



I CURSO DE SEQÜENCIAMENTO

NOÇÕES DE BIOSSEGURANÇA  
E  
REGULAMENTAÇÃO DA CTNBIO

MSc. MICHELY C.DINIZ

FORTALEZA FEVEREIRO-2008

# BIOSSEGURANÇA

-1970: Asilomar / Califórnia

-1993: WHO definiu como:

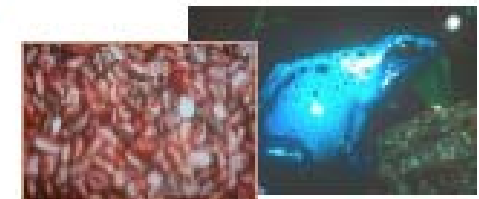
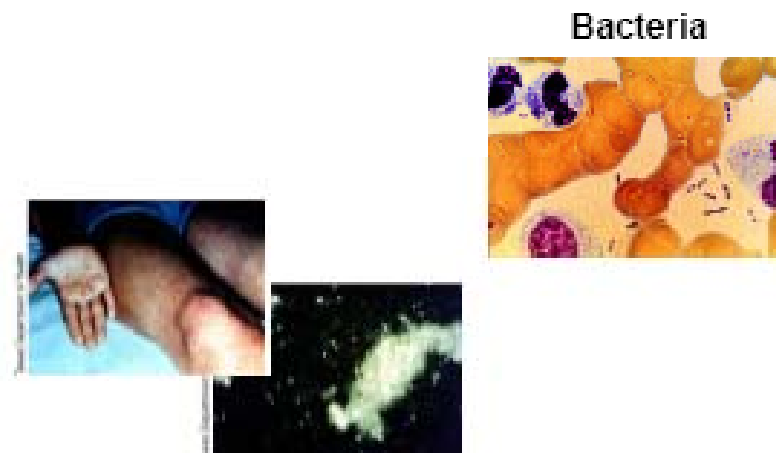
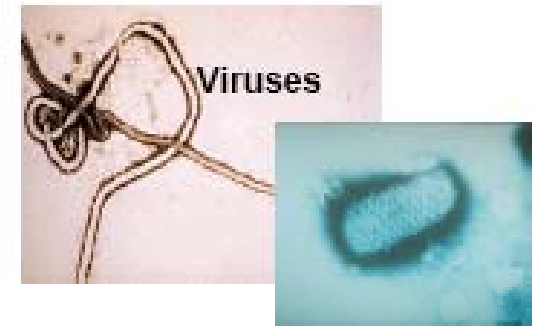
"práticas preventivas para o trabalho com agentes patogênicos para o homem".

***“A Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, a preservação do meio ambiente e a qualidade dos resultados”***

**(TEIXEIRA e VALLE, 1996)**



# RISCO BIOLÓGICO



# MICROORGANISMOS E GRUPOS DE RISCO

**Grupo 1 (NB-1):** Microrganismos que, até o momento, não causam doenças para o homem (baixo risco individual e coletivo) e que não representam riscos para o ambiente (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Saccharomyces*, *Bacillus polymyxa*, cepas não patogênicas de *E. coli*, dentre outros);



# MICROORGANISMOS E GRUPOS DE RISCO

**Grupo 2 (NB-2):** Microrganismos que podem causar doenças no homem, mas a exposição laboratorial raramente produz doença. Mesmo assim, para essas doenças existem medidas profiláticas e terapêuticas eficientes (Espécies de *Salmonella* (exceto *S. typhi*), *E. coli* patogênicas, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Listeria*, dentre outros);



# MICROORGANISMOS E GRUPOS DE RISCO

**Grupo 3 (NB-3):** Microrganismos que podem causar doenças graves no homem e apresentam risco elevado para os laboratoristas. Eles podem apresentar riscos de serem disseminados para a população, mas para as doenças causadas existem medidas profiláticas e terapêuticas eficazes (*Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetti*);



# MICROORGANISMOS E GRUPOS DE RISCO

**Grupo 4 (NB-4):** Microrganismos que causam doenças humanas severas e apresentam risco elevado para os laboratoristas e para a população em geral. Eles são agentes altamente infecciosos que se propagam facilmente, podendo causar a morte das pessoas infectadas, pois não existem atualmente medidas profiláticas ou tratamentos efetivos (Vírus Ebóla).



