



**MANUAL DE PROCEDIMENTOS
OPERACIONAIS PADRÃO
Lab. Pesquisa Experimental
Biotério
Profa. Dra. Carla Patrícia Carlos**

SUMÁRIO

1. DOSAGENS

Ácido úrico plasmático - POP 1.1	17
ALT (TGP) - POP 1.2	78
AST (TGO) - POP 1.3	76
Creatinina plasmática e urinária - POP 1.4	09
Glicose plasmática - POP 1.5	74
Proteinúria - POP 1.6	14
TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) - POP 1.7	44
Ureia plasmática - POP 1.8	12

2. MANUSEIO DE EQUIPAMENTOS

Autoclave - Esterilização de materiais - POP 2.1	82
Balança digital de pesagem - POP 2.2	42
Banho-maria - POP 2.3	96
Centrífuga - POP 2.4	99
Destilador - POP 2.5	71
Espectrofotômetro - POP 2.6	66
phMetro - Calibração - POP 2.7	49
phMetro - Manuseio - POP 2.8	51

3. PREPARO DE SOLUÇÕES

EDTA 10% - POP 3.1	36
HCl 1N - POP 3.2	34
KCl 3M - POP 3.3	62
Metanol e peróxido de hidrogênio - POP 3.4	30

NaOH 1N - POP 3.5	38
Padrão MDA 400 µM/L para análise de TBARS - POP 3.6	80
Paraformaldeído 4% em tampão fosfato - POP 3.7	40
Tampão Citrato pH 6,0 - POP 3.8	28
Tampão Fosfato pH 7,4 - POP 3.9	26
Tampão Fosfato com soro albumina bovino (PBS + BSA 1%) - POP 3.10	32
Tampão KH ₂ PO ₄ para Análise de TBARS - POP 3.11	46
Tiopental para sacrifício de animais - POP 3.12	64

4. TÉCNICAS, PROCEDIMENTOS, COLETA DE AMOSTRAS E EXPERIMENTOS

Análise da microbiota oral - POP 4.1	87
Análise de bactérias patogênicas em amostras - POP 4.2	54
Análise histopatológica de fragmentos de tecido renal - POP 4.3	60
Coleta de amostra de sangue da veia da cauda de rato - POP 4.4	19
Coleta de amostras de urina, sangue, plasma e tecidos, e sacrifício de animais - POP 4.5 ..	04
Coloração Hematoxilina-Eosina - POP 4.6	57
Cultura de microrganismos em estufa - POP 4.7	85
Imuno-histoquímica - POP 4.8	23
Indução de artrite em animal de laboratório de experimentação - POP 4.9	21
Protocolo de atividade física - Natação - POP 4.10	91
Protocolo de atividade física - Saltos em meio líquido - POP 4.11	94
Silanização de lâminas histológicas - POP 4.12	47

Procedimento Operacional Padrão nº 4.5**POP – Coleta de amostras de urina, sangue, plasma e tecidos, e sacrifício de animais****Data: 25/03/2015****1. Finalidade**

Realizar coleta de amostras de urina, sangue, plasma e tecidos de animais de experimentação.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na mesa de cirurgia, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento**3.1 Gaiola metabólica e coleta de urina**

1. Colocar o animal em gaiola metabólica limpa por 24 horas com becker de 50 mL para coleta de urina. Anotar o horário exato em que o animal entrou na gaiola.
2. Após 24 horas (anotando o horário exato), retirar o animal da gaiola. É importante saber o horário exato, pois será necessário saber o número de minutos para o cálculo do volume urina/minuto (24 horas tem 1.440 minutos).
3. Pesar o animal.
4. Retirar o frasco de urina e medir o volume com uma seringa de 20 mL e anotar na planilha. Transferir a urina para tubos falcon de 15 mL e centrifugar por 10 minutos a 2.500 RPM. Importante: não esquecer de equilibrar os tubos com o mesmo volume antes de centrifugar para não danificar o equipamento.
5. Pipetar o sobrenadante e aliquotar a urina do animal em 4 frascos de eppendorf de 1,5 mL com as devidas identificações da amostra (número do animal, grupo, data etc).
6. Congelar os tubos com as amostras em freezer a -20°C por até 2 meses.
7. O restante da urina pode ser descartado (junto com os tubos falcon) no lixo branco.

3.2 Coleta de sangue e sacrifício

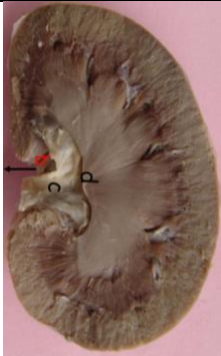
1. Proceder com uma injeção intraperitoneal de anestésico: 50 mg tiopental/Kg (0,1 mL a cada 100 g de peso) ou 10 mg/Kg xilazina + 85 mg/Kg ketamina (volume conforme tabela a seguir).

TABELA DE ANESTESICO & PESO			
Peso (gr)	Ketamina (µl)	Xilazina (µl)	Volume Total (µl)
170	144	85	229
175	149	88	237
180	153	90	243
185	157	93	250
190	161	95	256
195	165	98	263
200	170	100	270
205	174	103	277
210	179	106	284
215	183	108	291
220	187	110	297
225	191	113	304
230	196	115	311
235	200	118	318
240	204	120	324
245	208	123	331
250	213	125	338
255	217	128	345
260	221	130	351
265	225	133	358
270	230	135	365
275	234	138	372
280	238	140	379
285	242	143	385
290	247	145	392
295	251	148	399
300	255	150	405
305	259	153	412
310	264	155	419
315	268	158	426
320	272	160	432
325	276	163	439
330	281	165	446
335	285	168	453
340	289	170	459
345	293	173	466
350	298	175	473
355	302	178	480
360	306	180	486
365	310	183	493
370	315	185	500
380	323	190	513
385	327	193	520
400	340	200	540
415	353	208	561
420	357	210	567
425	361	213	574
450	383	225	608
455	387	228	615
500	425	250	675
600	510	300	810

2. Fixar o animal pelos membros superiores e inferiores em decúbito dorsal a uma mesa cirúrgica.
3. Fazer uma incisão mediana abdominal para identificação e isolamento dos grandes vasos sanguíneos da cavidade abdominal, rins e pedículos renais.
4. Separar um tubo de coleta de sangue (tampa roxa com anticoagulante EDTA), com a identificação da amostra, seringa de 5 mL e agulha hipodérmica roxa 20 x 0,55 mm (24G 3/4). Identificar o tubo com a amostra (animal e grupo).
5. Aspirar o anticoagulante com a agulha e seringa e devolver no tubo (só para molhar com anticoagulante a agulha e evitar que o sangue coagule durante a coleta).
6. Coletar o sangue por punção da veia cava abdominal e transferir para o tubo.
7. A morte do animal ocorre por exsanguinação devido à hemorragia na cavidade com a retirada da agulha.
8. Centrifugar o sangue por 5 minutos a 2.500 rpm. Importante: se forem coletadas amostras de vários animais, manter o sangue na geladeira até o momento da centrifugação.
9. Pipetar o sobrenadante e alíquotar o plasma em 2 ou mais frascos de eppendorf de 0,5 mL, não esquecendo de fazer as devidas identificações da amostra (número do animal, grupo, data etc).
10. Congelar os tubos com as amostras em freezer a -20° C por até 2 meses.

3.3 Coleta de órgãos

1. Após a coleta de sangue, retirar os rins (ou outros órgãos), tomando o cuidado de cobrir a artéria renal com uma gaze antes de extrair o órgão, para não espirrar sangue.
2. No caso da coleta do rim, deve-se retirar a cápsula renal antes de seccionar o órgão.
3. Seccionar o rim em 2 metades com um corte longitudinal.



4. Colocar o órgão em paraformaldeído em tampão fosfato pH 7,4 por 48 horas. O volume de fixador deverá ser 20 x o volume do órgão. No caso do rim, 20 mL é suficiente. Manter em geladeira.
5. Após 48 horas, trocar a solução por álcool 70°. Manter em geladeira até a inclusão em parafina.
6. Descartar o paraformol em recipiente próprio.

4. Armazenamento

Armazenar as amostras de plasma e urina por até 48 horas na geladeira, ou no freezer a -20° C por até 2 meses para análises bioquímicas. As amostras de tecidos podem ser mantidas no álcool 70° por tempo indeterminado.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar ponteiros usadas, tubos e eppendorfs, e seringas de sangue no lixo adequado (branco) e agulhas na caixa descarpack. Descartar as soluções em recipientes próprios para a coleta terceirizada.

Procedimento Operacional Padrão nº 1.4**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE CREATININA NO PLASMA E URINA (PROGRAMA 11)****Data: 28/02/2016****1. Finalidade**

Realizar dosagem de creatinina em amostras de plasma/soro e urina com kit comercial BT 10.007.00 (Biotécnica).

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente;
2. Diluir as amostras de urina a 1:50 (100 microlitros urina + 4,9 mL água destilada);
3. Pipetar em cada tubo 500 ul do reagente A + 500 ul do reagente B e homogeneizar suavemente;
4. Pipetar **100 ul** do padrão, homogeneizar rapidamente e inserir imediatamente no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **500 nm**;
5. Fazer uma leitura da absorbância inicial aos 30 segundos (A1) e uma segunda leitura aos 90 segundos (A2);
6. Proceder da mesma forma com as amostras.

