

Câmara de Exaustão para utilização em microscópio estereoscópico

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Jaime Cora
Diva Maria de Alencar Dusi

Introdução

As tarefas de rotina em laboratórios exigem muita atenção e precisão por se tratarem de atividades que, muitas vezes, envolvem materiais tóxicos ou de risco biológico.

Em um laboratório de microscopia, os procedimentos para preparação de espécimes a serem observados por microscópios de luz ou eletrônicos, envolvem a fixação do material biológico, desidratação em acetona ou etanol e inclusão em resinas plásticas ou derivadas de parafina, seccionamento e posterior coloração. Acrescente-se a isto uma pós-fixação em tetróxido de ósmio, se a intenção é observar o material em microscópio eletrônico de transmissão.

Neste procedimento de processamento citológico e histológico, a fixação é uma das etapas mais importantes, pois permite preservar as estruturas morfológicas das células e tecidos. A fixação depende de mecanismos físico-químicos nos quais os componentes macromoleculares dos tecidos e das células passam por um processo de insolubilização, causando sua estabilização e inativação. A fixação é feita por substâncias químicas das mais diversas funções orgânicas, que reagem quimicamente com os componentes celulares, promovendo a sua estabilização molecular. Na maioria das vezes, os fixadores agem sobre essas moléculas coagulando-as ou tornando-as insolúveis e, conseqüentemente, precipitando-as nos tecidos de origem (CARVALHO e ,H, e PIMENTEL, Shirlei, 2001).

Existem muitos compostos químicos que podem ser utilizados como agentes fixadores, podemos citar: a acetona, aldeídos (formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído), ácido pícrico, ácido crômico, bicloreto de mercúrio, álcoois (CARVALHO e PIMENTEL, *et al*, 2001). A associação destas substâncias químicas em soluções fixadoras potencializam sua capacidade de fixação. Existem várias misturas fixadoras descritas, cuja eficiência para estudos específicos está

comprovada, como exemplo temos o fixador de Carnoy, uma mistura de etanol e ácido acético, muito utilizado nos estudos de citogenética que compreendem visualização de complexos DNA/Proteína (CARVALHO e PIMENTEL, *et al*, 2001).

As metodologias de fixação mais utilizadas incluem a fixação em soluções tamponantes contendo aldeídos, sendo as misturas de paraformaldeído e glutaraldeído ou formaldeído e álcool, as mais utilizadas. Tampões como cacodilato de sódio e fosfato são muito utilizados. Enquanto o tampão fosfato é inofensivo à saúde humana, o tampão Cacodilato de Sódio, composto por aproximadamente 50% de arsênico, é causador de grande sensibilidade alérgica e provavelmente cancerígeno, é prontamente absorvido pela pele, (BOZZOLA e ,J./RRUSSEL,L, 1991).

Também os agentes fixadores são muito tóxicos, O fixador formaldeído, é conhecido por causar na cavidade nasal, carcinomas, depois de inalado, assim como muitos outros tipos de cânceres de pele com sua exposição contínua. Em adição ao formaldeído, o glutaraldeído, sensibiliza

moléculas que sozinhas ou por combinação reagem com o grupamento aldeído, causando alergias respiratórias ou dermais (BOZZOLA e ,J./RRUSSEL,L, 1991).

O ácido acético, outro agente utilizado em solução como agente fixador, pode ser absorvido por inalação de vapores. Na evaporação a 20°C, alcança rapidamente uma concentração nociva no ar. É muito corrosivo aos olhos, pele trato respiratório, podendo originar edemas pulmonares. Sua exposição prolongada ou repetida, pode também produzir dermatites e irritabilidade (Fichas Internacionales de Seguridad QuímicaINTERNATIONAL..,1994). A exposição a químicos, no nosso caso solventes voláteis, pode ocorrer mediante contato direto, através das mãos, inalação de vapores ou de pós, olhos ou mucosas, sendo portanto imprescindível durante sua manipulação a utilização de equipamento de segurança, como aventais, luvas e câmara ou capela de exaustão.