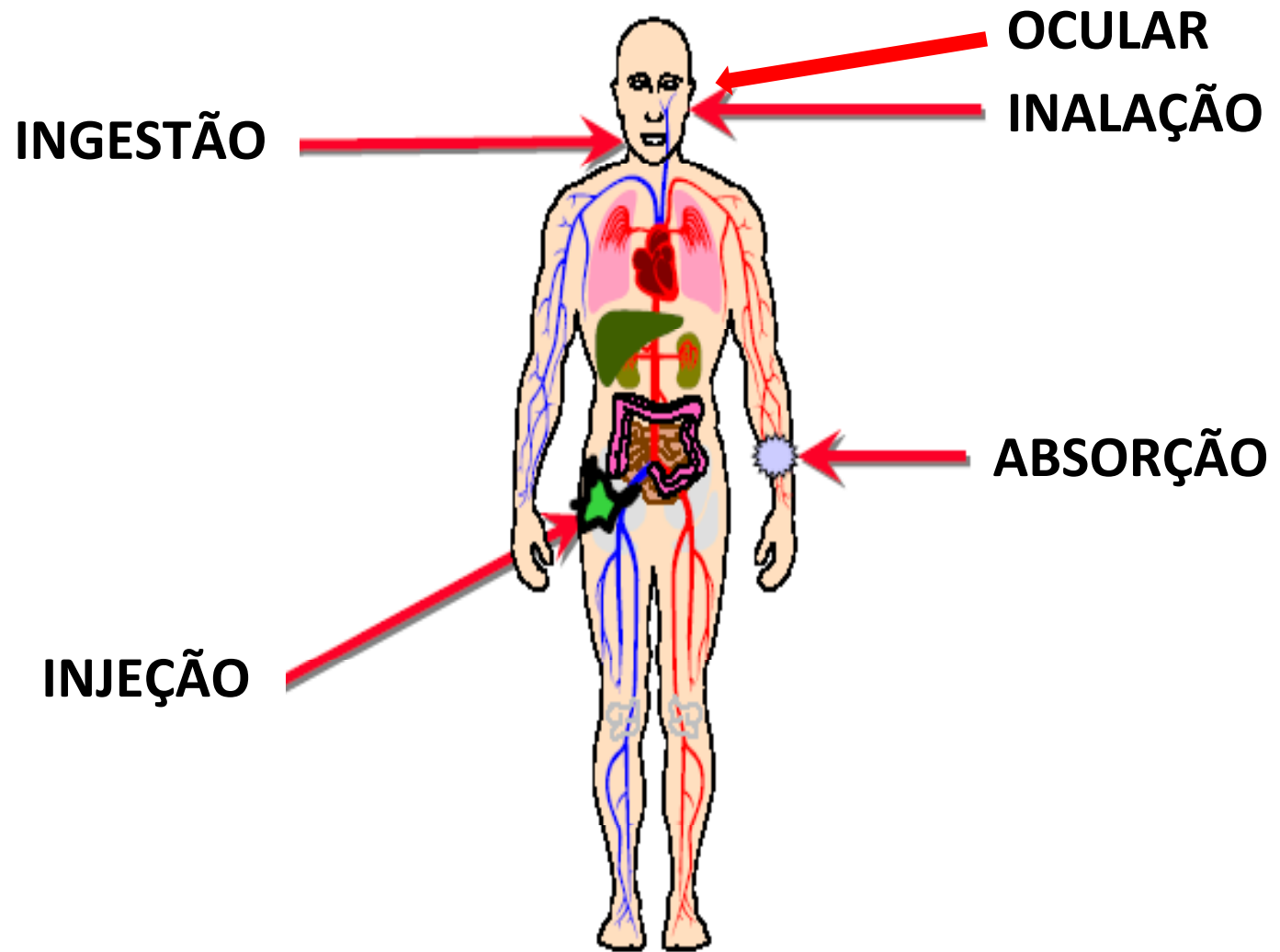
# RISCO QUÍMICO



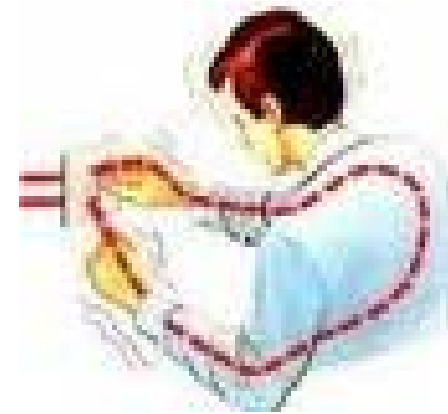




# ROTAS DE ENTRADA



# RISCO FÍSICO



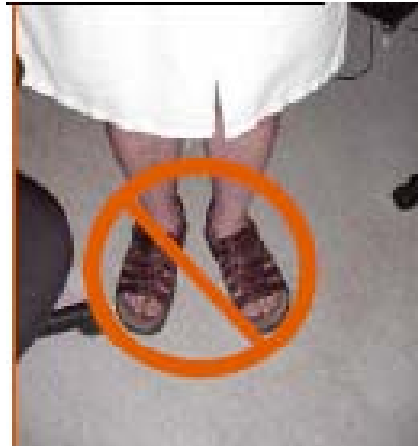


# BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

- Observância de práticas e técnicas microbiológicas padronizadas.
- Conhecimento prévio dos riscos.
- Treinamento de segurança apropriado.
  - Manual de biossegurança/POP (identificação dos riscos, especificação das práticas, procedimentos para eliminação de riscos).