7. O valor de creatinina das amostras de urina diluídas deverá ser multiplicado por 50.

8. Fazer os cálculos.

Cálculos

a. Fluxo Urinário (Volume Urinário/Minuto)

$$VU = \text{Urina (ml)} / \text{Tempo (min)} = \text{ml/min}$$

b. Creatinina da Amostra: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo)

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra (A2-A1)} \times \text{Concentração Padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do Padrão (A2-A1)}}$$

c. Depuração de Creatinina

$$\text{Clearance de Creatinina} = \frac{\text{Creatinina urina (mg/dL)} \times \text{Volume urina (mL/min)}}{\text{Creatinina plasma (mg/dL)}} = \text{mL/min}$$

d. Cálculo da depuração de Creatinina corrigida pelo peso corporal do animal

A depuração de creatinina deverá ser corrigida por cada 100 g de peso corporal do animal conforme abaixo:

$$\text{Depuração de Creatinina} = \frac{\text{Clearance Creatinina} \times 100}{\text{Peso Corporal}} = \text{mL/min/100g}$$

e. Valor dentro da normalidade para o rato: Creatinina do plasma até 1,0 mg/dL e depuração acima de 0,25 ml/min/100g.

5. Garantia de Qualidade:

A absorbância do R1 lida em 510 nm, zerando o aparelho com água purificada deve ser menor

que 0,500. Leituras superiores indicam deterioração do mesmo.

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiras usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.8**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE UREIA NO PLASMA
(PROGRAMA 23)****Data: 28/02/2016****1. Finalidade**

Realizar dosagem de ureia em amostras de plasma/soro com kit comercial BT 10.012.00 (Biotécnica).

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente;
2. Pipetar em cada tubo 800 ul do reagente R1 + 200 ul do reagente R2 e homogeneizar suavemente;
3. Usar um tubo só com o reagente (branco) para calibrar o aparelho.
4. Pipetar **10 ul** do padrão, homogeneizar rapidamente e inserir imediatamente no aspirador do aparelho termostaticado a 37° C e comprimento de onda a **340 nm**;
5. Fazer uma leitura da absorbância inicial aos 30 segundos (A1) e uma segunda leitura aos 120 segundos (A2);
6. Proceder da mesma forma com as amostras.

Cálculo

Ureia da Amostra: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo)

$$\text{Ureia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra (A1-A2)} \times \text{Concentração Padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do Padrão (A1-A2)}}$$

Valor dentro da normalidade para o rato: Ureia do plasma até 45 mg/dL

5. Garantia de Qualidade:

A absorbância do reagente inferior a 0,900 em 340 nm, zerado com água deionizada indica deterioração do mesmo.

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiras usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.6**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE PROTEINÚRIA (PROGRAMA 27)****Data: 28/02/2016****1. Finalidade**

Realizar dosagem de proteína em amostras de urina com kit comercial BT 10.016.00 (Biotécnica).

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente. Tirar o controle positivo do freezer.
2. Identificar cada tubo com o reativo (branco), padrão, controle positivo e amostras;
3. Pipetar em cada tubo 1 mL do reagente;
4. Usar um tubo só com o reagente para calibrar o aparelho.
5. Pipetar **20 ul** do padrão, controle positivo e amostrar.
6. Homogeneizar rapidamente e colocar em banho-maria a 37° C para incubar por **5 minutos**.
7. Inserir no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **600 nm**;
8. Fazer leitura da absorbância. A cor da reação é arroxeada, que é estável até 30 minutos.

Cálculo

Proteína da urina: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo)

$$\text{Proteína (mg/L)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times \text{Concentração Padrão (mg/L)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Valor dentro da normalidade para o rato: Proteína da urina até 100 mg/L

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiros usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.1**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE ÁCIDO ÚRICO NO PLASMA
(PROGRAMA 33)****Data: 20/10/2016****1. Finalidade**

Realizar dosagem de ácido úrico em amostras de plasma com kit comercial BT 10.001.00 (Biotécnica).

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente.
2. Identificar cada tubo com o reativo (branco), padrão e amostras;
3. Pipetar em cada tubo 1 mL do reagente;
4. Usar um tubo só com o reagente (branco) para calibrar o aparelho.
5. Pipetar **20 ul** do padrão e amostrar. Homogeneizar bem.
6. Colocar em banho-maria a 37° C para incubar por **10 minutos**.
7. Inserir no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **505 nm**;
8. Fazer leitura da absorbância. A cor é estável até 15 minutos.

Cálculo

Ácido úrico: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo)

$$\text{Ácido Úrico (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times \text{Concentração Padrão (mg/L)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Valor dentro da normalidade para o rato: 2,5 a 7,0 mg/dL

5. Garantia de Qualidade:

Desprezar o reagente de trabalho caso sua absorvância em 505 nm, medida contra a água for superior a 0,150.

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiras usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 4.4**POP – COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE DA VEIA DA CAUDA DE RATO****Data: 27/10/2016****1. Finalidade**

Realizar coleta de amostras de sangue de animais de experimentação.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na mesa de cirurgia, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. Proceder com uma injeção intraperitoneal de anestésico: 170 mg/Kg ketamina (uma vez e meia a dose habitual). Não usar xilazina para não causar hipotensão.
2. Fixar o animal pelos membros superiores e inferiores em decúbito ventral a uma mesa cirúrgica.
3. Separar um tubo de coleta de sangue (tampa roxa com anticoagulante EDTA), com a identificação da amostra, seringa de 5 mL e agulha hipodérmica roxa 20 x 0,55 mm (24G 3/4).
4. Aspirar o anticoagulante com a agulha e seringa e devolver no tubo.
5. Coletar **200 microlitros** de sangue por punção da veia da cauda e colocar no tubo.
6. Centrifugar o sangue por 5 minutos a 2.500 rpm.
7. Pipetar o sobrenadante e colocar o plasma em frasco de eppendorf com as devidas identificações da amostra (número do animal, grupo, data etc).

4. Armazenamento

Armazenar as amostras de plasma e urina por até 48 horas na geladeira, ou no freezer a -20° C por até 2 meses para análises bioquímicas.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar ponteiros usadas, eppendorfs e seringas de sangue no lixo adequado (branco) e agulhas na caixa descartpack.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.9**POP – INDUÇÃO DE ARTRITE EM ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO****Data: 19/10/2016****1. Finalidade**

Realizar indução de artrite em animais de experimentação.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na mesa de cirurgia, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento**3.1 Preparo do imunizador**

1. Emulsão para 7-8 animais

- Micobactéria H37RV (*Mycobacterium tuberculosis* dissecados, não patogênicos, H37RA Difco CAT 231141, Sigma Aldrich) - 0,005g

- Óleo mineral (Nujol Mantecorp) - 1 mL

- Água destilada - 0,1 mL

2. Transferir a micobactéria para cadinho ou graal, romper membranas celulares com o auxílio do pistilo. Adicionar o óleo mineral e homogeneizar.

3. Na sequência, adicionar a água destilada e com o auxílio de uma seringa de 3 ou 5 mL e agulha preta (0,70 x 30, 22G 1 1/4), puxar o conteúdo e devolver no cadinho inúmeras vezes até obtenção de uma emulsão branca.

3.2 Preparo do animal

4. Proceder com uma injeção intraperitoneal de anestésico: 170 mg/Kg ketamina (uma vez e meia a dose habitual). Não usar xilazina.

5. Colocar o animal em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica.

6. Inocular 0,1mL micobactéria por animal. A inoculação é via intradérmica na planta da pata, em qualquer uma das patas posteriores (padronizar - inocular sempre mesma pata) de um “calinho”/“almofadinha” ao/à outro(a) sentido diagonal. A inflamação sistêmica (\pm 20 dias) se dá quando a pata contralateral também apresenta edema/eritema.

4. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar ponteiros usados, eppendorfs e seringas de sangue no lixo adequado (branco) e agulhas na caixa descartpack.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.8**POP – ENSAIO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA****Data: 27/10/2016****1. Finalidade**

Realizar reação de imuno-histoquímica em tecido parafinizado.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento**3.1 Desparafinização**

Submeter os fragmentos à Desparafinização, conforme abaixo.

- estufa 2h – 60° C
- Xilol I - 15 min
- Xilol II - 15 min
- Etanol 100% - 1 min
- Etanol 80% - 1 min
- Etanol 50% - 1 min
- Água corrente – 1 min
- Água destilada – 1 min

3.2 Recuperação antigênica: *na reação para COX-2 não precisa desta etapa

- Tampão citrato de sódio pH 6,0

* 20 min (96° C banho-maria) OU

1 min pot. max. microondas + pot. média até levantar fervura (± 3 min)

- Esfriar por 20 min, colocando a cuba dentro de um pote com gelo
- Água dest – 3 x 5 min

3.3 Bloqueio da peroxidase

- H₂O₂ (PA) a 3% em metanol – 30 min (180 ml metanol + 20 ml H₂O₂ 30%)

(**no escuro** em câmara úmida)

ou se forem poucas lâminas = preparar 1 mL (900 ul metanol + 100 ul H₂O₂) e pipetar 200 uL em cada corte.