Enquanto a desidratação e inclusão podem ser efetuadas na capela de exaustão, a fixação do material com utilização de microscópio estereoscópico (lupa), nem

sempre é possível de ser feita dentro da capela.

Na prática, o espécime a ser fixado tem tamanho microscópico sendo algumas vezes translúcido caso contrário, seu tamanho deve ser reduzido, de tal forma a permitir que o agente fixador penetre em todo o material e, posteriormente, que a inclusão seja total. A coleta deve ser feita de forma que o material seja fixado imediatamente e toda manipulação de corte para redução de tamanho deve ser feita já na solução de fixação.

Em nosso laboratório, trabalhamos com materiais muito delicados e microscópicos como ovários de plantas, óvulos bovinos, bactérias, vírus, fungos, nematóides. Desde a coleta e fixação, é desejável minimizar qualquer contato com reagentes tóxicos contidos nas soluções de fixação. Nestes casos, a capela de exaustão se torna inadequada por se tratar de materiais muito pequenos e delicados, inviabilizando seu processamento ou observação em fluxo forte, ou pela inexistência no laboratório de lupa de tamanho e configuração adequados à utilização em capela de exaustão. A utilização do mesmo espaço de capela por

vários usuários pode também ser fator limitante à utilização desta para coletas, procedimento longo na maioria das vezes.

Foi desenvolvida então uma câmara de exaustão própria para ser acoplada em microscópios estereoscópicos com a finalidade de remover vapores do ar e minimizar o contato da pessoa com o agente fixador, durante a coleta e fixação de material. Este equipamento, de baixo custo, descrito abaixo, permitiu aos usuários do laboratório um trabalho mais salubre.

Descrição do Equipamento

Câmara de exaustão

A câmara de exaustão foi desenhada para adaptar-se a microscópios estereoscópicos diversos da seguinte forma:

O material utilizado para o corpo da caixa é o acrílico transparente com 2 mm de espessura. As dimensões básicas são 21 cm de comprimento, 33 cm de largura 17 cm de altura. Na parte posterior está conectado na posição reversa um ventilador de capacidade de fluxo moderada. (ver especificação). Ao

ventilador liga-se a uma mangueira de borracha (diâmetro e espessura) que conduz o ar para o ambiente externo.

Em cada lateral existe uma abertura de 15 cm de diâmetro feita para se inserir as mãos para manipular a amostra. Esta abertura possui um sistema de fechamento (porta).

Na parte superior há uma abertura de 8 cm de diâmetro calculada para encaixe da lente objetiva do microscópio estereoscópico.

O peso do equipamento sem a mangueira é de 18Kg.

Mecanismo de ação:

A câmara deve ser acoplada ao microscópio, e a mangueira de borracha conectada ao ventilador. Ao ser ligado, o ventilador promove um fluxo moderado de ar de dentro para fora da caixa. Este ar entra pela mangueira que o conduz ao ambiente externo, onde é liberado. O ar de dentro da câmara é renovado através das aberturas laterais por onde também se manuseia a amostra. Assim, ao se manipular dentro da câmara as amostras e o fixador, os vapores por este emitidos (ou as substâncias volatizadas) são retirados pelo fluxo de ar, promovido pelo ventilador.

Validação do equipamento

A validação do equipamento foi feita medindo-se os gases formados pelo contato do ar com os agentes fixadores etanol, ácido acético, paraformaldeído 10% (10 g em 100 mL de água, solubilizado com gotas de NaOH 10 N.

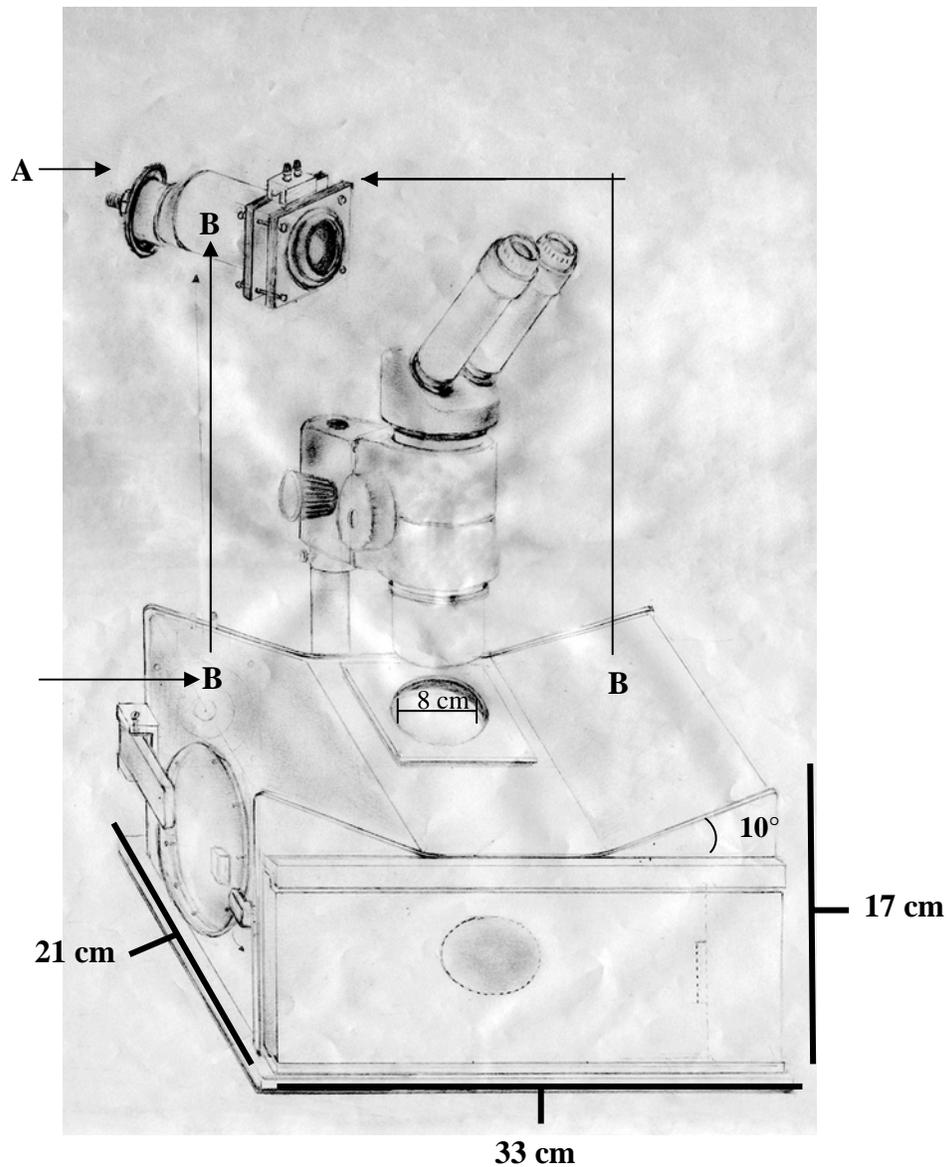
As medições foram feitas com tubos detectores de gases de precisão. Para medição de gás de etanol foi utilizado o tubo de especificação toximeter/ F1 com faixa de medição de 100 -3000 ppm lote 215316 – MAS – AVER. Para medição de gás de ácido acético e de paraformaldeído foi utilizado o tubo n. 2165 certified model 42CFR84, faixa de medição de 1- 50 ppm lote 223111 – KITAGAWA.

Para verificar vapores de fundo, foi feita uma medição no ambiente dos gases inflamáveis fosfina (PH₃), monóxido de carbono (CO) e ácido sulfídrico (H₂S). Também como controle foram feitas medições específicas para cada agente fixador utilizado, antes de sua exposição ao ambiente. Aproximadamente 10 ml de cada amostra foi colocada em placa de Petri. Foram feitas medidas com a placa posicionada fora da câmara

de exaustão e dentro da câmara, neste caso com as portas laterais abertas e o ventilador ligado. As medidas foram tomadas em três posições; central, à distância de 20-25 cm acima da amostra numa angulação de aproximadamente 45° com o eixo vertical, posição esta da face de uma pessoa que estivesse observando ao microscópio; lateral esquerda, na altura da abertura da lateral esquerda; lateral direita, na

altura da abertura da lateral direita.

