no estudo. Além disso, é responsável por garantir que quaisquer desvios ao plano de estudo sejam avaliados e documentados.
- c. O Pesquisador Principal tem como responsabilidade certificar que as fases delegadas do estudo a ele são conduzidas de acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratório.
- d. O Pessoal do Estudo deve estar ciente da aplicação dos princípios BPL em atividades relacionadas à sua participação. Quaisquer desvios da descrição do plano de estudo devem ser documentados e comunicados diretamente ao Diretor de Estudo, e/ou ao Pesquisador Principal.
- e. O Pessoal da Garantia da Qualidade deve garantir que os estudos executados estão em conformidade com os princípios das BPL e, portanto, deve ser inspecionado para verificação.

5. NORMAS DE SEGURANÇA

Os padrões de segurança do laboratório servem para orientar funcionários de maneira a evitar acidentes. Para assegurar a preservação da vida e garantir a integridade das instalações, equipamentos e resultados da análise, todo e qualquer colaborador deve trabalhar de maneira prudente e metódica.

5.1. Normas básicas de segurança

As normas de boas práticas de laboratório englobam ações com o objetivo de minimizar os riscos do ambiente laboratorial. Dentre as boas práticas, estão:

- Não consumir alimentos e bebidas no laboratório para evitar a ingestão acidental de produtos que podem prejudicar a saúde;

- Não armazenar alimentos e/ou utensílios utilizado para alimentação em laboratório e não usar nenhum equipamento do laboratório para aquecer o alimento;
- De acordo com a legislação brasileira, é estritamente proibido fumar em laboratório;
- Evitar conversas paralelas durante a execução da atividade, diminuindo as chances de distração;
- Não utilizar aparelho de som ou celular em laboratório, principalmente quando realizar atividades que demandam atenção extra;
- Usar cabelos amarrados e, quando necessário, utilizar toucas;
- Manter as unhas curtas, limpas e sem esmalte;
- Use sempre uma pipeta apropriada e nunca opere com a boca;
- Não aquecer recipientes de vidro diretamente sobre a chama; não aquecer ou mexer solventes voláteis com a abertura do recipiente voltada para você ou outras pessoas e não coloque o recipiente quente em uma superfície fria de trabalho;
- Antes de iniciar as atividades, certifique-se que o chuveiro de emergência e lava olhos opera em perfeito funcionamento;
- Usar carrinhos apropriados para transportar materiais com risco à segurança;
- Proteger qualquer ferida exposta, evitando contaminação;
- Não transitar com jalecos utilizados em laboratório no ambiente externo;
- Não tocar nas maçanetas da porta ou telefone ao usar luvas;
- Não armazenar materiais de laboratório em armários de uso pessoal;
- Manter uma lista telefônica de emergência atualizada no laboratório.

5.2. Normas de segurança pessoal

- Usar sapatos sem salto e fechados para proteger os pés de substâncias corrosivas ou tóxicas;
- Não usar lentes de contato ao trabalhar em laboratório, uma vez que em contato com vapores corrosivos, as lentes podem irritar os olhos;
- Sempre utilizar jaleco ao entrar no laboratório;
- Não usar roupas de tecido sintético, facilmente inflamáveis;
- Não usar pulseira, relógios, brincos e quaisquer outros acessórios decorativos que possam causar acidentes ou contaminação e até mesmo dificultar a utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI);

- Lavar as mãos ao final do procedimento e após remover todo o equipamento de proteção. Use sabão apropriado e seque as mãos com toalhas de papel descartáveis.
- Utilizar dispositivos adequados de proteção para corpo, mãos, olhos, boca, ouvido e rosto sempre que necessário;
- Evitar contato dos produtos com pele, olhos e mucosas, utilizar sempre que solicitado luvas e óculos de segura;
- Não cheirar os meios de cultura inoculados;
- Evitar trabalhar sozinho no laboratório.

