



# NORMA TÉCNICA

M1.002

Jul/1985  
16 PÁGINAS

Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular: método de ensaio

**Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**  
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345  
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP  
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	<b>LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL PARA CULTURA CELULAR</b> Método de Ensaio	M1.002 JUL/85
--------	--	------------------

## SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	
1 OBJETIVO.....	
2 NORMAS COMPLEMENTARES.....	
3 DEFINIÇÕES.....	
4 APARELHAGEM.....	
5 EXECUÇÃO DO ENSAIO.....	
ANEXO A.....	
ANEXO B.....	

### INTRODUÇÃO

As células primárias e/ou de linhagem, cultivadas em monocamadas, crescem e se multiplicam aderidas ao vidro dos frascos de cultura. Muito frequentemente a toxidez apresentada pelo vidro comum e fortemente alcalino, bem como resíduos de lavagem e de matéria orgânica, tem efeito prejudicial sobre as células. Assim, cuidados especiais com a vidraria, o uso de detergentes de boa qualidade e a rigorosa obediência às exigências do procedimento de lavagem, são fundamentais para as culturas celulares.

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os métodos que permitem lavar, preparar e esterilizar, com eficiência, vidrarias, materiais e equipamentos usados no preparo da cultura celular.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia
- L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos.

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as seguintes definições:

#### 3.1 Cultura celular

Cultura "in vitro" das células dispersas de um tecido de origem animal.

#### 3.2 Material

Vidraria de tipo variado, pipetas sorológicas, pipetas tipo Pasteur, seringas hipodérmicas e automáticas, rolhas de borracha anti-ácidas, tampas de Barr, porta-filtros de aço inoxidável, tubos de látex.

#### 3.3 Lavagem

Eliminação de resíduos orgânicos, de proteínas e dos produtos de metabolização dos componentes do meio de cultura, que permanecem no material após o seu uso.

#### 3.4 Preparação do material

Guarnição e/ou acondicionamento apropriado do material que vai ser esterilizado.

#### 3.5 Esterilização

Destruição, por agentes físicos ou químicos, de todos os microrganismos vivos presentes (formas vegetativas ou esporuladas de bactérias ou fungos, e vírus) num determinado meio. Pode ser realizada através do calor, filtros, compostos químicos e diferentes tipos de radiações.

##### 3.5.1 Esterilização por calor seco

Processo baseado na exposição do material ao ar quente, provocando a termocoagulação das proteínas e consequente morte dos microrganismos.

##### 3.5.2 Esterilização por calor úmido

Processo baseado na termocoagulação das proteínas pela ação do calor úmido. A esterilização por este processo é obtida em temperaturas inferiores às necessárias para a esterilização por calor seco, pois a termocoagulação das proteínas é catalizada pela água.

##### 3.5.3 Esterilização por radiações ultra-violeta

Processo baseado na exposição direta do material contaminado à radiação ultra-violeta (UV). Parece provável que a morte da célula viável, após irradiação ultra-violeta, é quase inteiramente atribuível à destruição fotoquímica dos ácidos nucleicos.

### 3.6 Detergentes

Os detergentes são substâncias sintéticas que têm ação limpadora como os sabões, devido à combinação de uma série de propriedades entre as quais se incluem: decréscimo da tensão superficial, ação umectante, emulsificante, dispersante e formação de espuma. O ingrediente básico dos detergentes é uma substância orgânica com propriedade tenso-ativa de superfície em soluções aquosas, que é chamado de agente surfactante.

O Extran (ou similar), é biologicamente degradável e tem propriedades de detergentes e emulsificantes. O tipo MA-01 é alcalino, enquanto que o MA-02 é neutro sendo, portanto, mais indicado para a lavagem de vidrarias utilizadas em cultura de células. Todavia, como o MA-02 precisa ser importado, está sendo utilizado o tipo MA-01 que também apresenta resultados satisfatórios.

Outro detergente que pode ser empregado na lavagem de vidraria para cultura celular é o Teepol (ou similar). É utilizada uma solução a 1%, uma vez que é concentrado.