- PBS – 3 x 5 min

3.4 Incubação com Anticorpo Primário

- diluir o anticorpo em PBS-BSA 1% (colocar 50 µl em cada corte, cobrir com parafilm)

- **Macrófago ED-1** 1:500 = T° ambiente 1h, câmara úmida

- **Nitro tirosina** 1:400 = T° ambiente 1h, câmara úmida

- **iNOS** 1:10 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **COX-2** 1:500 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **Anx-1** 1:2000 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **TGF-β** 1:80 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **Vimentina** 1:250 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **Alfa-actina** 1:1000 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **Caspase-3** 1:1000 = 4° C overnight, câmara úmida (vedado com fita crepe)

- **Controle da reação** (negativo): incubar somente com o PBS-BSA

- PBS – 3 x 5 min

3.5 Incubação com Anticorpo Secundário

Kit Invitrogen (pronto para uso para rato, coelho e cabra)

- tirar da geladeira 15 minutos antes:

- colocar 1 gota AC secundário biotinizado (frasco **amarelo**) – 30 min

- PBS – 3 x 5 min

3.6 Incubação com Estreptoavidina conjugada com peroxidase

Kit Invitrogen (pronto para uso para rato, coelho e cabra)

- tirar da geladeira 15 minutos antes:
- colocar 1 gota Estreptoavidina (frasco **rosa no papel alumínio**) – 30 min
- PBS – 3 x 5 min

3.7 Revelação e montagem

DAB – kit Invitrogen (preparar na hora e usar em até 30 minutos, manter ao abrigo da luz)

- 1 ml H₂O destilada + 1 gota tampão (A, tampa verde). Agitar bem.
- 2 gotas DAB (B, tampa marrom) + 1 gota peróxido (C, tampa branca)
- Agitar bem

pipetar 50 µl em cada corte

10 min câmara escura (COX-2 é 5 minutos)

- Água corrente – 5 min
- Água destilada – 5 min
- Hematoxilina de Harris (**filtrada previamente**) – **40 segundos**
- Água corrente – 5 min
- Água destilada – 5 min
- Desidratar:
 - Etanol 95% - 1 min
 - Etanol 100% - 3 x 1 min
 - Xilol 1 min até terminar a montagem
- Montar com Enthelan

4. Armazenamento

Temperatura ambiente, em caixas, por tempo indeterminado.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar ponteiros usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.9**POP – PREPARO DE TAMPÃO FOSFATO pH 7,4****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar tampão fosfato (PBS) de uso em reação de imuno-histoquímica, ensaio ELISA e fixador paraformaldeído.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Pesar os sais (conforme abaixo) e colocar dentro do becker (1 L ou 2 L, conforme o volume a preparar).
- Adicionar o volume de água destilada até quase o total (menos 20 mL aproximadamente).
- Colocar no agitador até diluir.
- Ajustar o pH para 7,4, usando as soluções de NaOH ou HCl, conforme o caso.
- Transferir a solução para balão volumétrico e completar o volume com água destilada.

	<u>1 litro H₂O destilada</u>	<u>2 litros H₂O destilada</u>
NaCl	8 g	16 g
Na ₂ HPO ₄	1,48 g	2,96 g
NaH ₂ PO ₄	0,43 g	0,86 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g	0,40 g

5. Armazenamento

Na geladeira por até 30 dias.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.8**POP – PREPARO DE TAMPÃO CITRATO pH 6,0****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar tampão citrato de uso em reação de imuno-histoquímica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Pesar o sal (conforme abaixo) e colocar dentro do becker (500 mL ou 100 mL, conforme o volume a preparar).
- Adicionar o volume de água destilada até quase o total (menos 10 mL aproximadamente).
- Colocar no agitador até diluir
- Ajustar o pH para 6,0, usando as soluções de NaOH ou HCl, conforme o caso.
- Transferir a solução para balão volumétrico e completar o volume com água destilada.

	<u>500 mL H₂O destilada</u>	<u>100 mL H₂O destilada</u>
Citrato de sódio	1,05 g	0,21 g

5. Armazenamento

Na geladeira até 30 dias.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.4**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE METANOL E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar solução de bloqueio da peroxidase de uso em reação de imuno-histoquímica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Calcular o volume de peróxido a ser utilizado (conforme abaixo).
- Preparar somente no momento do uso e colocar em frasco envolvido em papel alumínio, ao abrigo da luz.

Frasco estoque peróxido = 30%

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$30 \cdot X = 100 \text{ mL} \cdot 3\%$$

X = 10 mL da solução estoque (completar para 100 mL)

Para 200 mL: 180 mL metanol + 20 ml H₂O₂ 30%

Para 1 mL: 900 uL metanol + 100 ul H₂O₂ 30%

5. Armazenamento

Não pode ser armazenado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar a solução em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 3.10**POP – PREPARO DE TAMPÃO FOSFATO COM SORO ALBUMINA BOVINO
(PBS + BSA 1%)****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar tampão de diluição de anticorpo de uso em reação de imuno-histoquímica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Pesar o BSA (conforme abaixo) e colocar dentro de um becker (conforme o volume a preparar).
- Adicionar o volume de tampão fosfato pH 7,4.
- Colocar no agitador até diluir.

PBS + BSA 1% (soro albumina bovino) (Sigma-Aldrich, ref. A2153)

(1% é 1 g em 100 mL PBS)

15 mL PBS 7,4 + 15 mg (ou 0,15 g) BSA

5. Armazenamento

Na freezer a – 20° C por 6 meses.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.2**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE HCl 1N****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar solução ácida para correção de pH de soluções de uso em laboratório.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na capela, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Calcular o volume de HCl da solução estoque a ser diluído (conforme abaixo).
- Completar o volume com água destilada.

Solução de HCl 1N (1 Normal é 1 Molar)

84 mL para cada litro de água

Ou 8,4 mL para completar para 100 mL

5. Armazenamento

Em temperatura ambiente, em frasco de vidro âmbar, por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento, Avental e Capela).
Descartar a solução em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 3.1**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE EDTA 10%****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar solução anticoagulante.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Colocar 0,5 g (500 mg) de EDTA em 3 mL água destilada.
- Colocar no agitador com aquecimento a 60° C.
- Ir gotejando NaOH até diluir totalmente (ficar transparente).
- Completar o volume para 5 mL.

5. Armazenamento

No freezer a – 20° C por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas

- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.5**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE NaOH 1N****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar solução básica para ajuste de pH de soluções de uso em laboratório.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na capela, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Pesar o sal (conforme abaixo) e colocar dentro do becker (500 mL ou 100 mL, conforme o volume a preparar).
- Adicionar o volume de água destilada.

Solução de NaOH 1N

$$1N = \frac{\text{m (g)}}{\text{Peso molecular} \times \text{Volume (L)}} = \frac{X}{40 \times 0,02 L} = 0,8 \text{ g NaOH p/ 20 mL água dest.}$$

Para 100 mL: 4 g NaOH para 100 mL água destilada

5. Armazenamento

Em temperatura ambiente, frasco âmbar por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados. Descartar a solução em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar a solução em local apropriado (vidro de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 3.7**POP – PREPARO DE PARAFORMALDEÍDO 4% EM PBS****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Preparar solução fixadora de tecidos e órgãos para reações de imuno-histoquímica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na capela, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento para preparar 200 mL de fixador

- Colocar 8 g de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) em 90 mL de água destilada na placa aquecedora com agitador a 60° C.
- Gotejar NaOH até branquear e diluir.
- Corrigir o pH para 7,4.
- Completar o volume com água destilada até 100 mL.
- Adicionar 100 mL Tampão Fosfato (PBS pH 7,4).

5. Armazenamento

No freezer a – 20° C, por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento, Avental e Óculos).

Descartar a solução em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 2.2**POP – MANUSEIO DA BALANÇA DIGITAL DE PESAGEM****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Padronizar o manuseio da balança digital.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

- O equipamento é 110 V.
- Desviar a saída do ar condicionado para cima.
- Quando abrir a porta do compartimento de pesagem, aguardar 15 segundos pelo menos para a balança parar de oscilar e equilibrar com o ambiente.
- Caso isso não aconteça, usar o botão de tara.
- Se mesmo assim não parar de oscilar, desligar o ar condicionado.
- Para transportar a balança, retirar o prato de pesagem.
- **Deixar sempre ligada.**
- Caso a balança **seja desligada ou faltar energia:**
- Quando ligar, aguardar 10 minutos para equilíbrio da balança com o ambiente.
- Após esse período, apertar o botão de calibração.

4. Garantia de Qualidade:

Não mover a balança de lugar, e caso isso seja necessário, retirar o prato de pesagem. Verificar se a “gota” indicadora de nivelamento está centralizada, e se não estiver, ajustar a altura dos pés para nivelar a balança na bancada.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.7**POP – DOSAGEM DE TBARS (SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Dosar o estresse oxidativo pela análise de TBARS em amostras de plasma.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Tirar as amostras do freezer.
- Preparar a solução padrão de MDA: 5 mL da solução estoque + 100 mL água destilada.
- Preparar a solução de TBA (ácido tiobarbitúrico, Merck), que dá para 25 amostras:
 - pesar 0,036 g de TBA e diluir em 25 mL de tampão fosfato KH_2PO_4 em agitador magnético
- Adicionar 1 mL da solução de TBA em cada tubo (tubo falcon 15 mL).
- Preparar a solução padrão de MDA: diluir 5 ml da solução padrão MDA 400 μM /l estoque em 100 ml de água destilada.
- Adicionar 500 uL de amostra, padrão e água destilada (branco) no respectivo tubo.
- Caso não tenha 500 uL de amostra, usar metade do volume e depois multiplicar o resultado final por 2.