# PREVENINDO ACIDENTES EM LABORATÓRIO

## CONDUTAS:



# PREVENINDO ACIDENTES EM LABORATÓRIO

## EQUIPAMENTOS (EPIs):





# PREVENINDO ACIDENTES EM LABORATÓRIO

## EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA (EPC):



# MEDIDAS DE CONTROLE EM AMBIENTE E EQUIPAMENTOS

## CONCEITOS:

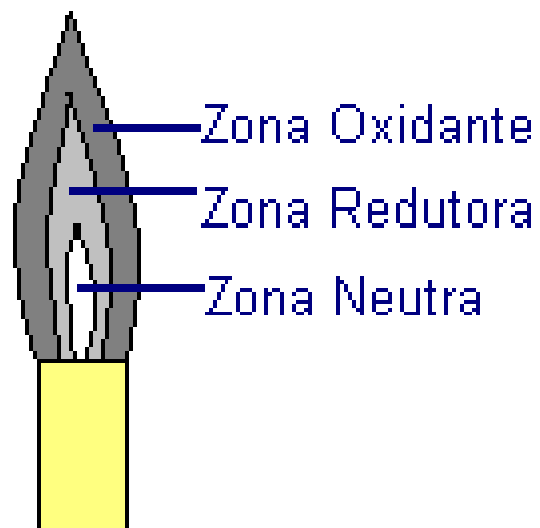
- **Assepsia:** é o conjunto de medidas adotadas para impedir que determinado meio seja contaminado.
- **Anti-sepsia:** é a eliminação das formas vegetativas de bactérias patogênicas de um tecido vivo.
- **Limpeza:** é a remoção da sujeira de qualquer superfície, reduzindo o número de microrganismos presentes. Esse procedimento deve obrigatoriamente ser realizado antes da desinfecção e/ou esterilização.





# MEDIDAS DE CONTROLE EM AMBIENTE E EQUIPAMENTOS

## Bico de Bunsen/Flambagem



# MEDIDAS DE CONTROLE EM AMBIENTE E EQUIPAMENTOS

- **Desinfecção:** é um processo que elimina microrganismos patogênicos de seres inanimados, sem atingir necessariamente os esporos.

- **Esterilização:** é um processo que elimina todos os microrganismos: esporos, bactérias, fungos e protozoários. Os meios de esterilização podem ser físicos ou químicos.



# MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO



⇒ Calor Úmido (Autoclave): vapor sob pressão (1 à 2 atmosferas). Tempo de 15 à 30 minutos. Temperatura de 121 à 132 °C.

⇒ Calor Seco (Estufa): tempo de 1 hora à 170°C ou 2 horas à 160°C, sem a abertura da mesma durante o processo.

⇒ Processos Químicos: **óxido de etileno** por 4 horas; **glutaraldeído 2%** por 10 horas e solução de **formaldeído 38%** por 18 horas.





## COMO TRATAR ?

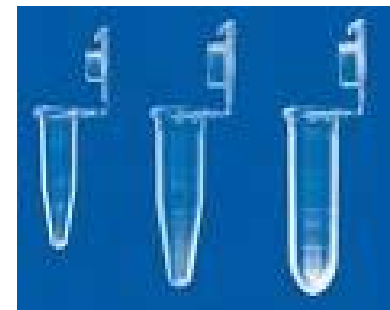
- VIDRARIAS
  - Lavagem com água e sabão
  - Enxágüe com água destilada
  - Secagem em estufa



# COMO TRATAR ?

- MATERIAL PLÁSTICO
  - Ponteiras e tubos sem fenol/clorofórmio:  
Lavagem com hipoclorito de sódio , água corrente e água destilada
  - Ponteiras e tubos com fenol/clorofórmio:  
Descarte em recipiente separado

-Tubos de PCR



# COMO TRATAR ?

## Outros materiais

- Instrumentos cortantes
- Culturas de bactérias
- Resíduos de Fenol/Clorofórmio
- Resíduos de géis agarose/poliacrilamida
- Resíduos de  $\text{AgNO}_3$





## COMO TRATAR ?

- EQUIPAMENTOS, BANCADAS E PIAS
  - Observar manual de cada equipamento
  - Dependendo do procedimentos isolar bancadas
  - Álcool 70% - 90%

# PRINCIPAIS SÍMBOLOS



**Símbolos para sinalização de laboratórios**

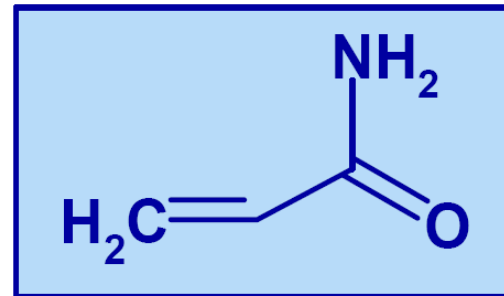
 EXPLOSIVO	 RISCO RADIOATIVO	 TÓXICO			
 PERIGO DE CHUVA	 RISCO BIOLÓGICO	 COMBURENTE			
 INFLAMÁVEL	 CORROSIVO	 IRRITANTE			
 USO OBRIGATÓRIO DE LUVAS	 USO OBRIGATÓRIO DE BOTAS	 NÃO FUMAR			
 NÃO COMER OU BEBER	 PROIBIDA A ENTRADA DE PESSOAS NÃO AUTORIZADAS	 PROIBIDO A ANIMAIS			



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- ACRILAMIDA

(2-propenamida; ethylene carboxamide; acrylic amide; vinyl amide; acrylamide)



-Produzida desde 1950

-Obtida da hidratação da acrilonitrila



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- USO ACRILAMIDA
  - Gel de eletroforese
  - Tratamento de esgotos e efluentes
  - Agente selante em construções civis
  - Indústria de papel
  - Cosméticos e artigos de higiene



## REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- Desastre ambiental na Escandinávia, Suécia (1997)
- Mortandade de peixes , paralisia do gado
- Trabalhadores com dormência e formigamento
- Formação de ACM em alimentos, derivados de cocção, e em queima de cigarros
- Não foi confirmado ser cancerígeno a humanos a partir de alimentos
- Neurotoxicidade em camudongos e em humanos expostos no trabalho (SFC, 2002)



## REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

Acrilamida é suspeita de ser carcinogênica, severamente neurotóxica, causar irritação dos olhos, pele (é imediatamente absorvida) e trato respiratório.