## 4 APARELHAGEM

### 4.1 Materiais e equipamentos

#### 4.1.1 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada, produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

#### 4.1.2 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, tubos de ensaio, frascos de meios de cultura e toda vidraria que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equi

pada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 horas, à temperatura de 170 a 180°C.

#### 4.1.3 Destilador de água ou aparelho para deionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram no desenvolvimento das culturas de células.

#### 4.1.4 Balança

Com sensibilidade mínima de, 0,1 g ao pesar 150 g.

#### 4.1.5 Lâmpadas germicidas (ultra-violeta)

São lâmpadas que emitem radiações ultra-violeta, com ação germicida. São usadas na esterilização de microplacas de plástico e outros materiais. Para a total eficiência do processo, devem ser observados os seguintes pontos:

- a) as superfícies a serem esterilizadas não devem conter resíduos de nenhuma espécie, pois a poeira acumulada diminui o poder germicida da lâmpada;
- b) a distância entre a lâmpada e a superfície a ser esterilizada deve ser a mínima possível;
- c) deve-se efetuar a limpeza das lâmpadas mensalmente, utilizando-se um pedaço de pano embebido em etanol;
- d) o tempo de vida médio da lâmpada (UV) deve ser conhecido, pois a sua eficiência (poder germicida) depende do número de horas que a mesma tem de uso e de suas características individuais. Normalmente, estas lâmpadas têm tempo de vida relativamente curto (cerca de 6.000 horas para lâmpadas de 30 watts).

#### 4.1.6 Lavador automático de pipetas

Construído em plástico rígido ou em aço inoxidável e resistente à ação das soluções usadas na lavagem. O conjunto se compõe de dois depósitos: uma cesta e um sifão lavador. O depósito do sifão lavador tem duas conexões, sendo que uma é ligada diretamente na torneira de água corrente e a outra, no esgoto.

#### 4.1.7 Caixas de aço inoxidável

- a) de 50 x 30 x 20 cm, com tampa e alça, capacidade para 16 litros de solução de detergente;
- b) vazadas, com tampa e alça (mesmas dimensões do item a), para acondicionamento da vidraria que vai ser esterilizada;

c) de 15 x 20 x 6 cm, com tampa, para acondicionamento de rolhas para esterilização.

4.1.8 Porta-filtros de aço inoxidável com 142 mm e 293 mm de diâmetro

4.1.9 Vasilhames de pressão de aço inoxidável com capacidade para 5 e 10 litros

4.1.10 Porta-filtros de aço inoxidável.

4.1.11 Pipetador automático tipo Brewer

Constituído de um motor elétrico com controle de velocidade ao qual são acoplados externamente a válvula de montagem, tubo de latex com cânula e uma seringa de vidro com anel adaptador.

O ajuste adequado do aparelho permite a dosagem dos volumes desejados.

4.1.12 Seringas automáticas, tipo Cornwall de 2, 5 e 10 ml.

4.1.13 Seringas hipodérmicas com agulhas

4.1.14 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 ml, 5 ml e 10 ml, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2,5 %, e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel. São esterilizadas por calor seco a 170 - 180°C, durante 4 horas.

4.1.15 Recipientes de vidro para cultura de células

Provetas graduadas, tubos de ensaio, frascos erlenmeyer, garrafas de Roux e vidraria de tipo variado.

4.1.16 Microplacas não autoclaváveis

De plástico rígido não tóxico, com tampa, de 12,8 cm x 8,6 cm x 1,5 cm, com 96 orifícios de fundo em U.

4.1.17 Alcoômetro

4.1.18 Rolhas de borracha anti-ácidas, números 1 a 9

4.1.19 Ampolas com suspensão de, Bacillus, stearothermophilus

4.1.20 Fita controle de autoclave para indicar que o material foi submetido à esterilização.

4.1.21 Bico de Bunsen

4.1.22 Tripé e tela de amianto

4.1.23 Tesoura

- 4.1.24 Algodão hidrófilo
- 4.1.25 Fita crepe
- 4.1.26 Folha de alumínio
- 4.1.27 Papel Kraft
- 4.1.28 Barbante ou cordonê
- 4.1.29 Gaze
- 4.1.30 Luvas de amianto
- 4.1.31 Luvas de borracha
- 4.1.32 Máscara cirúrgica
- 4.1.33 Gaspilhões de tamanhos diversos

## 4.2 Reagentes e soluções

### 4.2.1 Reagentes

Devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas. São os seguintes os reagentes necessários:

- a) ácido clorídrico fumegante (HCl);
- b) água destilada ou deionizada;
- c) álcool etílico comercial (70%);
- d) bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) p.a.;
- e) detergente líquido (Extran MA-01 ou similar);
- f) formol comercial;
- g) glicerina p.a.;
- h) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- i) hipoclorito de sódio comercial;
- j) tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) p.a.