-
- Aquecer a 94°C em banho-maria por 60 minutos, tampado com bola de gude.
 - Resfriar sobre a bancada por 15 minutos. O tubo branco tem que ficar transparente e o padrão rosa.
 - Adicionar 4 mL de álcool n-butílico em cada tubo. Tampar os tubos e agitar no vórtex.
 - Centrifugar a 2.500 rpm por 10 minutos.
 - Pipetar 3 mL do sobrenadante e transferir para um tubo pequeno (5 mL) para leitura no espectrofotômetro.
 - Zerar o aparelho com o tubo branco.
 - A leitura da absorbância deverá ser realizada em espectrofotômetro a 535 nm, comparada à leitura da absorbância do padrão MDA (malondialdeído 20 uM/L).

- Cálculo do TBARS das amostras:

$$\text{TBARS} = \frac{A_{\text{amostra}} \times 440,61}{A_{\text{padrão}}} = \text{ng/mL ou nmol/mL}$$

- **Importante:** aplicar o fator de correção caso não tenha sido usado 500 uL de amostra.

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar as soluções em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 3.11**POP – PREPARO DE TAMPÃO KH_2PO_4 PARA ANÁLISE DE TBARS****Fosfato monobásico de potássio KH_2PO_4 – Tampão fosfato 75Mm pH 2,5****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Preparo de tampão para diluição de amostras em análise de TBARS.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central e capela de exaustão, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

- Acidificar a água destilada: colocar 1,5 L de água destilada em um becker no agitador magnético e ir adicionando ácido acético ou clorídrico, medindo com pHmetro até atingir o pH 2,5.
- Pesar 10 g de KH_2PO_4 e colocar em 500 mL de água acidificada em um becker até diluir totalmente.
- transferir para um balão volumétrico de 1 L e completar o volume com água acidificada.

4. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 4.12**POP – SILANIZAÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Preparo de lâminas silanizadas para aderência de fragmentos de tecidos usados em reações de imuno-histoquímica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na capela de exaustão, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

Proceder com a imersão das lâminas na seguinte sequência de banhos:

- 1o. banho - Organosilano 4% em acetona PA (serve para até 1.500 lâminas)
- 2o. banho - H₂O destilada
- 3o. banho - H₂O destilada
- 4o. banho - Acetona PA

Secar na estufa.

4. Armazenamento

Em caixas de lâminas por tempo indeterminado.

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental e máscara).
Descartar as soluções em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 2.7**POP – CALIBRAÇÃO DO PHMETRO DE BOLSO KASVI****Data: 18/01/2017****1. Finalidade**

Calibrar o aparelho pHmetro Kasvi antes do uso no ajuste do pH de soluções.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central e capela de exaustão, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. O equipamento é mantido por bateria.
2. Preparar os tampões de pH 4,00, pH 7,00 e pH 10,00.
3. Retire a capa do eletrodo e mergulhe-o em um becker com água destilada por 10 minutos.
4. Ligar o aparelho, pressionando “ON / OFF”. Ver teclas na foto a seguir.



5. A compensação de temperatura do equipamento é automática.
6. Introduzir o aparelho na solução tampão pH 7,00.
7. Pressionar o botão “CAL” por 3 segundo até que o texto CAL apareça no visor; soltar o botão.
8. O medidor irá identificar o valor do padrão e exibirá “7,00” no visor. O resultado será salvo e o texto “SA” será exibido por 2 segundos no visor.
9. Seguir os mesmos passos com os tampões pH 4 e pH 10.
10. Se ao apertar “CAL” aparecer “END” no visor significa que o tampão está ruim e deverá ser substituído.
11. Desligar o medidor pressionando “ON / OFF”.
12. Enxaguar o eletrodo com água destilada.
13. Preencher o compartimento da capa do eletrodo com KCl em gel e cobrir o eletrodo.
14. Guardar o medidor na posição vertical para o gel não extravasar.

4. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade e validade dos tampões a serem utilizados. Manter sempre o medidor em repouso na posição vertical e o eletrodo embebido em KCl em gel. Caso o medidor fique muito tempo sem uso (10 dias), deverá ser colocado por 10 minutos em água destilada. Caso seja usado por um longo período desde a última calibração, deverá ser novamente calibrado.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 2.8**POP – MANUSEIO DO PHMETRO DE BOLSO KASVI****Data: 18/01/2017****1. Finalidade**

Detalhamento de como utilizar o pHmetro Kasvi para ajuste do pH de soluções.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central e capela de exaustão, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. O equipamento é mantido por bateria.
2. Retirar a capa do eletrodo e lava-lo com água destilada.
3. Ou mergulhe-o em um becker com água destilada por 10 minutos, caso tenha sido usado há mais de 10 dias.
4. Ligar o aparelho, pressionando “ON / OFF”.
5. A compensação de temperatura do equipamento é automática.
6. Introduzir o aparelho na solução a ser medida.
7. A leitura do pH aparecerá no visor. Se a tecla “HOLD” for pressionada, a leitura é congelada na tela. Para liberar o medidor, a tecla deverá ser pressionada novamente.
8. Desligar o medidor pressionando “ON / OFF”.
9. Enxaguar o eletrodo com água destilada.
10. Preencher o compartimento da capa do eletrodo com KCl em gel e cobrir o eletrodo.
11. Guardar o medidor na posição vertical para o gel não extravasar.

4. Garantia de Qualidade:

Manter sempre o medidor em repouso na posição vertical e o eletrodo embebido em KCl em gel. Caso o medidor fique muito tempo sem uso (10 dias), deverá ser colocado por 10 minutos em água destilada. Caso seja usado por um longo período desde a última calibração, deverá ser novamente calibrado.

5. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 4.2**POP - Análise de bactérias patogênicas em amostras****Data: 10/11/2016****1. Finalidade**

- Analisar bactérias;
- Quantificar o número de colônias;
- Identificar fatores de patogenicidade como resistência a antibióticos, atividade hemolítica.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central sendo executada a análise pelos alunos de iniciação científica e docentes.

3. Procedimentos Relacionados

- Vide o protocolo para preparo de meio de cultura, soluções, bem como o manual de utilização dos equipamentos.
- Para a realização da coleta e da análise serão necessários os seguintes materiais: Swab, água peptonada, meio de cultura, placas com meio de cultura, autoclave, balança, estufa e microscópio.

4. Procedimento**4.1 Cultura bacteriana**

1. Swab da amostra transportada em água peptonada 0,1%.
2. Centrifugar 3.500 rpm e resuspenso o pellet em 1 mL de caldo BHI.
3. Após crescimento bacteriano semear em placa de ágar nutriente, MacConkey e ágar sangue.

3. Incubar na estufa por 24 ou 48 horas (overnight).

4.2 Coloração de Gram

1. Com alça bacteriológica coletar uma colônia
2. Esfregar o material na lâmina
3. Fixar o esfregaço passando a lâmina (lado oposto ao esfregaço) na chama do bico de bunsen.
4. Cobrir toda lâmina com solução cristal violeta por 1 minuto;
5. Lavar a lâmina com água destilada;
6. Cobrir a lâmina com cristal violeta por 1 minuto;
7. Escorra o lugol e lave em um filete de água corrente;
8. Cubra a lâmina com lugol e deixe agir por aproximadamente 1 minuto;
9. Escorra o lugol e lave em um filete de água corrente;
10. Adicione álcool-acetona sobre a lâmina;
11. Lave em um filete de água corrente;
12. Cubra a lâmina com safranina e deixe agir por aproximadamente 30 segundos;
13. Lave em um filete de água corrente;
14. Deixe secar ao ar livre;
15. Coloque uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço;
16. Analisar em objetiva de imersão (100 x).

4.3. Resistência a drogas antimicrobianas

1. Colônia bacteriana cultivada em 2 mL caldo BHI;
2. Incubar na estufa por 24 h (overnight);
3. Quantificar o crescimento à concentração de $1,5 \times 10^8$ bactéria/mL (escala 0,5 de MacFarland);
3. Semear com swab em placa de ágar Mueller Hinton (Difco);
4. Colocar os discos antimicrobianos na superfície do ágar;
5. Incubar as placas a 37 °C por 18 horas.
6. Realizar a leitura comparando o diâmetro do halo de inibição com os dados do fabricante.

4.4. Pesquisa de produção de hemolisina

1. Colônia bacteriana cultivada em 2 mL caldo BHI;
2. Incubar na estufa por 24h (overnight) a 37°C;
3. Inocular 2 ul da cultura em placas de ágar sangue (5%);
4. Incubar as placas de ágar sangue em estufa a 37°C por 3 e 24 h.

5. Garantia de Qualidade

1. Verificar a temperatura adequada da estufa bacteriológica;
2. Verificar a data de validade dos meios de cultura;
3. Utilizar material autoclavado como: placa de Petri, vidrarias e meio de cultura.