5.3. Normas de segurança para utilização de materiais de vidro

- Manter toda a vidraria armazenada em local adequado;
- Descartar toda a vidraria quebrada em recipientes apropriados e etiquetados;
- Utilizar equipamento de proteção adequado ao manusear vidrarias danificadas;
- A lavagem do material de vidro deve ser realizada de maneira minuciosa para que não acumule resíduos;
- Utilizar placas termo isolantes sob frascos aquecidos.

6. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA E INDIVIDUAL (EPCs e EPIs)

Estabelecer equipamentos de proteção coletivo e individual no ambiente laboratorial é uma medida de segurança necessária para promover a saúde e segurança do trabalhador.

Os EPCs são itens fixos ou móveis, instalados no laboratório para a proteção coletiva de todos os presentes, antes mesmo da determinação do uso de EPIs. Constituem equipamentos de proteção coletiva as placas de sinalização, sensores de presença, fita de sinalização, chuveiro de emergência, lava olhos, sistema de ventilação e exaustão, proteção contra ruídos e vibrações, sistema de iluminação de emergência, dentre outros.

Os EPIs estão relacionados aos equipamentos de uso individual e devem ser adequados para os tipos de risco existentes, estar em bom estado de conservação, proteção e desempenho para não expor os usuários a riscos devido à falha do equipamento. Dentre as opções de EPIs, podem-se destacar óculos e protetores

faciais, luvas de segurança, protetor auricular, respiradores e calçados de segurança.

Todos os usuários do laboratório devem receber treinamento sobre o uso, limpeza, manutenção e vida útil dos equipamentos de proteção. O treinamento deve ser registrado e repetido sempre que detectada a necessidade.

É responsabilidade do usuário do laboratório:

- Utilizar o EPI adequado ao risco de cada atividade realizada;
- Usar o EPI apenas para a finalidade a que se destina;
- Não utilizar EPIs, como jalecos e luvas, que foram usados em áreas contaminadas em áreas públicas;
- Substituir imediatamente o equipamento caso esteja danificado e;
- Realizar a manutenção e higienização periódica do EPI que utiliza.

7. ACESSO E PERMANÊNCIA AO LABORATÓRIO

O acesso ao laboratório é restrito aos membros da equipe autorizados ou àqueles por eles acompanhados.

Todos os membros da equipe deverão dispor de item de identificação com foto de seu titular e informações quanto ao seu nível de acesso em todos os momentos que estiverem na Unidade, exceto em circunstâncias em que essa prática represente risco à saúde e segurança.

O acesso de visitantes as instalações só permitido após autorização prévia concedida pelo gestor do Centro de Recursos Biológicos ou por pessoa por ele designada. Além disso, é necessário que o visitante esteja identificado de acordo com o nível de risco de bioproteção a que ele tem acesso.

É de suma importância que cada membro da equipe, incluindo pessoal não técnico, esteja completamente informado sobre os riscos presentes em cada laboratório e treinado nas ações descritas no plano de resposta a incidentes, para que saibam agir em caso de violação de segurança.

É extremamente importante considerar que os riscos operacionais na área de trabalho do laboratório são muito altos, portanto, não apenas a garantia de treinamento e qualificação pode reduzir esses riscos, mas também as atitudes pessoais de cada membro da equipe. Assim:

1. Por razões de segurança, evite trabalhar sozinho no laboratório;

2. Sempre que não houver funcionários nos laboratórios eles deverão ser trancados;
3. O último usuário a sair do laboratório deve confirmar que todos os equipamentos estão desligados e desconectados da fonte de alimentação (exceto o que não são instruídos a desligar) e que as torneiras de gás ou água estão fechadas, as luzes apagadas e as portas de acessos internas do laboratório estão trancadas.