### 4.2.2 Preparo das soluções

#### 4.2.2.1 Solução de detergente Extran MA-01 a 3% (ou similar)

##### Fórmula:

Extran MA-01 (ou similar).....	600 ml
Água.....	19.400 ml

##### Preparo:

Medir o volume desejado de água e acrescentar 600 ml do detergente líquido. A solução deve ser conservada em recipientes de material plástico (polietileno), podendo ser usada repetidamente, durante cerca de 1 mês. Se antes disso apresentar excesso de material em

suspensão, filtrar a solução através de pano grosso, continuando a usá-la até a prescrição daquele prazo ou à perda da viscosidade característica.

#### 4.2.2.2 Solução de álcool 70%

##### Preparo:

A 700 ml de álcool etílico comercial acrescentar quantidade de água suficiente (aproximadamente 200 a 300 ml) para obter uma solução de álcool a 70%. Essa verificação é feita através do uso do alcômetro.

#### 4.2.2.3 Solução de hipoclorito de sódio comercial a 2%

##### Fórmula:

Hipoclorito de sódio..... 2 ml  
Água..... 98 ml

##### Preparo:

Medir 2 ml de hipoclorito de sódio e acrescentar 98 ml de água de torneira.

#### 4.2.2.4 Solução de formol a 8%

##### Fórmula:

Formol comercial..... 8 ml  
Álcool etílico 70% q.s.p..... 100 ml

##### Preparo:

Medir 8 ml de formol e completar o volume para 100 ml com álcool etílico 70%.

#### 4.2.2.5 Solução de tiosulfato de sódio a 0,5%

##### Fórmula:

Tiosulfato de sódio..... 5 g  
Água destilada..... 1000 ml

##### Preparo:

Pesar 5 g de tiosulfato de sódio e dissolver em 1 000 ml de água destilada.

#### 4.2.2.6 Solução de ácido clorídrico a 1%

##### Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%)..... 10 ml  
Água destilada q.s.p..... 1000 ml

##### Preparo:

Diluir vagarosamente 10 ml de ácido clorídrico fumegante em 1 litro

de água destilada.

Adicionar o ácido a água e nunca a água sobre o ácido.

#### 4.2.2.7 Solução de bicarbonato de sódio a 4%

##### Fórmula:

Bicarbonato de sódio.....	40 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

##### Preparo:

Pesar 40 g de bicarbonato de sódio, colocar em um balão volumétrico com aproximadamente 500 ml de água destilada, agitar até completa dissolução e completar o volume para 1000 ml com água destilada.

#### 4.2.2.8 Solução de hidróxido de sódio a 0,4%

##### Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	4 g
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

##### Preparo:

Pesar 4 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 ml com água destilada. Homogeneizar até completa dissolução.

## 5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 5.1 Lavagem do material

#### 5.1.1 Lavagem de vidraria em geral

5.1.1.1 Antes de iniciar a lavagem, toda a vidraria deve ser esterilizada, em autoclave a 121°C durante 30 minutos, com tampa frouxa, imersa em água e dentro de caixas de aço inoxidável com tampa.

5.1.1.2 Frascos sujos, não contaminados, devem ser enxaguados em água corrente para eliminar os resíduos de células e de meios de cultura.

5.1.1.3 Imergir a vidraria em solução de Extran MA-01 a 3% (ou similar), tendo o cuidado de deixar todos os frascos cheios e cobertos pela solução durante cerca de 12 horas.