6. Biossegurança

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Lavar as mãos com desinfetante antes e depois do procedimento.
3. Seguir as normas de uso de aparelhos.
4. Desinfetar a bancada de trabalho com álcool 70% no início e término de cada procedimento.
5. Descartar soluções em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.
6. Descartar as placas de petri em local apropriado para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.6**POP – COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Realizar coloração HE em lâminas histológicas.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central e capela de exaustão, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento**Desparafinizar os cortes**

- Estufa - pelo menos 1 hora
- Xilol I - 15 min
- Xilol II - 15 min

Hidratação

- Álcool Absoluto I - 1 min
- Álcool Absoluto II - 1 min
- Álcool Absoluto III - 1 min
- Álcool 70% - 1 min
- Álcool 50% - 1 min
- Água corrente - 1 min
- Água destilada - 5 min

Coloração

- Hematoxilina de Harris – 40 segundos
- Diferenciador - 1 segundo (testar necessidade)
- Álcool 80% - 1 min
- Eosina - 2 min (testar o tempo)
- Lavar as lâminas em água de torneira para retirar o excesso de corante na cuba

Desidratação

- Álcool 95% - 1 min
- Álcool Absoluto I - 1 min
- Álcool Absoluto II - 1 min
- Álcool Absoluto III - 1 min
- Xilol (diafanização) - 1 min

Montagem

- Enthelan

* O tempo de Hematoxilina e Eosina depende da intensidade do corante disponível. Por isso, sempre é necessário testá-los antes de fazer uma bateria de lâminas, pois a coloração pode ficar muito forte ou fraca, dependendo de como o corante foi feito, da idade, etc.

Corantes feitos há pouco tempo, em geral, são mais fortes e por isso o tempo deve ser menor.

5. Armazenamento

Em caixas por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental). Descartar soluções em local apropriado (frasco de descarte) para ser recolhida por serviço especializado.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.3**POP – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS DE TECIDO RENAL****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Realizar análise histopatológica em lâminas de tecidos.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada do microscópio, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

- Os fragmentos renais deverão ser fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 48 h, a 4°C, e transferidos para uma solução de álcool 70°.
- As amostras serão então enviadas para serviço terceirizado, sendo desidratadas em uma série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Secções de 5 µm do tecido, das diferentes condições experimentais, serão obtidas, montadas e numeradas em lâminas, sem identificação das amostras.
- No Laboratório de Pesquisa Experimental da FACERES, serão coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas à microscopia de luz (objetiva de 40 x, Zeiss, “Primo Star”) quanto aos seguintes parâmetros:

- alteração da integridade do tecido: perda da microvilosidade, perda da integridade citoplasmática e nuclear, perda de células tubulares e presença de cilindros hialinos na luz dos túbulos,

- presença de degeneração hidrópica

- presença de células inflamatórias

- As análises serão conduzidas sem que o avaliador conheça a identificação das amostras, e um escore será atribuído conforme segue:

0 = alteração ausente;

1 = $\leq 25\%$ do campo afetado;

2 = 26-50% do campo afetado;

3 = 51-75% do campo afetado;

4 = 76-100% do campo afetado.

5. Armazenamento

Em caixas de lâminas por tempo indeterminado.

6. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

7. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.3**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE KCl 3M****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Preparar solução de repouso para pHmetro.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

- Pesar o sal (conforme abaixo) e colocar dentro de um becker de 100 mL.

Para 100 mL água destilada: 22,35 g KCl

- Adicionar o volume de água destilada e homogeneizar no agitador.

Solução de KCl 3M

1M = $\text{Peso (g) (peso molecular) x 3}$ para 1 L água destilada

Ou 223,5 g KCl em 1000 mL água

4. Armazenamento

Em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.12**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO DE TIOPENTAL PARA SACRIFÍCIO DE ANIMAIS****Data: 28/10/2016****1. Finalidade**

Diluir tiopental para utilização como anestésico de sacrifício animal.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada de cirurgia, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

- Com uma seringa de 20 mL e agulha preta (0,70 x 30, 22G 1 1/4), injetar 20 mL de soro fisiológico no frasco de tiopental.
- Injetar pela via intraperitoneal 0,1 mL de tiopental para cada 100 g de peso do animal.

4. Armazenamento

Em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 2.6**POP – MANUSEIO DO ESPECTROFOTÔMETRO BIO-200 EM DOSAGENS****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Detalhamento de como utilizar o espectrofotômetro BIO-200 para dosagens bioquímicas.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central e capela de exaustão do salão geral, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados

Vide os protocolos para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos kits de dosagem.

4. Procedimento

- O equipamento é 110 V.
- Ao ser ligado, o aparelho executará uma rotina de checagem nos circuitos eletrônicos e ópticos e aguardará 10 minutos para aquecimento e estabilidade dos circuitos.
- Ao decorrer o tempo de aquecimento o aparelho entrará automaticamente em repouso, aumentando consequentemente a vida útil da lâmpada excitadora. Caso haja a necessidade de operar o aparelho antes do tempo de aquecimento, após decorrer 1 minuto depois de ligado aperte a tecla F4[CONT] e o ele entrará em repouso, podendo ser utilizado a qualquer momento.
- Quando o BIO-200 estiver em repouso as seguintes teclas estarão habilitadas (conforme foto a seguir):



- **F1[TEST]** = Ao ser pressionada o BIO-200 estará pronto para executar os testes programados.
- **F2[PROG]** = Ao ser pressionada, poderá ser programado um novo teste no BIO-200. Esta operação necessita de senha para operação, e deverá ser consultada com o responsável pelo laboratório.
- **F3[SERV]** = Ao ser pressionada, uma rotina de vários serviços poderá ser executada no BIO-200.
- **F4[LAVA]** = Ao ser pressionada, a bomba passará a aspirar aproximadamente 2,5 ml pela tubulação de entrada da cubeta de fluxo. Utilize esta tecla para limpeza da cubeta do aparelho.

UTILIZANDO O BIO-200 PARA LEITURAS PROGRAMADAS NA MEMÓRIA

- **Apertar a tecla F1 (TEST).**

- **Aperte F2 (INC) e siga as instruções do display ou aperte a tecla F1 para voltar para traz ou F3 para sair da rotina.**

-
- O cursor estaciona no teste 00 (ABSORBÂNCIA).
 - Apertar a tecla F2 (INC) até encontrar o teste desejado.
 - Apertar a tecla F4 (SEL).
 - NÚMERO DA AMOSTRA: digitar 0001
 - Apertar a tecla F2 (INC).
 - AMOSTRA: ÚNICA (pode alterar para duplicata ou triplicata com tecla >)
 - Apertar a tecla F2 (INC).
 - PADRÃO: SIM (não mudar)
 - Inicia com F4 (SEL)
 - INSIRA ÁGUA (tubo ou becker com água destilada)
 - Start
 - INSIRA BLANK (tubo somente com reagente, quando necessário ou pular esta fase)
 - Start
 - CONFIRMA BLANK?
 - F3 (Sim) 2 vezes
 - INSIRA PADRÃO
 - Start
 - CONFIRMA PADRÃO
 - F3 (Sim) 2 vezes
 - INSIRA A0001 (primeiro tubo com amostra)
 - Start
- Quando acabar todos os tubos:
- Teclar ANT (para sair do programa)
 - CONFIRMA SAÍDA?
 - F3 (Sim) 2 vezes
- Ou F4 (não)
- INSIRA ÁGUA (colocar becker com água destilada)
 - Pressione LAVA

OBS.: fazer esta lavagem 5 vezes para limpar o sistema

-
- O BIO-200 imprimirá e mostrará no display os resultados das leituras.
 - Apertar a tecla F1 (ANT) para voltar ao menu inicial.
 - Deixar o aparelho ligado e sem capa.

UTILIZANDO O BIO-200 PARA LEITURAS EM ABSORBÂNCIA.

- Apertar a tecla F1 (TEST).
- O cursor estaciona no teste 00 (ABSORBÂNCIA).
- Apertar a tecla F4 (SEL).
- O cursor estaciona em WL1: 340.
- Selecione o comprimento de onda (FILTRO) para a leitura, através de F4 (>).
- Apertar a tecla F2 (INC).
- O cursor estaciona em WL2: ****.
- Aperte a tecla F2 (INC) ou selecione através de F4 (>) o segundo filtro, caso deseje leituras bicromáticas.

Obs.: Para leituras com cubeta de fluxo contínuo não é necessário leituras bicromáticas.

- Aperte a tecla F2 (INC).
- O cursor estaciona em RET: ***.
- Digite o tempo (em segundos) do tempo de retardo, mínimo 003 Seg.
- Aperte a tecla F2 (INC), o cursor estaciona em TEMP:37.
- Selecione a temperatura da cubeta com F4 (>).
- O cursor estaciona em VOL: **** , digite o volume de aspiração em microlitros, (de 150 a 2000).
- **Aperte F2 (INC) e siga as instruções do display ou aperte a tecla F1 para voltar para traz ou F3 para sair da rotina.**

- CONFIRMA SAÍDA?

- F3 (Sim) 2 vezes

Ou F4 (não)

- INSIRA ÁGUA (colocar becker com água destilada)

- Pressione LAVA

OBS.: fazer esta lavagem 5 vezes para limpar o sistema

O BIO-200 imprimirá e mostrará no display os resultados das leituras em ABSORBÂNCIA na seguinte forma abaixo:

Parâmetros da programação com 2 linhas na fita da impressora.

BLK-: (Valor da abs. do Blank).

N.A. (Número de amostras)

A-WL1 (Abs. da amostra no filtro primário)

A-WL2 (Abs. da amostra no filtro secundário se for selecionado).

D-(1-2) (Valor da diferença da leitura em WL1 – WL2 (DELTA)).

- Apertar a tecla F1 (ANT) para voltar ao menu inicial.