8. MANUTENÇÃO DAS INSTALAÇÕES

A organização e limpeza do laboratório são benéficas à saúde e segurança dos usuários e ajuda a melhorar a produtividade e a qualidade das atividades e processos no local. Para garantir a validade do estudo, as condições a seguir devem ser atendidas:

- Manter as portas fechadas durante a execução das atividades;
- A área de trabalho deve estar limpa e livre de materiais estranhos;
- Limpar e sanitizar a superfície das mesas e balcões antes e depois do trabalho de cada dia, utilizando álcool a 70° GL;
- A assepsia de equipamentos e bancadas é limitada a colaboradores que foram treinados especificamente para usar o equipamento;
- As áreas de circulação devem ser mantidas organizadas, limpas e livres;
- Materiais, reagentes e equipamentos devem ser acondicionados de forma correta;
- O material a ser analisado deve ser tocado apenas com instrumentos estéreis e nunca com as mãos;
- Após o uso, o equipamento deve ser limpo e armazenado, se aplicável, de acordo com procedimentos técnicos e/ou manuais para este fim;
- Os reagentes derramados devem ser limpos imediatamente e de maneira segura;
- Quando não estiver em uso, todos os recipientes de produtos, inclusive produtos químicos, devem ser mantidos fechados.
- Todos os frascos contendo produtos devem ser identificados;
- Os materiais descartados devem ser colocados em locais apropriados e rotulados;

- As saídas de emergência devem sinalizadas e mantidas desbloqueadas. Seu uso só é autorizado em caso de emergência;
- As áreas próximas a extintores de incêndio, hidrantes, chuveiro de emergência, lava olhos e painéis de energia devem ser sinalizadas e o ambiente ao redor deve ser mantido desobstruído;
- Os pertences e itens pessoais devem ser armazenados em locais específicos para essa finalidade.

9. MANUTENÇÃO DOS EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos, instrumentos de medição e sistemas computadorizados utilizados devem ter configuração, capacidade, localização e instalações corretas.

Ao adquirir equipamentos e instrumentos de medição, o operador deve considerar as informações corretas de operação fornecidas pelo fabricante, como gráficos, manuais e instruções concisas de uso. As instruções de uso devem ser arquivadas e estarem disponíveis para consulta sempre que necessário.

Os equipamentos da URMICRO devem ser operados por pessoal comprovadamente treinado através de registros de frequência em treinamentos.

É importante que os equipamentos estejam calibrados, evitando falhas na execução da atividade.

9.1. Equipamentos e instrumentos de precisão

- Realizar calibração dos mesmos;
- As balanças devem estar sempre niveladas;
- Os termômetros de reserva devem ser armazenadas em local fresco e seco;
- Eletrodo de pHmetro deve ser mantido sempre protegido e imerso em solução de cloreto de potássio 3M quando não estiver sendo utilizado;
- Banho-maria e estufas devem estar sempre limpos e organizados para que ocorra a distribuição regular de calor por todo o equipamento.

9.2. Equipamentos elétricos

- Todos os equipamentos devem ter identificação de voltagem em local de fácil visualização;

- Não ligar equipamentos elétricos antes de verificar a voltagem correta e não utilizar quando não houver identificação de voltagem;
- Só operar equipamento quando fios, tomadas e plugues estiverem em perfeitas condições e o fio terra estiver ligado;
- Não operar equipamentos elétricos em superfície úmida;
- Verificar periodicamente a temperatura do conjunto plugue-tomada. Se detectar alguma anomalia, desligar o equipamento e comunicar ao responsável;
- Somente pessoal treinado e qualificado por reparar ou modificar equipamentos elétricos ou eletrônicos;
- Não deixar equipamentos elétricos ligados fora do horário de trabalho;
- Remover frascos de produtos inflamáveis das proximidades do local onde serão usados equipamentos elétricos.

9.3. Bico de Bunsen

- Antes de acender a chama, verificar possíveis vazamentos, dobra no tubo de gás, ajuste entre o tubo de gás e suas conexões e existência de inflamáveis ao redor;
- Guardar todos os materiais combustíveis e inflamáveis apropriadamente antes de acender a chama;
- Não acender a chama com válvula de gás combustível muito aberta;
- Apagar a chama imediatamente após a conclusão da atividade e toda vez que precisar se afastar dela.