5.1.1.4 Escovar individual e cuidadosamente os frascos com gaspilhão.

5.1.1.5 Lavar em água corrente fria, enchendo e esvaziando totalmente os frascos, 20 vezes, tomando o cuidado de verificar se realmente os frascos são completamente cheios e esvaziados, em cada vez.

5.1.1.6 Passar em água destilada, 3 vezes ou mergulhar a vidraria com água destilada, tomando o cuidado de deixar todos os frascos cheios, durante aproximadamente 8 a 12 horas.

5.1.1.7 Secar a vidraria em posição emborcada, em estufa a 100°C durante 1 hora.

#### 5.1.2 Lavagem de pipetas

5.1.2.1 As pipetas contaminadas são colocadas horizontalmente em caixas de aço inoxidável contendo solução de Extran a 3% (ou similar) e autoclavadas a 121°C durante 30 minutos.

5.1.2.2 Tomando cuidado para não quebrar o bocal, retirar o tampão de algodão hidrófilo de cada pipeta através de vácuo ou estilete de ponta fina.

5.1.2.3 Ferver durante 15 minutos em solução de detergente a 3%.

5.1.2.4 Enxaguar durante 5 a 6 horas no lavador de pipetas.

5.1.2.5 Enxaguar 5 a 10 vezes em água destilada ou deixar as pipetas mergulhadas em água destilada durante 12 horas.

5.1.2.6 Deixar escorrer bem toda a água e secar em estufa a 100°C durante 1 hora.

#### 5.1.3 Lavagem de rolhas de borracha anti-ácidas

5.1.3.1 Rolhas contaminadas são autoclavadas a 121°C durante 30 minutos, juntamente com os tubos de ensaio ou frascos contaminados.

5.1.3.2 Rolhas usadas, não contaminadas, são imersas em água após o uso.

5.1.3.3 Ferver as rolhas com água durante 15 minutos.

5.1.3.4 Lavar em água corrente durante 1 hora.

5.1.3.5 Enxaguar em água destilada.

5.1.3.6 Secar em estufa ou ao ar.

#### 5.1.4 Lavagem de seringas automáticas tipo Cornwall

5.1.4.1 Imediatamente após o uso, a seringa é acionada 15 a 20 vezes com água destilada para eliminar os resíduos nela contidos.

5.1.4.2 Desmontar a seringa com cuidado e fervê-la com água destilada durante 15 minutos.

5.1.4.3 Montar a seringa e acioná-la 10 a 15 vezes com água destilada glicerinada a 10%, para lubrificação das partes componentes.

5.1.4.4 Secar em estufa.

5.1.5 Lavagem das partes componentes do pipetador automático tipo Brewer

5.1.5.1 Imediatamente após o uso, ainda com o aparelho montado, lavar de 15 a 20 vezes com água destilada para remover resíduos de células e outros materiais que possam estar aderidos.

5.1.5.2 Desmontar com cuidado todos os acessórios e peças suplementares e ferver, com água destilada durante 15 minutos, a seringa, o tubo de latex e a cânula.

5.1.5.3 Após fervura, secar os acessórios em estufa.

5.1.6 Lavagem dos porta-filtros

5.1.6.1 Logo após o uso, desconectar a parte superior da inferior e desmontar todos os componentes.

5.1.6.2 Lavar em água corrente usando esponja com solução de Extran a 3% (ou similar).

5.1.6.3 Enxaguar em água corrente para eliminar todo o resíduo de detergente.

5.1.6.4 Deixar escorrer bem toda a água e secar ao ar.

5.1.7 Vasilhames de pressão

5.1.7.1 Imediatamente após o uso enxaguar com água corrente e lavar com uma esponja contendo solução de Extran a 3% (ou similar).

5.1.7.2 Enxaguar em água corrente para eliminar todo o resíduo de detergente.

5.1.7.3 Enxaguar com água destilada.

5.1.7.4 Secar ao ar em posição emborcada.

5.1.8 Lavagem de microplacas de plástico não autoclaváveis

5.1.8.1 Separar tampa e fundo das microplacas e colocar em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 30 minutos.