- Deixar o aparelho ligado e sem capa.

5. Garantia de Qualidade

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas.

- Utilizar tubos novos.

Importante: após dosagens de muitas amostras, fazer a lavagem do sistema com fluido próprio de limpeza, conforme abaixo:

- colocar em um becker 10 gotas de Bioclean Plus em 5 mL de água destilada

- lavar até acabar a solução do becker

- lavar 5 vezes o sistema somente com água destilada

6. Biossegurança

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 2.5**POP – MANUSEIO DO DESTILADOR CRISTÓFOLI****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Detalhamento de como utilizar o destilador de água Cristófoli.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. O equipamento é 110 V.
2. Certifique-se de que o reservatório de água destilada esteja sobre sua base, sem a tampa.
3. Remova o reservatório de água comum, retire a tampa válvula e encha-o com água potável ou filtrada, recoloca a tampa e encaixe o reservatório no gabinete inferior. O uso de água filtrada reduz a formação de resíduos minerais na resistência e facilita manutenção do equipamento. Ver as telas e reservatórios na foto a seguir.



4. Aguarde cerca de 1 minuto para a água encher a bandeja. Conecte o cabo de energia do destilador na tomada e aperte a chave liga/desliga na posição “ON-Reset”. Nesse momento, se o LED indicativo acender, significa que uma das seguintes situações está ocorrendo:
 - A. O recipiente de água comum não está corretamente posicionado, levante e ajuste-o;
 - B. O nível de água na bandeja não está completamente cheio. Mude a chave liga/desliga para a posição “OFF”, espere o LED apagar e volte a chave para a posição “ON-Reset”.
5. Ao iniciar o funcionamento, o *cooler* de resfriamento será ligado e o destilador iniciará o aquecimento que levará de 3 a 5 minutos para começar a destilar a água.
6. Quando o recipiente de água comum estiver vazio, o destilador desligará automaticamente.
7. Depois que o destilador desligar, mude a chave liga/desliga para a posição “OFF”.

8. Ao final do dia de trabalho, desconecte o equipamento da tomada.

Obs.: Se houver queda de energia, o destilador precisará ser reiniciado para continuar a operação quando a energia for restaurada. Para reiniciar o destilador, aperte “OFF” no botão “OFF/ON-Reset”, espere cerca de 3 segundos até que o LED vermelho se apague, então aperte “ON-Reset” no mesmo botão novamente.

4. Armazenamento da água destilada

Por 15 dias dentro do Barrilete da bancada da pia.

5. Garantia de Qualidade

A cada 6 ciclos de destilação

Limpeza da bandeja de água, filtro e resistência:

- Limpe a bandeja de água, a mesma é removível e pode ser lavada manualmente.
- Remova o clip e filtro, em seguida, lave-o em água corrente e guarde-o até montar o conjunto novamente.
- Encha a bandeja de água com vinagre branco e deixe por pelo menos 3 (três) horas. A solução de limpeza amolecerá as crostas acumuladas.
- Depois disso, retire a unidade principal e a bandeja de água, lave a resistência com uma escova de cerdas macias, a seguir, lave a bandeja de água e enxágue-a. Finalize a limpeza com um pano que não solte fiapos.

A cada 2 meses

Substituição do filtro de carvão ativado: dependendo da frequência de ciclos de destilação realizados, a substituição poderá ser antes disso.

A cada 3 meses

Substituição do filtro da resistência: dependendo da qualidade da água, a substituição poderá ser antes disso.

6. Biossegurança

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.5**POP - ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE GLICOSE (PROGRAMA 34)****Data: 14/03/2017****1. Finalidade**

Realizar dosagem de glicose em amostras de plasma com kit comercial Interkit.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente.
2. Identificar cada tubo com o reativo (branco), padrão e amostras;
3. Pipetar em cada tubo 1 mL do reagente;
4. Usar um tubo só com o reagente (branco) para calibrar o aparelho.
5. Pipetar **10 ul** do padrão e amostras. Homogeneizar bem.
6. Colocar em banho-maria a 37° C para incubar por **10 minutos**.
7. Inserir no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **505 nm**;
8. Fazer leitura da absorbância. A cor é estável até 60 minutos.

Cálculo

Glicose: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo):

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da Amostra} \times \text{Concentração Padrão (mg/L)}}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

Valor dentro da normalidade para humanos adultos: 70 a 99 mg/dL

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiros usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.3**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE AST (TGO)
(PROGRAMA 5)****Data: 14/03/2017****1. Finalidade**

Realizar dosagem de AST em amostras de plasma com kit comercial Interkit.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente.
2. Pipetar em cada tubo 800 ul do reagente R1 + 200 ul do reagente R2 e homogeneizar suavemente. Pré-aquecer o reagente por 3 min. a 37° C.
3. Pipetar **100 ul** da amostra, homogeneizar rapidamente e inserir imediatamente no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **340 nm**;
5. Fazer uma leitura da absorbância inicial aos 90 segundos (Ai) e leituras subsequentes após 1 (A1), 2 (A2) e 3 minutos (A3);
6. Proceder da mesma forma com as demais amostras.

Cálculo

AST: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo):

$$\text{AST (U/L)} = \text{Média das absorvâncias} \times 1746$$

Valor dentro da normalidade para humanos adultos:

Homem até 38 U/L

Mulher até 31 U/L

5. Garantia de Qualidade:

Desprezar o reagente de trabalho caso sua absorvância em 340 nm, medida contra a água for inferior a 1,0.

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiros usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 1.2**POP – ESPECTROFOTOMETRIA: DOSAGEM DE ALT (TGP)
(PROGRAMA 3)****Data: 14/03/2017****1. Finalidade**

Realizar dosagem de ALT em amostras de plasma com kit comercial Interkit.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de reagentes e soluções bem como o manual de utilização dos equipamentos.

4. Procedimento

1. Tirar da geladeira, para pré-aquecer as amostras e os reagentes em temperatura ambiente.
2. Pipetar em cada tubo 800 ul do reagente R1 + 200 ul do reagente R2 e homogeneizar suavemente. Pré-aquecer o reagente por 3 min. a 37° C.
3. Pipetar **100 ul** da amostra, homogeneizar rapidamente e inserir imediatamente no aspirador do aparelho termostatizado a 37° C e comprimento de onda a **340 nm**;
5. Fazer uma leitura da absorbância inicial aos 90 segundos (Ai) e leituras subsequentes após 1 (A1), 2 (A2) e 3 minutos (A3);
6. Proceder da mesma forma com as demais amostras.

Cálculo

ALT: o aparelho emite o resultado com o cálculo pronto (que é realizado conforme abaixo):

$$\text{ALT (U/L)} = \text{Média das absorvâncias} \times 1746$$

Valor dentro da normalidade para humanos adultos:

Homem até 38 U/L

Mulher até 31 U/L

5. Garantia de Qualidade:

Desprezar o reagente de trabalho caso sua absorvância em 340 nm, medida contra a água for inferior a 1,0.

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiras novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção individual (Luva de procedimento e Avental).

Descartar ponteiras usadas e eppendorfs no lixo adequado (branco).

Procedimento Operacional Padrão nº 3.6**POP – PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO MDA 400 µM/l PARA ANÁLISE DE TBARS****Data: 18/05/2016****1. Finalidade**

Preparo de solução padrão para análise de TBARS.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executado pelos alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

- Apresentação comercial do produto original: SIGMA® T9889 (1,1,3,3, Tetrahidroxipropano, MM = 220,3 g/Mol, pureza = 97%. Solução com densidade = 0,92g/ml).

- Preparar uma solução a 400µM/l. Para tanto, usa-se a seguinte regra, tendo por base as especificações do produto original:

$$1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ mol}$$

$$220,3\text{g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$X \text{ g} \text{ ----- } 400 \times 10^{-6} \text{ mol (400}\mu\text{M)}$$

$$X = 0,08812\text{g}$$

Como a pureza do produto é de 97% temos que aplicar um fator de correção para 100%, ou seja:

$$C1 \times m1 = C2 \times m2$$

$$100 \times 0,088 = 97 \times m2$$

$$m2 = 0,0908$$

Portanto a massa necessária para termos uma solução de 400µM é de 0,0908g

Sabemos que a densidade do produto original é 0,92g/ml, assim:

$$d = m/v; 0,92 = 0,0908/v; v = 0,0987\text{ml} \sim 99 \mu\text{L}$$

-
- Desse modo, pipeta-se 99 μ l do produto original (SIGMA® T9889) em 1 litro de água destilada usando balão de 1000 ml.
 - Neste ponto tem-se uma solução do reagente MDA a 400 μ M/l.

4. Armazenamento

Armazenar em frasco âmbar identificado e estocar em geladeira por tempo indeterminado.

5. Garantia de Qualidade:

Verificar qualidade, quantidade e temperatura adequada dos reagentes a serem utilizados.

Verificar materiais descartáveis a serem utilizados, como:

- Utilizar ponteiros novas e autoclavadas
- Utilizar tubos novos autoclavados

6. Biossegurança:

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 2.1**POP – Autoclave - Esterilização de materiais****Data: 10/11/2016****1. Finalidade**

A autoclave é um aparelho que tem como finalidade esterilizar materiais.

2. Aplicações e Responsabilidades

O processo de autoclavagem consiste em manter o material contaminado em contato com um vapor de água em temperatura elevada, por um período de tempo suficiente para matar todos os microrganismos. A utilização da autoclave é de responsabilidade dos docentes, técnicos e alunos de iniciação científica.