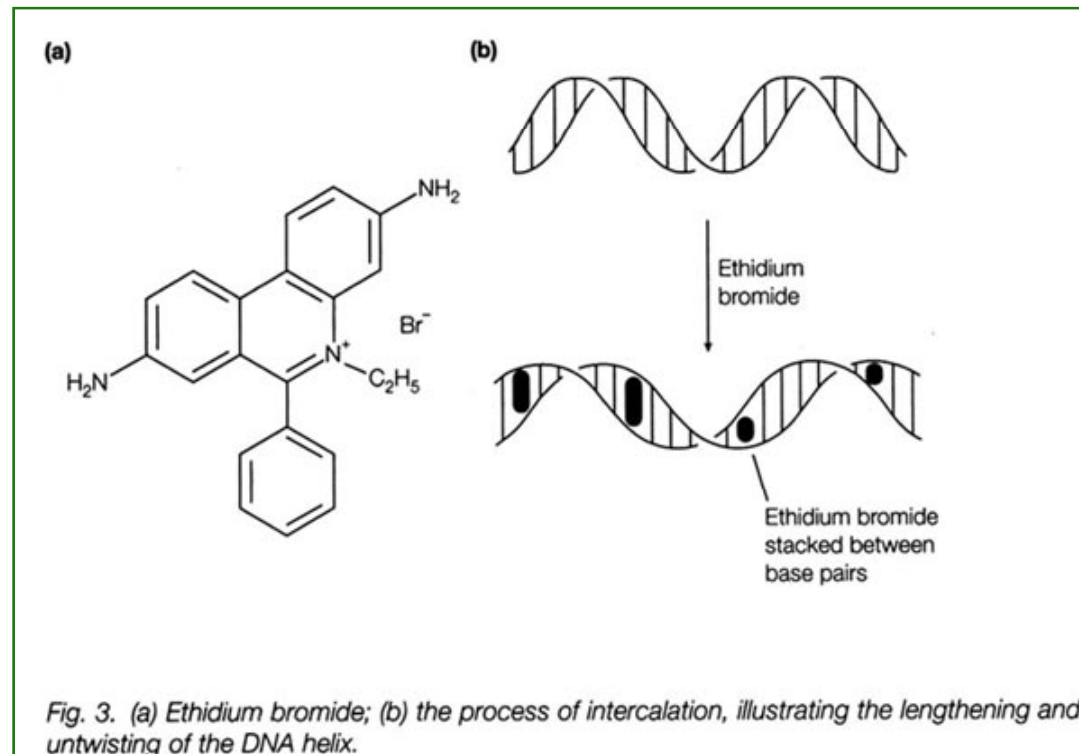
- Cuidado ao pesar acrilamida e bis-acrilamida
- Poliacrilamida teoricamente não é prejudicial
- Descarte em recipiente apropriado



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- BROMETO DE ETÍDEO

(homidium bromide; dromilac; 3,8-diamino-5ethyl-6-phenyl phenanthridinium bromide; ethidium bromide)



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- EtBr

“...é reconhecido que os etídeos e seus análogos **não são aptos para coloração de ácidos nucléicos em células vivas nos quais a membrana está intacta**, exceto para células permeabilizadas ou com grandes concentrações de corante. Conseqüentemente o **EtBr** ((Tanke, et al., J. IMMUNOL. METH. 52, 91 (1982)) , o **idodeto de propídeo** ((U.S. Pat. No. 5,057,413 to Terstappen et al. Oct. 15, 1991 U.S. Pat. No. 5,314,805)) e seus **homodímeros de etídeo** (Live/Dead.RTM. kit, U.S. Ser. No. 07/783,182 to Haugland, et al., filed Oct. 26, 1991) U.S. Pat. No. 5,314,805, têm sido usados extensivamente para detectar e quantificar células comprometidas ou mortas” *Phenanthridium dye staining of nucleic acids in living cells US Patent Issued on August 1, 1995.*



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- EtBr

Dynamical Change of Mitochondrial DNA Induced in the Living Cell by Perturbing the Electrochemical Gradient *Biophysical Journal* Volume 71 November 1996

*“Ethidium bromide was shown to enter into living cells and to intercalate stably into mitochondrial DNA (mtDNA), giving rise to high fluorescence”.*





**CUIDADO AO MANIPULAR O BROMETO  
DE ETÍDEO!!!! PROVÁVEL AÇÃO  
CANCÊRÍGENA!!!!**



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- Descontaminação EtBr

## ***1. Descontaminação para soluções contendo >0,5 mg/ml***

-Baseado no método descrito por Lunn e Sansone (1987) - redução em 200 vezes a atividade mutagênica confirmada em ensaio de microsomo com Salmonella – **Ácido hipofosforoso e nitrito de sódio**

- Quillardet e Hofnung (1987) - redução em 3000 vezes a atividade mutagênica –  $\text{KMnO}_4$



# REAGENTES QUE MERECEM DESTAQUE EM LBM ...

- Descontaminação EtBr

## ***2. Descontaminação de soluções diluídas (tampão do gel contendo 0,5 µg/ml)***

- Baseado no método descrito por Lunn e Sansone (1987): **resina amberlite XAD-16** (absorvente polimérico não-iônico)
- Baseado no método descrito por Bensaude (1988): **carvão ativado**
- Alternativa: **SYBER GREEN**