5.1.8.2 Enxaguar em água corrente.

5.1.8.3 Colocar em solução de tiosulfato de sódio a 0,5% durante 30 minutos.

5.1.8.4 Mergulhar em solução de Extran a 3% durante 12 horas.

5.1.8.5 Lavar com jato forte de água corrente, enchendo e esvaziando

do cada microplaca, tomando as precauções para que esta lavagem elimine todos os resíduos de cada orifício da microplaca.

5.1.8.6 Enxaguar 6 a 10 vezes em água destilada, enchendo e esvaziando totalmente cada microplaca durante cada passagem.

5.1.8.7 Escorrer bem a água, encher cada microplaca com solução de álcool a 70% e deixar durante 2 horas.

5.1.8.8 Secar as microplacas, deixando escorrer bem todo o álcool em papel de filtro estéril.

## 5.2 Preparação do material

### 5.2.1 Vidraria em geral

5.2.1.1 A guarnição de garrafas e frascos é feita com folha de alumínio dupla colocada no bocal, de tal maneira que o bocal e o gargalo dos frascos fiquem bem vedados.

5.2.1.2 Tubos de ensaio são cobertos com folha de alumínio, agrupados em número de 10 tubos e embrulhados com papel Kraft.

5.2.1.3 Pipetas tipos Mohr tem o bocal tamponado com algodão hidrófilo e são acondicionadas em grupos, em porta-pipetas, com a ponta para baixo.

Uma almofada de folha de alumínio é colocada no fundo da caixa para proteger a ponta das pipetas.

### 5.2.2 Rolhas de borracha

As rolhas de borracha são dispostas ordenadamente em caixas de aço inoxidável que são fechadas e embrulhadas com papel Kraft.

### 5.2.3 Seringas automáticas tipo Cornwall

As seringas automáticas completas são envoltas em guardanapo de pano limpo e embrulhadas com papel Kraft.

### 5.2.4 Pipetador automático tipo Brewer

A seringa de vidro, a válvula de montagem e o tubo de latex com cânula são envoltos em guardanapos de pano limpo e embrulhados em papel Kraft.

### 5.2.5 Porta-filtros

5.2.5.1 Antes da montagem do porta-filtro, todas as partes componentes devem estar completamente secas.

5.2.5.2 Montar o porta-filtro juntamente com as membranas filtrantes adequadas.

5.2.5.3 As borboletas de aperto devem ser somente apertadas a mão e a válvula de purga deve permanecer aberta para autoclavação.

5.2.5.4 As conexões das mangueiras e a válvula de purga devem ser garantidas com folha de papel alumínio.

#### 5.2.6 Vasilhames de pressão de aço inoxidável

Os vasilhames de pressão são garantidos com folha de papel alumínio nas extremidades.

A tampa deve ter uma abertura adequada para permitir a penetração do calor úmido durante a esterilização.

#### 5.2.7 Microplacas não autoclaváveis

A preparação destas microplacas é feita após esterilização.

### 5.3 Esterilização do material

#### 5.3.1 Vidraria em geral

A esterilização da vidraria é normalmente realizada através de calor seco, em estufa de esterilização a  $170^{\circ}\text{C}$  -  $180^{\circ}\text{C}$ , de 4 a 6 horas.

#### 5.3.2 Rolhas de borracha, seringas automáticas e outros materiais que apresentam componentes de borracha autoclaváveis

A esterilização destes materiais é feita através de calor úmido, em autoclave, a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

#### 5.3.3 Porta-filtros e vasilhames de pressão de aço inoxidável

A esterilização destes equipamentos é feita através de calor úmido, em autoclave, a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Ao retirar os aparelhos da autoclave, fechar as válvulas de purga.

#### 5.3.4 Microplacas não autoclaváveis

A esterilização deste material é feita através da exposição das partes internas das tampas e orifícios das microplacas à ação direta da radiação ultra-violeta, durante 12 horas ou microondas após 3 minutos. Após esse período, juntar tampa e fundo, rapidamente e sem tocar na superfície dos orifícios das microplacas, embrulhar em folha de papel alumínio estéril, datar e guardar em armários que tenham boa proteção contra poeira.

### 5.4 Estocagem do material esterilizado

5.4.1 O material deve ser esterilizado em partidas grandes, seja em forno ou em autoclave, para depois ser estocado em local limpo, até o momento de ser usado.