3. Procedimentos Relacionados

Vide o protocolo para preparo de material, meio de cultura, soluções, bem como o manual de utilização da autoclave.

4. Procedimento

4.1 Preparo de material

As placas de Petri e pipetas devem ser embaladas com papel craft. Frascos com meio de cultura, água e soluções não devem ser totalmente fechados. Geralmente é utilizada uma rolha feita de algodão hidrofóbico (que não molha) e gaze. Essa rolha permite que o vapor entre dentro do frasco e esterilize a solução.

4.2 Verificar o nível da água

1. O equipamento é 220 V.
2. Adicionar água destilada suficiente para cobrir a resistência, de forma a impedir a oxidação do metal e danos à resistência.

4.3. Etapas da esterilização

1. Colocar o material no cesto (não coloque mais que um terço do volume do equipamento);
2. Fechar a autoclave, rodando as chaves dispostas.
3. Ligar a autoclave no máximo.
4. Esperar até começar a sair um jato de ar residual e fechar a válvula.
5. Depois de fechada a válvula, a temperatura e pressão começarão a subir.
6. Após aproximadamente 15 a 20 minutos, quando o registro estiver marcando 121°C, colocar na temperatura média. A partir desse momento começa a esterilização.
7. Em seguida, deve-se marcar 15 ou 20 minutos (dependendo do volume do material). Após esse

período a autoclave deve ser desligada.

8. Espere a temperatura abaixar antes de abrir o equipamento.
9. Retire o material ainda úmido da autoclave e deixe-o secar à temperatura ambiente ou em uma estufa.

5. Garantia de Qualidade:

1. Verificar o nível de água;
2. Verificar a preparação da embalagem do material;
3. Fita adesiva indicadora de esterilização que mudará de cor após a autoclavagem.

6. Biossegurança:

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Verificar todas as etapas da autoclave.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.7**POP – Cultura de microrganismos em estufa****Data: 17/11/2016****1. Finalidade**

Incubar meios de cultivo contendo culturas microbianas para proporcionar seu crescimento.

2. Aplicações e Responsabilidades

O tempo de uso da estufa de cultura é determinado pelo tipo de microrganismo, sendo indicadas 24 horas para culturas bacterianas e 48 horas para fungos leveduriformes e filamentosos. A utilização da estufa é de responsabilidade dos docentes, técnicos e alunos de iniciação científica.

3. Procedimentos Relacionados:

Vide o protocolo para preparo de material, meio de cultura, soluções, bem como o manual de utilização da estufa.

4. Procedimento

1. Ligar a chave geral;
2. Posicionar um termômetro no suspiro;
3. Ajustar a temperatura desejada, girando o botão do termostato;
4. Ao atingir a temperatura desejada, a luz vermelha se apaga;
5. Para incubar o material microbiológico, abrir a porta externa e depois a porta interna de vidro;
6. Colocar o material nas prateleiras e fechar as duas portas;
7. Verificar a temperatura pelo termômetro após alguns minutos.

5. Garantia de Qualidade:

1. Verificar a temperatura quando a luz vermelha do termostato apagar;
2. Verificar a temperatura do interior da estufa após 10 minutos do fechamento das portas.

6. Biossegurança:

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Verificar todas as etapas de operação da estufa.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.1**POP - Análise da microbiota oral****Data: 17/11/2016****1. Finalidade**

- Analisar o crescimento de bactérias e leveduras;
- Quantificar o número de colônias em meios de cultivo seletivos;
- Identificar o gênero das colônias com morfologia semelhante.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada na bancada central, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, técnicos e docentes.

3. Procedimentos Relacionados

Vide o protocolo para preparo de meios de cultura, soluções, bem como o manual de utilização dos equipamentos.

Para a realização da coleta e da análise microbiológica serão necessários os seguintes materiais:

- tubo Falcon (10 mL),
- solução salina, tampão PBS (137 mM NaCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KCl, pH 7,2),
- água oxigenada 30 volumes,
- meios de cultura,
- placas de Petri,
- autoclave,
- balança,
- estufa,
- kit de coloração de Gram,

- lâminas,
- pinça de madeira
- microscópio.

4. Procedimento

4.1 Coleta das amostras de enxague bucal

1. Colhidas no período matinal (entre 8h e 9h30);
2. Material da cavidade bucal coletado por bochecho: 10 ml de solução fisiológica esterilizada tamponada com fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KCl, pH 7,2) contida em um tubo Falcon (10 mL) estéril descartável;
3. Após um minuto de bochecho, os indivíduos devolvem a solução para o mesmo recipiente;
4. Manter os recipientes em uma bolsa térmica com gelo até serem transportados para o laboratório, respeitando-se o período máximo de três horas entre a coleta e o processamento das amostras.

4.2 Processamento das amostras

1. Centrifugar as amostras do enxague bucal por 10 minutos a 2.500 RPM e descartar o sobrenadante;
2. Resuspender o depósito em 2,5 ml de PBS e homogeneizar em agitador mecânico de tubos (Vortex) por 30 segundos;
3. A partir desta solução, obter diluições 10⁻² a 10⁻⁶ em solução salina (NaCl 0,85%) em tubos de ensaio (15x150 mm);
4. Semear 0,1 mL de cada amostra (suspensão de concentração final e diluições), em duplicata, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1 mg/mL de cloranfenicol (meio seletivo para fungos); ágar manitol (meio seletivo para *Staphylococcus* sp e indicador para *S. aureus*); ágar MacConkey (meio seletivo para bactérias Gram-negativas);

5. Incubar as placas a 37°C por um período de 48 horas, e quando não houver crescimento nas placas de Sabouraud dextrose com cloranfenicol, mantê-las por mais 5 dias em temperatura ambiente;
6. Após o crescimento, examinar as colônias quanto às características morfológicas (cor, tamanho, forma, superfície e halos) e contá-las para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL)
7. Realizar esfregaços em lâminas e corá-los pelo método de Gram para colônias com morfologia diferente.
8. Submeter as culturas identificadas como cocos Gram-positivos pelo método da coloração de Gram aos testes enzimáticos de verificação da produção de catalase (sobre uma lâmina de microscopia aplicar uma colônia do crescimento juntamente com uma gota de peróxido de hidrogênio – H₂O₂, sendo a formação de bolhas indicativa de resultado positivo). Tal teste é utilizado para diferenciar entre si cocos Gram-positivos: os estafilococos são catalase positivos, enquanto que os estreptococos são catalase negativos. Dessa forma, serão considerados como *Staphylococcus* sp aqueles isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram-positivos, agrupados em cachos e produção da enzima catalase.

4.2 Coloração de Gram

1. Com alça bacteriológica coletar uma colônia
2. Esfregar o material na lâmina
3. Fixar o esfregaço passando a lâmina (lado oposto ao esfregaço) na chama do bico de Bunsen.
4. Cobrir toda lâmina com solução cristal violeta por 1 minuto;
5. Lavar a lâmina com água destilada;
6. Cobrir a lâmina com cristal violeta por 1 minuto;
7. Escorra o lugol e lave em um filete de água corrente;
8. Cubra a lâmina com lugol e deixe agir por aproximadamente 1 minuto;
9. Escorra o lugol e lave em um filete de água corrente;
10. Adicione álcool-acetona sobre a lâmina;
11. Lave em um filete de água corrente;

-
12. Cubra a lâmina com safranina e deixe agir por aproximadamente 30 segundos;
 13. Lave em um filete de água corrente;
 14. Deixe secar ao ar livre;
 15. Coloque uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço;
 16. Analisar em objetiva de imersão (100x).

5. Garantia de Qualidade

1. Verificar a temperatura adequada da estufa bacteriológica;
2. Verificar a data de validade dos meios de cultura;
3. Utilizar material autoclavado como: placa de Petri, vidrarias e meio de cultura.

6. Biossegurança

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Lavar as mãos com desinfetante antes e depois do procedimento.
3. Seguir as normas de uso de aparelhos.
4. Desinfetar a bancada de trabalho com álcool 70% no início e término de cada procedimento.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.10**POP – Protocolo de atividade física – Natação****Data: 06/12/2016****1. Finalidade**

Realizar experimento com indução de atividade física de natação em animal de laboratório.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada no tanque de natação, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, técnicos e docentes.

3. Procedimento

- Usar tanque com capacidade de 250 litros de água;
- Colocar no tanque uma resistência que deverá manter a temperatura a $32\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Os animais são colocados um a um no tanque para a execução do exercício de natação;
- O procedimento é acompanhado todo o tempo pelo pesquisador, para observar a execução do exercício e cuidados gerais com os animais;
- Como procedimento inicial, os animais são colocados na água para o período de adaptação à natação: **30 minutos diários durante cinco dias consecutivos**. Nos 30 minutos propostos, são realizados 10 minutos de descanso na metade do tempo;

Obs: Esse período é importante para reduzir fatores ligados ao estresse promovido pela atividade do nado.

- Após o período de adaptação os animais realizam o treinamento de natação por 30 minutos diários, realizados 10 minutos de descanso na metade do tempo proposto, com utilização de carga, equivalente a **2% do peso corporal**, 5 vezes por semana em um total de 9 semanas.

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico resistido adaptado de Gobatto et al. e Silva et al.