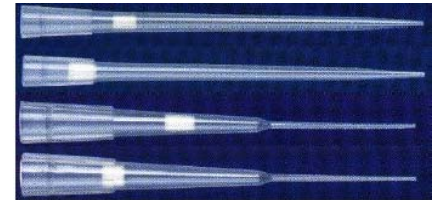
# ESPAÇO FÍSICO IDEAL PARA LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

- 1) Preparação das amostras (extração RNA e DNA)
- 2) Sala de pré-PCR (preparação do “mix” da reação)
- 3) Sala de PCR
- 4) Pós- PCR (eletroforese e fotodocumentação)



## EVITANDO CONTAMINAÇÕES DAS AMOSTRAS

- Sempre usar luvas, trocando-as freqüentemente.
- Material livre de DNases e RNases (microtubos, ponteiras).
- DNA: Usar ponteiras com barreiras.
- Minimizar a geração de aerossóis pela rápida centrifugação dos microtubos antes de abri-los (*spin*).
- Reagentes e *buffers* - usar sempre uma alíquota nova (fracionar os reagentes).
- Especial atenção com a água utilizada (ultra-pura)



# EVITANDO CONTAMINAÇÕES DAS AMOSTRAS

## RNA

- Trabalhos com RNA devem ser realizados em área isolada no laboratório (micropipetadores, ponteiros, microtubos, solução tampão e demais reagentes).
- RNA: Vidraria: cozinhar em forno a 180°C durante várias horas ou lavar com DEPC a 0,1% (em água ou em etanol) por 1 hora.





| [Página Inicial](#)

| **CTNBio**

A CTNBio é uma instância colegiada multidisciplinar, criada com a finalidade de prestar apoio técnico consultivo e de assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos conclusivos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados.

- ▣ **Composição - Membros da Comissão**
- ▣ **Composição - Secretaria Executiva**

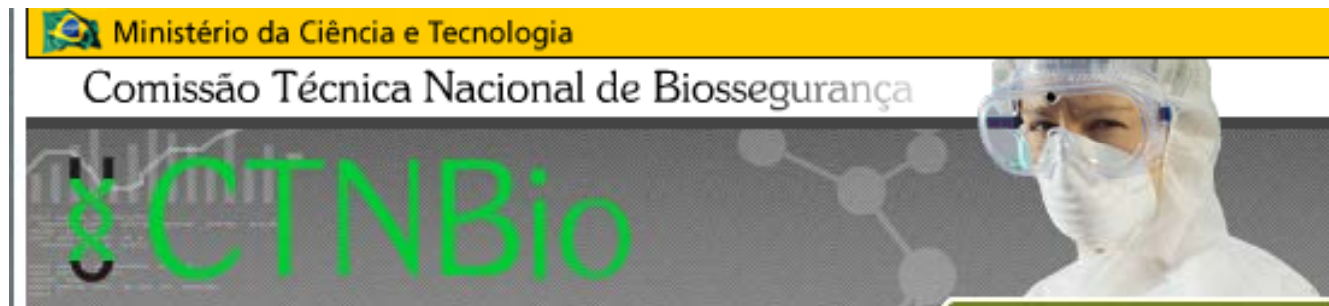
<http://www.ctnbio.gov.br/>



*Lei N°11.105, DE 24 DE MARÇO DE 2005.*

### *LEI DE BIOSSEGURANÇA*

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

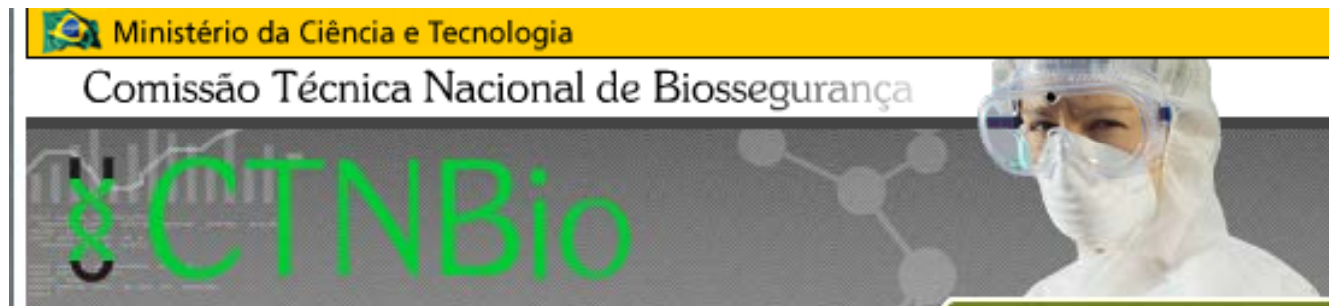


“Art. 8º Fica criado o **Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS**, vinculado à Presidência da República, órgão de assessoramento superior do Presidente da República para a formulação e implementação da Política Nacional de Biossegurança – PNB.