Os tubos de detecção de gases foram colocados em uma bomba de medição de gases - Bomba Kwik Draw - MAS part n 487500 - Mine Safety Appliances Company - Pensylvania USA, que permite amostragens de gases e vapores no ambiente e as medidas tomadas de acordo com o fabricante, em cinco bombadas de 1 minuto num total de 5 minutos.



Resultados e Discussão

A medição de gases inflamáveis mostrou a ausência dos mesmos no ambiente. As medidas específicas para etanol, formaldeído e

ácido acético referentes a uma medição estão reproduzidas na tabela 1.

Tabela 1 – quantidade de gases em ppm liberados para cada agente fixador nas medições nas posições

central (c), lateral esquerda (e) e lateral direita (d). amb

= Ambiente antes da exposição.

Fixadores	Medição (ppm)				
	fora da câmara	dentro da câmara			
	amb	c	c	e	d
Etanol	0	150	0	0	0
Paraformaldeído 10 %	0	0,5	0	0	0
Ácido acético	0	15	0	0	0

A ausência de gases na medida ambiente sem as amostras mostra que não existe outra fonte dos gases a serem medidos no local em que serão feitas as medidas.

Fora da câmara, e na posição central as dosagens em ppm são bastante altas considerando o tempo curto de exposição (5 min). Cada gás tem um limite de tolerância (LT) fixado pela NR – 15 do Ministério do Trabalho e Emprego do Brasil para uma jornada de 8 horas diárias. Para álcool etílico, 780 ppm, formaldeído, 1,6 ppm e ácido acético, 8,0 ppm.

Nota-se que pelas aberturas laterais esquerda e direita nenhum vapor de gás foi liberado..

Conclusão

Num laboratório de microscopia, a exposição contínua a agentes químicos, extremamente voláteis e altamente tóxicos, durante o

processamento de amostras, desde a sua coleta e fixação até a observação, podem causar irritação das mucosas, dermatites, alergias, dormência na ponta do nariz, perda temporária do olfato, irritabilidade e irritabilidade dos olhos e constantes dores de cabeça (referencia.)

Fixadores como etanol e ácido acético, ao serem volatilizados produzem vapores com odor característico que permite sua detecção no ar mesmo sem qualquer equipamento de medição de vapor. Outros, o paraformaldeído por exemplo, podem passar despercebidos pelo olfato humano. Quando se utiliza a câmara de exaustão, é evidente a ausência de odores no ambiente

A demanda por condições de trabalho salubres e ainda assim ágeis implicou no desenvolvimento do equipamento aqui descrito, que permite a execução de atividades de rotina de

maneira mais segura e prática.

A câmara de exaustão fornece proteção contra gases tóxicos liberados pelo etanol, formaldeído e ácido acético, durante o processamento de amostras para a microscopia tanto para quem executa o processamento quanto para os que estão presentes no mesmo ambiente executando outras atividades.

Referências Bibliográficas

1. BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, D. L. (1991), **Electron Microscopy.**

Principles and Techniques for Biologists. London: Jones and Bartlete, London.1991.

2. CARVALHO, F. H.; PIMENTEL, R. S. (2001), **A Célula.** São Paulo: Manole, São Paulo.2001.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS).: **FISQ 1-011:** Acido Acetico. [Espanha]: IPCS, CCE, 1994. Fichas Internacionales de Seguridad Química.

3. Fichas Internacionales de Seguridad Química, CCE-IPCS, 1994

<p>Comunicado Técnico, 140</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 http://www.cenargen.embrapa.br e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2005):</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p>Presidente: <i>Maria Isabel de Oliveira Penteado</i></p> <p>Secretário-Executivo: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p> <p>Membros: Arthur da Silva Mariante Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteado Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos Carneiro</p> <p>Supervisor editorial: <i>Maria da Graça S. P. Negrão</i></p> <p>Normalização Bibliográfica: <i>Maria Iara Pereira Machado</i></p> <p>Editoração eletrônica: <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i></p>
---	---	--	--