Período de treinamento	Tempo em minutos (Sobrecarga - % Peso corporal)
1º e 2º dias	Contato com água rasa
3º a 5º dias	10 (sem sobrecarga)
2ª semana	20 (1%)
3ª semana	20, 30 e 40 (3%)
4ª semana	40, 50 e 60 (3%)
5ª e 6ª semanas	60 (3%)
7ª e 8ª semanas	60 (5%)

- Depois de retirados da água, os animais são enxugados com toalha e depois secos com ar quente. Esse procedimento é realizado pelo pesquisador, com cuidado que cada animal esteja confortável e completamente seco;

- Os animais são colocados novamente nas caixas de manutenção.

4. Garantia de Qualidade

1. Verificar a temperatura adequada para a realização do exercício.
2. Enxugar e aquecer os animais;
3. Realizar o exercício do período de adaptação de 5 dias.

6. Biossegurança

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Lavar as mãos com desinfetante antes e depois do procedimento.
3. Seguir as normas no manuseio de animais de experimentação.
4. Limpar a bancada e o tanque de natação após os procedimentos.

7. Referências

Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2001; 130 (1): 21-27.

Silva MAS, Vechetti-Júnior IJ, Nascimento AF, Furtado KS, Azevedo L, Ribeiro DA, Barbisan LF. Effects of swim training on liver carcinogenesis in male Wistar rats fed a low-fat or high-fat diet. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (Print)* 2012; 37: 1101-9.

Procedimento Operacional Padrão nº 4.11**POP – Protocolo de atividade física – Saltos em meio líquido****Data: 06/12/2016****1. Finalidade**

Realizar experimento com indução de atividade física de saltos em animal de laboratório.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada no tanque de natação, sendo executada pelos alunos de iniciação científica, técnicos e docentes.

3. Procedimento

- É colocado no cilindro de PVC, uma resistência para água e assim, a água do tanque deverá ser mantida na temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ a uma profundidade de 38 cm.
- Os animais são colocados individualmente no cilindro para a execução do exercício;
- O procedimento é acompanhado todo o tempo pelo pesquisador, para observar a execução do exercício e cuidados gerais com os animais;
- Os animais irão realizar o exercício conforme Tabela 1, com sobrecarga de peso na região ventral do tórax dos animais.

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico resistido adaptado de Melo Neto et al.

Dia de treinamento	Treinamento – Sobrecarga (% Peso corporal)
1° e 2°	Contato com água rasa
3°	02 séries de 05 saltos (50%)
4°	04 séries de 05 saltos (50%)
5°	04 séries de 09 saltos (50%)
6° ao 20°	04 séries de 10 saltos (50%)
21° ao 35°	04 séries de 10 saltos (60%)
36° ao 54°	04 séries de 10 saltos (70%)

- Depois de retirados da água, os animais são enxugados com toalha e depois secos com ar quente. Esse procedimento é realizado pelo pesquisador, com cuidado para que cada animal esteja confortável e completamente seco;
- Os animais são colocados novamente nas caixas de manutenção.

4. Garantia de Qualidade

1. Verificar a temperatura adequada para a realização do exercício.
2. Enxugar e aquecer os animais;

6. Biossegurança

1. Utilização de equipamentos de proteção individual (luva de procedimento e avental).
2. Lavar as mãos com desinfetante antes e depois do procedimento.
3. Seguir as normas no manuseio de animais de experimentação.
4. Limpar a bancada e o tanque de natação após os procedimentos.

7. Referência

de Melo Neto JS, de Campos Gomes F, Pinheiro PF, Pereira S, Scarano WR, Fávaro WJ, Domeniconi RF. The effects of high doses of nandrolone decanoate and exercise on prostate microvasculature of adult and older rats. *Life Sci.* 2015; 121: 16-21.

Procedimento Operacional Padrão nº 2.3**POP – MANUSEIO DO BANHO-MARIA****Data: 18/03/2016****1. Finalidade**

Detalhamento de como utilizar o banho-maria.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada por alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. O equipamento é 220 V.
2. Retirar as tampas do banho-maria e verificar o nível de água, que deverá estar acima do nível da resistência do equipamento. Completar o nível com água comum, se necessário. Recoloque as tampas de volta.
3. Ligar o aparelho, utilizando a chave verde (à esquerda). Atenção: verificar o botão correto, pois o equipamento tem outro botão (à direita), que é de drenagem da água e esvaziamento da câmara interna. Ver foto a seguir.



4. Ao ligar o equipamento, o campo “PV” do visor começa a piscar, indicando a temperatura da água. E depois, passa a aquecer a água até a temperatura pré-selecionada na programação anterior, e que aparece no campo “SV” do visor.
5. Para alterar a temperatura de aquecimento (até 100° C), pressionar a tecla “SET”.
6. Aperte a tecla ◀ para selecionar o campo de alteração, e com as teclas de setas ▼ ou ▲, ajuste para a temperatura desejada.
7. Pressionar a tecla “SET” novamente para fixar a alteração.
8. Após o uso, desligar o equipamento e cobrir a câmara interna com as tampas.

4. Garantia de Qualidade

Manter sempre o nível de água acima da resistência para não danificar o aparelho.

5. Biossegurança

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

Procedimento Operacional Padrão nº 2.4**POP – MANUSEIO DA CENTRÍFUGA****Data: 11/01/2015****1. Finalidade**

Detalhamento de como utilizar a centrífuga Centribio 80-2B.

2. Aplicações e Responsabilidades

Realizada por alunos de iniciação científica, funcionários do laboratório e docentes.

3. Procedimento

1. Características: o equipamento é 110 V; a rotação máxima é 4.000 RPM; e a centrifugação é possível para 12 tubos de 5 até 15 mL.
2. Antes de ligar a centrífuga, a disposição dos tubos com as amostras deve ser feita de maneira equilibrada simetricamente (em cruz) com o ângulo do rotor. Os tubos devem ser apropriados e dentro das especificações das caçapas (caçapas de até 12 tubos de 15 ml ou de 5ml (utilizar tubos de fundo “U”).
3. Caso tenha número ímpar de tubos de amostra, acrescente um tubo para fazer o balanceamento do rotor, sempre completando com água o tubo falso com a mesma quantidade de líquido que o tubo de amostra correspondente (não coloque o tubo vazio).

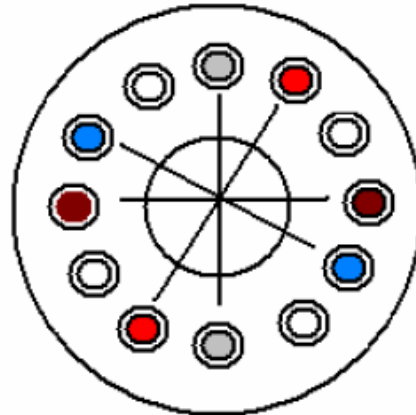


Figura 2 - Exemplo de balanceamento do rotor

4. Ligar o aparelho, pressionando “ON / OFF”. Ver as funções e teclas na foto a seguir:



Figura 1- Conhecendo o equipamento

5. Após o balanceamento correto do rotor, abaixe a tampa para travar a centrífuga.
6. Gire o botão de ajuste de tempo (timer), para definir o tempo necessário, no intervalo de 0 a 60

minutos (se o tempo for ajustado em 0, a centrífuga irá funcionar em modo contínuo).

7. Gire LENTAMENTE o botão de ajuste de velocidade até o ponto desejado, para início da centrifugação. Tenha certeza que o indicador de velocidade aponta para a posição zero no início da operação.

8. Quando o tempo selecionado esgotar, a centrífuga irá parar automaticamente (exceto se estiver operando em modo contínuo, quando deverá ser parada manualmente, girando, levemente, o botão de ajuste de tempo para esquerda).

9. Desligue o aparelho no botão Liga/Desliga e retire os tubos.

OBS: Para garantir sua segurança, a tampa deve permanecer fechada durante o procedimento de centrifugação e não deverá ser aberta até que o aparelho pare de funcionar.

9. Abortando o procedimento de centrifugação: diminuir a velocidade no botão de ajuste de velocidade e após, girar lentamente o botão de ajuste de tempo até o zero.

4. Garantia de Qualidade

Não pare a rotação com a mão, pois este procedimento desgasta as escovas de carvão, danificando o equipamento além de oferecer perigo ao usuário.

5. Biossegurança

Utilização de equipamentos de proteção Individual (Luva de procedimento e Avental).

- Sempre equilibre os tubos em forma de cruz dentro da centrífuga.
- Utilize EPI's ao realizar testes, limpeza e manutenção do equipamento, a fim de evitar contaminações.
- Descartar os produtos tidos como contaminados em lixos apropriados.
- Não utilize tubos menores do que os especificados.
- Não abrir a tampa da centrífuga enquanto estiver funcionando.
- Não tente parar o rotor com as mãos.
- Nenhum tipo de material sólido ou líquido deve ser colocado ou derrubado dentro do

equipamento, isso pode ocasionar curto circuito, fumaça e a queima da placa eletrônica. Caso ocorra algo descrito acima, desligue e retire o equipamento da tomada elétrica rapidamente.

- Em caso de fumaça, retire-o da tomada elétrica rapidamente. Se usado continuamente sobre estas condições, pode ocasionar fogo, choque elétrico e casualidades pessoais.
- Não tocar nos componentes dos circuitos internos, isso pode provocar queima das placas eletrônicas e choques elétricos.
- Manter o equipamento em local seco e arejado.