§ 1º Compete ao CNBS:

- I – fixar princípios e diretrizes para a ação administrativa dos órgãos e entidades federais com competências sobre a matéria;
- II – analisar, a pedido da CTNBio, quanto aos aspectos da conveniência e oportunidade socioeconômicas e do interesse nacional, os pedidos de liberação para uso comercial de OGM e seus derivados;
- III – **avocar e decidir, em última e definitiva instância**, com base em manifestação da CTNBio e, quando julgar necessário, dos órgãos e entidades referidos no art. 16 desta Lei, no âmbito de suas competências, sobre os processos relativos a atividades que envolvam o uso comercial de OGM e seus derivados;”





“Art. 11. A CTNBio, composta de membros titulares e suplentes, designados pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, será constituída por **27 (vinte e sete) cidadãos brasileiros** de reconhecida competência técnica, de notória atuação e saber científicos, com grau acadêmico de doutor e com destacada atividade profissional nas áreas de biossegurança, biotecnologia, biologia, saúde humana e animal ou meio ambiente; “

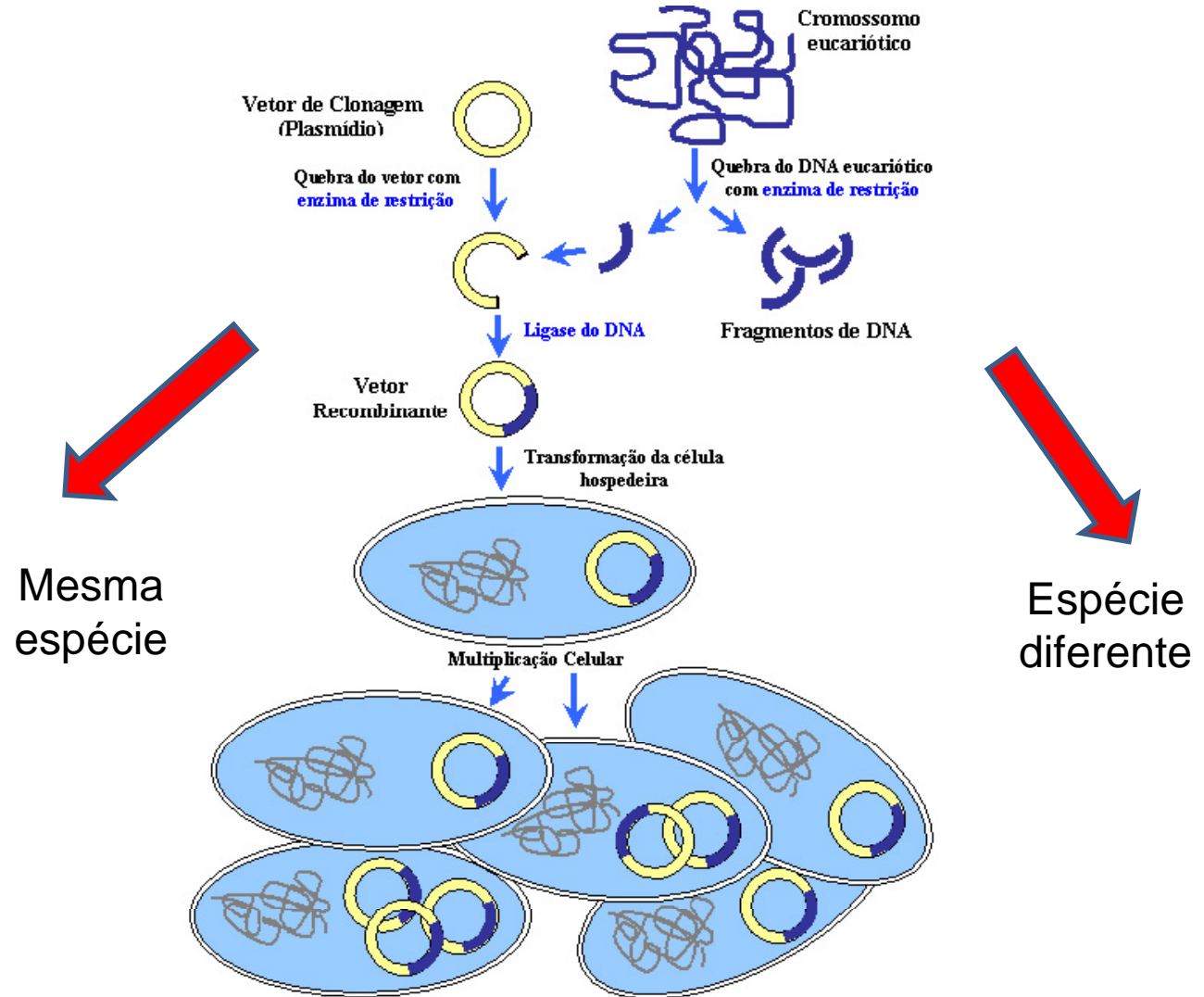


**“Art. 3o Para os efeitos desta Lei, considera-se:**

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

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

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





Todo transgênico é um OGM, mas  
nem todo OGM é transgênico!

## Críticas a Lei de Biossegurança

- Contaminação por agroquímicos
- Definições obscuras: Proteína heteróloga

“§ 2o Não se inclui na categoria de derivado de OGM a substância pura, quimicamente definida, obtida por meio de processos biológicos e que não contenha OGM, **proteína heteróloga** ou ADN recombinante.”