5.4.2 Vidraria limpa e estéril pode ser usada até 2 semanas após a

esterilização desde que cuidadosamente protegida através de uma boa vedação da abertura, pois, contaminações e absorção de substâncias tóxicas da atmosfera podem ocorrer durante a estocagem.

## 5.5 Controle da eficiência da esterilização

### 5.5.1 Calor úmido (autoclave 121°C)

5.5.1.1 Fita controle de autoclave: fixar, sobre a superfície dos objetos a serem esterilizados, uma tira de aproximadamente 4 cm de comprimento.

Após a esterilização, a fita, que antes apresentava uma coloração bege uniforme, apresentará faixas pretas em determinados pontos, indicando que o material foi submetido ao calor.

5.5.1.2 Ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermo philus: em pontos críticos da autoclave, dispor várias ampolas entre os materiais a serem autoclavados.

Depois da autoclavagem, estas ampolas são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24 a 48 horas.

Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve crescimento de bactérias.

### 5.5.2 Calor seco (estufa 170 a 180°C)

Colocar fitas ou pastilhas indicadoras em cada material a ser esterilizado. Após o período determinado de esterilização, retirar o material e verificar se a esterilização se processou normalmente. Essa verificação é feita através da observação das fitas ou pastilhas, pois, para cada marca de indicador, haverá uma cor correspondente indicando que foi atingida a temperatura de esterilização.

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAIS

A-1 Cuidados especiais: ver Norma CETESB L5.009 - Segurança do trabalho em laboratório de microbiologia.

A-2 Ao preparar soluções com ácidos nunca adicionar a água sobre o ácido (pois isto poderá provocar sérios riscos ao operador), mas sim ácido a água.

A-3 Após a lavagem, secagem e esterilização, a vidraria deverá ser inspecionada por transparência à claridade: manchas nos vidros podem ser causadas por reagentes corrosivos, produtos de meio de cultura, resíduos de detergentes ou através de mecanismos abrasivos da lavagem normal por escovas (gaspilhão) gastas. Vidrarias que se apresentarem manchadas, após processos de lavagem devem ser descartadas.

A-4 Variado grau de toxidez pode ser apresentado pelo vidro, mas ela pode ser eliminada com certos cuidados especiais na lavagem. Essa toxidez pode ser diminuída tratando-se a vidraria antes do uso, com ácido clorídrico. Para tanto, encher cada frasco com solução de ácido clorídrico a 1% e deixar durante 12 horas. Em seguida proceder como descrito no item 5.1.1.3 ao 5.1.1.6. Antes da secagem do material, autoclavar os frascos com água destilada a 121°C durante 15 minutos.

A-5 As rolhas de borracha anti-ácidas, quando novas, devem ser submetidas ao seguinte tratamento, antes de entrarem em uso:

- a) ferver em solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,4%, durante 30 minutos;
- b) lavar em água corrente, durante 15 minutos;
- c) ferver em solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,4%, durante 30 minutos;
- d) lavar em água corrente durante 1 hora;
- e) ferver em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 4%, durante 30 minutos;
- f) lavar em água corrente, durante 1 hora;
- g) enxaguar em água destilada, 3 vezes;
- h) secar em estufa ou ao ar.

A-6 Quando as rolhas anti-ácidas, já usadas, tiverem indevidamente secado com substância orgânica aderida, recomenda-se fervê-las em

---

solução de bicarbonato de sódio a 4%, deixá-las 1 hora em água corrente, enxaguá-las bem em água destilada e secá-las em estufa ou ao ar.

---

/Anexo B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 BERG, G. et alii. Usepa Manual of methods for virology. Cincinnati, EPA, s.d. 1983 p.i.
- B-2 LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 5 ed. Broadway, American Public Health Association, 1979. 1138 p.
- B-3 PAUL, J. Cell and tissue culture 4 ed. London, E. & Livingstone, 1970. 171 p.
- B-4 PELCZAR, M. et alii. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1980. v.1.
- B-5 RIZZO, E. et alii. Técnicas básicas de cultura celular. São Paulo, Instituto Butantan e Instituto Adolfo Lutz. 1983. 133 p.
-