10. PRODUTOS QUÍMICOS

Geralmente, os laboratórios usam diferentes substâncias químicas, que podem causar danos à saúde e segurança dos trabalhadores, dependendo de suas características químicas, físico-químicas e precauções relacionadas ao uso dessas substâncias.

10.1. Considerações gerais sobre manuseio, identificação e armazenamento de materiais e produtos químicos em laboratório:

- Antes de usar qualquer produto químico, leia com atenção todas as informações disponíveis no rótulo;

- Não remova, substitua ou danifique o rótulo do produto químico;
- Os reagentes ou soluções preparadas e as amostras coletadas devem ser identificadas imediatamente;
- Os materiais devem ser armazenados de acordo com as especificações contidas no rótulo, em área de pouca umidade, ao abrigo da luz ou qualquer outra fonte de calor, e quando necessário, manter sob refrigeração;
- Os produtos químicos devem ser armazenados levando-se em consideração a compatibilidade entre eles;
- Todos os frascos que contêm soluções ou reagentes devem ser rotulados com o nome do produto, data de aquisição ou preparação e responsável pela solução. Quando necessário, adicionar informações sobre os riscos, perigos e condições de segurança durante o processo;
- Ao misturar produtos químicos, considerar a toxicidade do produto mais perigoso;
- Não armazenar produtos, integral ou parcial, fora do período de validade;
- Sempre lavar as mãos após realizar atividades com produtos químicos, mesmo que sejam utilizadas luvas;
- Sempre utilizar os EPIs adequados.

11. DESCARTE DE MATERIAIS E RESÍDUOS

Cada tipo de resíduo demanda precauções específicas para o descarte de acordo com sua composição química. Assim, algumas sugestões são:

- Não descartar nenhum tipo de resíduo antes de verificar o local apropriado para esse fim;
- Evitar jogar produtos químicos na pia do laboratório;
- Não descartar líquidos inflamáveis em esgoto;
- Descartar vidraria quebrada em recipiente adequado e identificado;
- Esvaziar e limpar o frasco de reagente, com materiais apropriados, antes de coloca-lo na solução de limpeza;
- Descontaminar os materiais utilizados em análise microbiológica antes do descarte.

12. PROCEDIMENTOS DE EMERGÊNCIA

UFLA/DCA – Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos

O manuseio incorreto de produtos químicos e materiais frágeis, o não cumprimento das regras de segurança, a pressa em obter resultados e o uso inadequado dos equipamentos de segurança coletivo e individual são causas frequentes de acidentes em laboratório. Para evitar acidentes e garantir um ambiente seguro é extremamente necessário seguir corretamente as Boas Práticas de Laboratório e manter equipamentos de emergência em bom estado de conservação e funcionamento, seguindo o descrito:

1. Os usuários precisam saber onde estão os equipamentos comuns de segurança e emergência (extintores de incêndio, kit de primeiros socorros, lava-olhos, chuveiros de emergência e saídas de emergência) e entender como operar em situações necessárias;
2. Nos laboratórios que utilizam reagentes nocivos à pele e aos olhos, lava-olhos e chuveiros de emergência devem estar disponíveis e com fácil acesso a todo tempo;
3. O laboratório deve ser equipado com número suficiente de extintores de incêndio para o tipo correto de materiais manipulados;
4. Todos os equipamentos de emergência devem ser verificados regularmente e o registro de inspeção deve ser fixado ao equipamento.

Entretanto, mesmo seguindo as normas estabelecidas e com risco mínimo, o usuário pode ser vítima de acidentes e é necessário ter conhecimento sobre os procedimentos de emergência.

É necessário que todos os usuários sejam treinados e estejam familiarizados com as técnicas de primeiros socorros, estando aptos a agir em caso de acidentes. Após os primeiros socorros, a vítima deverá ser conduzida ao hospital dependendo da gravidade da situação.