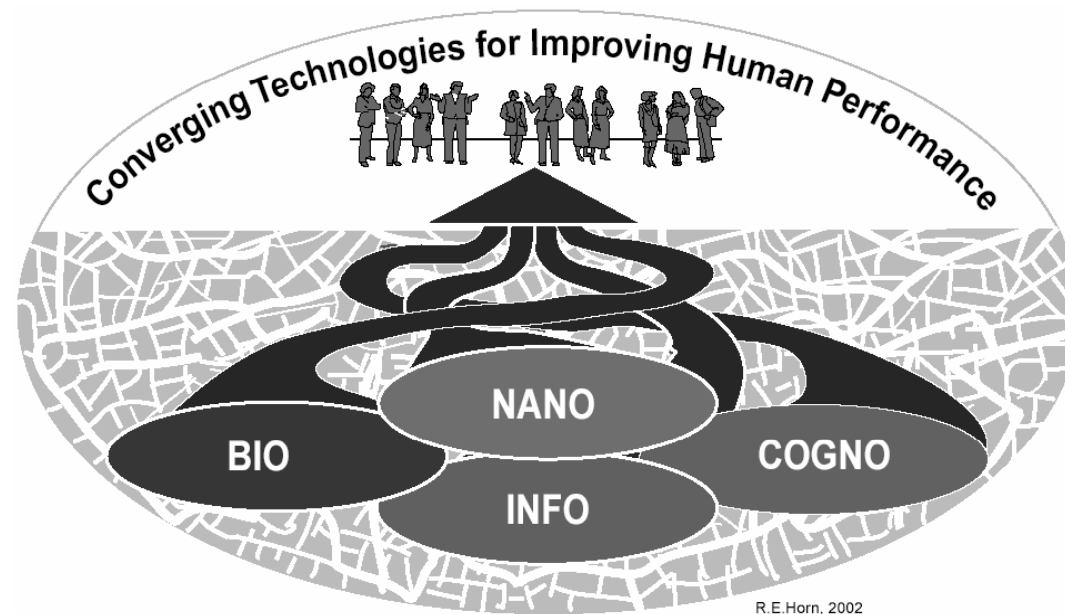
“VI – derivado de OGM: produto obtido de OGM e que não possua capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM;”

Caso da Insulina





- Não faz menção às tecnologias convergentes



- Nanotecnologia

-Tecnologia da informação

- Tecnologia das ciências cognitivas



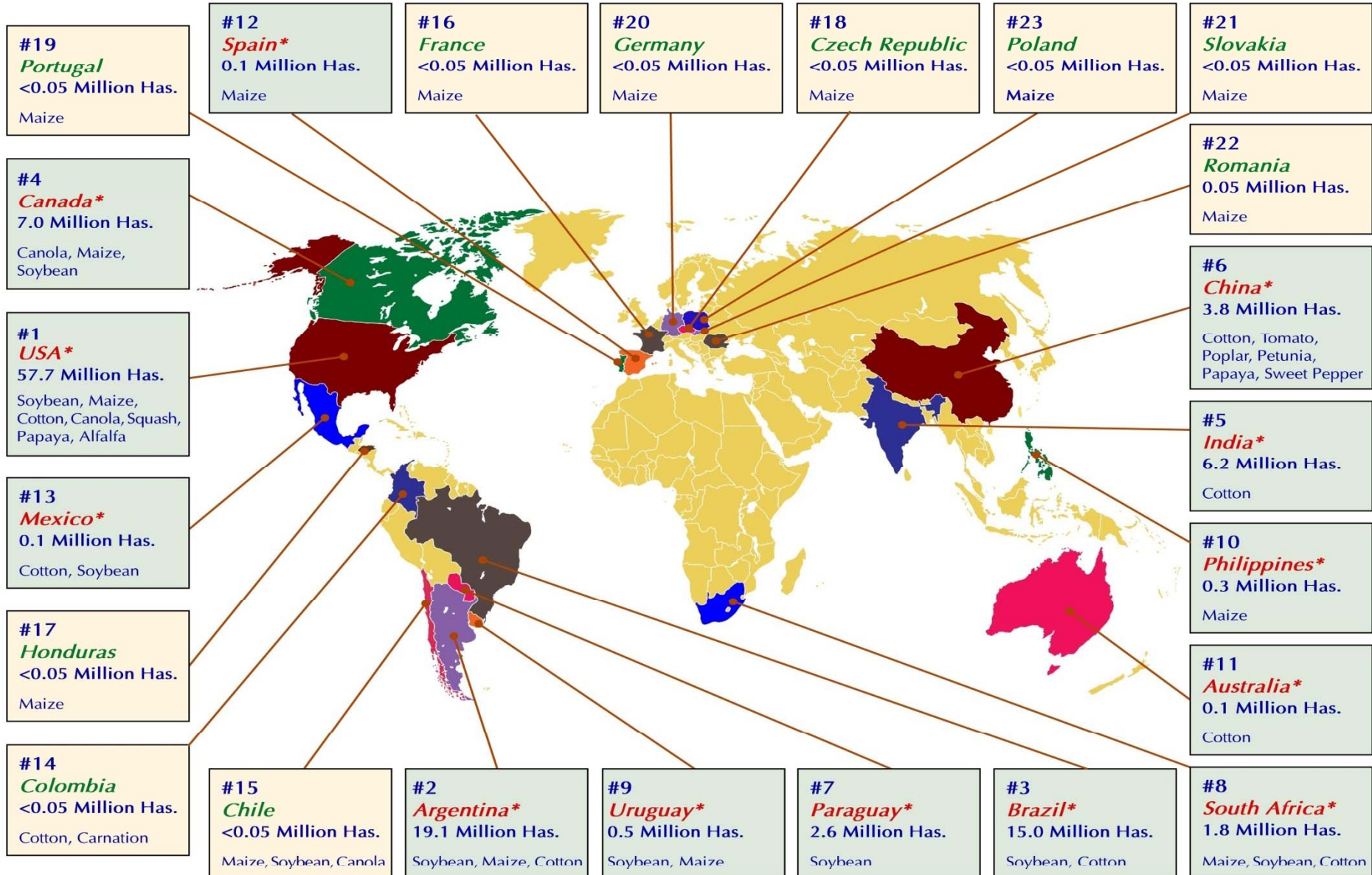
"Situação Global de Comercialização de lavouras geneticamente modificadas: 2007", elaborado pelo Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA, na sigla em inglês)

“O Brasil foi o país que mais avançou no mundo em área plantada com transgênicos em 2007. Foram 3,5 milhões de hectares acima do ano anterior, superando o crescimento na Índia, na China e nos Estados Unidos.”

"O Brasil foi o que mais cresceu e será um líder mundial de transgênicos", diz Clive James, presidente do conselho diretor do ISAAA”

Soja e Algodão

# Biotech Crop Countries and Mega-Countries\*, 2007

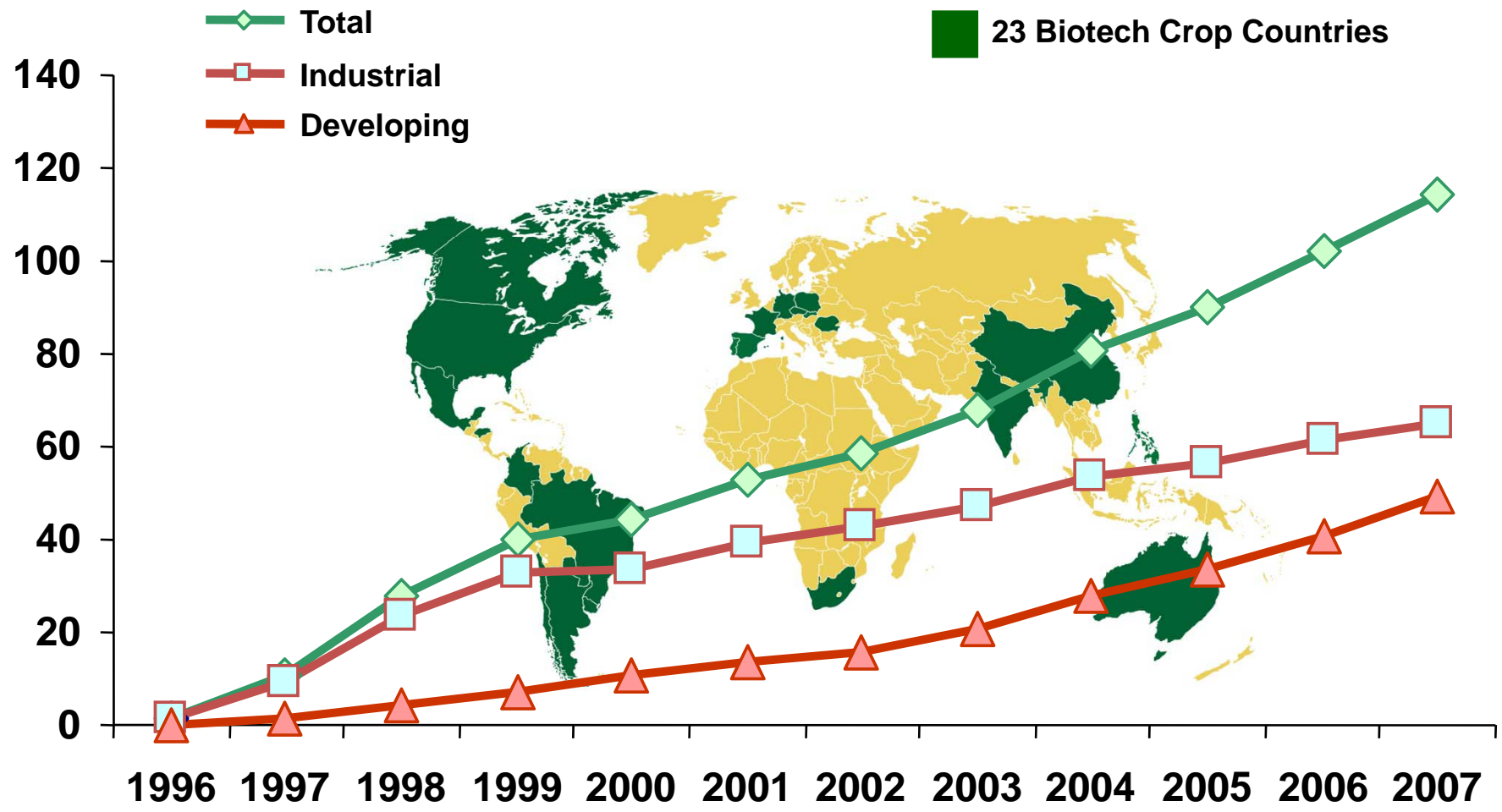


\* 13 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

Source: Clive James, 2007



# GLOBAL AREA OF BIOTECH CROPS Million Hectares (1996 to 2007)



***Increase of 12%, 12.3 million hectares (30 million acres), between 2006 and 2007.***

Source: Clive James, 2007.



**“É melhor prevenir  
do que remediar”**

**MICHELYDINIZ@YAHOO.COM.BR**