12.1. Derramamento de produtos químicos

O procedimento a ser seguido em caso de derramamento de produtos químicos dependerá da quantidade de produto e dos riscos associados a esse produto. Dentre as medidas iniciais, estão:

1. Interromper imediatamente o trabalho e isolar a área, se possível;
2. Informar aos outros usuários sobre o ocorrido;

3. Efetuar a limpeza após consultar a ficha de emergência do produto e, apenas se estiver disponíveis todos os EPIs e materiais necessários para a correta execução do procedimento;
4. Analisar a causa que levou ao acidente e corrigir, se aplicável;

12.2. Ferimentos

Em caso de ferimentos com materiais perfuro-cortantes, deve-se:

1. Controlar a hemorragia, aplicando-se uma compressa diretamente ao ferimento;
2. Elevar a área afetada para controlar o sangramento, se possível;
3. Retirar todo material estranho que se encontre no ferimento, no caso de cortes superficiais;
4. Enviar a vítima ao hospital, se necessário.

Obs.1: À medida que a compressa ficar encharcada de sangue, adicionar mais compressas sobre ela e nunca retirá-la para realizar a troca.

12.3. Ingestão de substâncias perigosas

Para todo e qualquer substância ingerida, deve-se:

1. Determinar o produto ingerido e consultar a Ficha de Informação de Segurança para Produtos Químicos – FISPQ;
2. Adotar as medidas de primeiros socorros determinadas pela FISPQ;
3. Disponibilizar ajuda médica imediatamente, atentando-se para levar a FISPQ do produto.

12.4. Queimaduras

As queimaduras são classificadas em grau, sendo primeiro, segundo e terceiro grau a depender das camadas da pele atingidas. Cada grau de queimadura e tipo de lesões irá requerer um procedimento específico. Contudo alguns pontos são comuns a todos, sendo eles:

1. Lavar o local com água fria em abundância ou no caso de queimadura de 3º grau utilizar compressas úmidas. É importante resfriar o local;
2. Seque o local e faça um curativo com compressas limpas, com cuidado de não pressionar a lesão;

3. Não oferecer alimentos, bebidas e/ou remédios a vítima;
4. Não estourar bolhas e/ou remover roupas grudadas a pele;
5. Encaminhe a vítima para o hospital, caso necessário.

13. DOCUMENTOS

Os documentos devem ser adequados para comprovar o armazenamento seguro e a recuperação rápida de dados originais, planos de estudo, registros de auditoria, dentre outros.

O controle de documentos inclui o estabelecimento de padrões e a verificação de conformidade, para que as informações do laboratório possam ser bem gerenciadas. Esses padrões garantem que os documentos sejam analisados, publicados, modificados, aprovados ou não, em condições controladas para evitar o uso de documentos desatualizados ou não avaliados. Além de garantir a segurança, confidencialidade e rastreabilidade dos dados, esses procedimentos também garantem a identificação clara de testes e quaisquer registros no laboratório.

Algumas diretrizes são indicadas para uma boa gestão de documentos de laboratório, sendo elas:

- Manter atualizados os documentos do Sistema de Gestão da Qualidade: Manual da Qualidade, Procedimento Operacional de Apoio (POA) e Procedimento Operacional Padrão (POP);
- Cadernos de protocolos, artigos, projetos e relatório de pesquisa devem ser mantidos no laboratório;
- Estabelecer padrões para definir limites entre documentos institucionais e pessoais;
- Não manter arquivos pessoais no laboratório, mas caso não seja possível, arquivá-los em local separado e destinado para esse fim;
- Estabelecer pastas ou dossiês com documentos pessoais dos pesquisadores do laboratório.

14. HISTÓRICO

Versão	Data	Natureza da Mudança
1		Criação do documento

15. CONTROLE DE APROVAÇÃO

Elaboração	Revisão	Aprovação
Anna Clara C L Damasceno		Luís Roberto Batista
		Curador
Data:	Data:	Data: