

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ANA CRISTINA VASCONCELOS FIALHO

**BIOSSEGURANÇA NO CONTROLE DA INFECÇÃO HOSPITALAR:
Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de
Staphylococcus aureus em áreas críticas hospitalares**

São Carlos - SP

2011

ANA CRISTINA VASCONCELOS FIALHO

**BIOSSEGURANÇA NO CONTROLE DA INFECÇÃO HOSPITALAR:
Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de
Staphylococcus aureus em áreas críticas hospitalares**

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira – Orientador

Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira – Orientador Pontual

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa – Coorientadora

São Carlos - SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F438bc

Fialho, Ana Cristina Vasconcelos.

Biossegurança no controle da infecção hospitalar :
desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para
detecção de *Staphylococcus aureus* em áreas críticas
hospitalares / Ana Cristina Vasconcelos Fialho. -- São
Carlos : UFSCar, 2011.

191 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Biotecnologia. 2. Biossegurança. 3. Infecção hospitalar.
4. Imunossensor. 5. Eletrodos impressos. 6. *Staphylococcus
aureus*. I. Título.

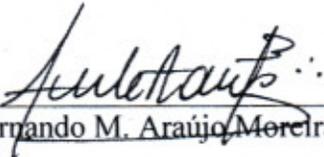
CDD: 660.6 (20^a)

Ana Cristina Vasconcelos Fialho

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 21/10/2011

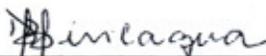
BANCA EXAMINADORA

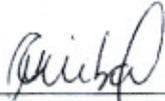

Prof. Dr. Fernando M. Araújo Moreira

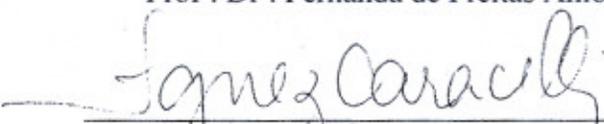

Prof. Dr. Antonio Ap. Pupim Ferreira

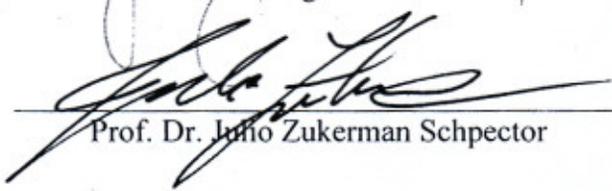

Prof. Dr. Hideko Yamanaka


Prof. Dr. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor


Prof. Dr. Denise Bevilaqua


Prof. Dr. Fernanda de Freitas Anibal


Prof. Dr. Ignez Caracelli


Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos:

ERICK, obrigada pelo seu amor, companheirismo, proteção e por estar comigo em todos os momentos;

BRUNO, obrigada pela compreensão, paciência e amor a mim dispensados;

IRAN, obrigada pelo amor incondicional, carinho, compreensão e companheirismo.

Desculpem pela minha ausência, mas não há presença mais sentida do que através do amor e este é pleno em meu coração. “O amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta, o amor jamais acaba” (I Coríntios 13:4-7). Amo vocês acima de tudo.

À minha mãe **ALZENIRA**:

Minha amiga, protetora e incentivadora, por todo o sacrifício feito em prol de minha educação e por seu amor constante em minha vida. Te amo mãe.

Ao meu pai **ARMANDO** (*in memoriam*) por saber que onde você estiver estará orgulhoso de mim como fazia quando eu era criança. Saudades de você meu pai.

À minha sobrinha **ANA CAROLINA**:

Pelo amor, pela ajuda imprescindível para realização deste sonho e pela preocupação constante para comigo. Amo você.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS PAI ETERNO**, meu amparo e sustento, por ter me dado forças, perseverança, determinação e entusiasmo, através de minha fé, para concretizar este sonho. “Deus como me fizestes sentir a tua existência e ver que a essência da vida é acreditar que somos capazes mesmo diante do impossível” (Ana Cristina Fialho, 2010).

À minha neta Isabella por ter trazido alegria e amor para todos. Luz de nossas vidas!

Aos meus irmãos Sidney, Flávio, Heloisa e Maurício pelo amor, apoio, incentivo e a certeza de estarem comigo em todos os momentos. Meu amor por vocês é imensurável.

Aos meus sobrinhos Sidney, Amanda, Flávio, Raíssa, Vitória e Vinícius pelo carinho e amor com que sempre me trataram. Aprendi amá-los como meus.

À minha tia Maria José (tia Santa) e minha avó Liduina (mamãe Dudu) - *in memorian*, pelo amor, pela grande contribuição para minha educação e por ter cuidado de mim como filha.

À minha amiga Dora pelo seu amor fraternal e por sempre se preocupar comigo.

As minhas cunhadas Marinalva e Márcia pelo carinho e consideração.

À Juliana por sua constante preocupação, carinho e cuidados para comigo.

À Raphaella por ter nos brindado com a nossa Isabella.

À Maria Amélia e Lúcia por terem cuidado de meus filhos.

Aos meus amigos e colegas de profissão Leônidas Deolindo, Iran Lima (*in memorian*), Lúcia Reis e Francisca Tereza pela imensa ajuda e apoio quando mais precisei.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Fernando M. de Araújo Moreira, pelo seu apoio e incentivo, por ter acreditado e confiado em mim, mesmo com esta idéia que todos achavam maluca.

Ao meu orientador Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira (enviado de Deus), meu grande amigo, pela paciência em me ensinar os passos na área de biossensores e na introdução às técnicas eletroquímicas. Sem sua inestimável contribuição este trabalho não teria sido possível.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa, minha amiga de todos os momentos, pelas idéias e incentivo às produções científicas e pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia.

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior, por conceder meu afastamento para cursar o doutorado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNESP- Araraquara através dos professores: Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka (Laboratório de Eletroanalítica, Departamento de Química Analítica) por ter me acolhido e encaminhado na realização deste trabalho; Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti e Prof. Dr. Cecílio Sadao Fugivara (Laboratório de Eletroquímica, Departamento de Físico-Química) por permitirem a utilização dos laboratórios para realização dos experimentos.

Aos colegas de laboratório Marcos, Naira, Fabíola e Adriano pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos: Edvan, Edjane, Karen, Leyla, Marcos, Marcelo, Messias, Odilon, Quésia e Ulisses pelo companheirismo, momentos de alegria e descontração.

À minha querida amiga Naira Favoretto que esteve ao meu lado me incentivando e ajudando nos momentos difíceis.

Ao Mauro Caler pela amizade e grande ajuda.

À Cláudia Regina Pastega De Toledo pela atenção e disponibilidade quando requeridos os serviços da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar.

À Vanessa Bardaquim e Douglas pela ajuda nos preparos das lâminas e soluções.

Ao Leonélio Cichetto Junior pela ajuda na preparação da apresentação do dispositivo em Power point.

Ao Renato (Kastor), William e Diego pela amizade e pelos lanches.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

(Fernando Sabino)

RESUMO

BIOSSEGURANÇA NO CONTROLE DA INFECÇÃO HOSPITALAR: Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de *Staphylococcus aureus* em áreas críticas hospitalares. A Biossegurança constitui uma ferramenta de grande relevância para o Controle da Infecção Hospitalar estabelecendo através de métodos, técnicas e normas, condutas a serem adotadas com o intuito de prevenir e controlar os riscos que podem favorecer à infecção hospitalar. Este trabalho relata o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico para detecção de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), em áreas críticas hospitalares (Centros Cirúrgicos e Unidades de Terapia Intensiva) visando contribuir para o controle de infecção hospitalar. Diferentes parâmetros foram estudados: imobilização direta da proteína A de *S. aureus* na superfície do transdutor ou eletrodo de trabalho (*screen-printed electrode* - SPE); imobilização da proteína A sobre SPEs modificados com monocamadas auto-organizadas (SAMs) de cistamina (CYS) e glutaraldeído (GA); diferentes tempos de incubação e diluições foram utilizados tanto para os modificadores como para a proteína A e anticorpos anti-*S. aureus*; bloqueio com soroalbumina bovina (SAB) e imunoensaio (reação antígeno-anticorpo, Ag-Ac). Técnicas eletroquímicas (espectroscopia de impedância eletroquímica - EIS e voltametria cíclica - VC) e não eletroquímicas (microscopias) foram utilizadas para a caracterização e construção do imunossensor. As medidas de impedância e voltametria cíclica mostraram bons resultados com monocamadas auto-organizadas de cistamina $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e glutaraldeído 2,5% com tempos de incubação de 2 e 1 h, respectivamente; assim como as imobilizações da proteína A 1:20 ($t_{\text{incub}} = 12 \text{ h}$); Ac monoclonais anti-*S. aureus* ($t_{\text{incub}} = 3 \text{ h}$) e etapa de bloqueio com SAB 0,5% ($t_{\text{incub}} = 1 \text{ h}$). Na interação Ag-Ac utilizou-se cepas de *S. aureus* ATCC - 6535 (analito) e incubação de 30 min. O imunossensor desenvolvido indicou ser um método efetivo para monitoramento de *S. aureus* em ambiente hospitalar e que pode ser aplicado como instrumento indicativo da efetividade das normas e condutas aplicadas para o controle de infecção hospitalar.

Palavras chaves: Biossegurança hospitalar. Infecção hospitalar. Imunossensor. Eletrodos impressos. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

BIOSAFETY IN THE CONTROL OF HOSPITAL INFECTION: Development of an impedimetric immunosensor for detection of *Staphylococcus aureus* in critical areas of hospitals. The Biosafety is a very important tool for the Control of Hospital Infection establishing through methods, techniques and standards, measures to be adopted in order to prevent and control risks that may contribute to hospital infection. This work reports the development of an impedimetric immunosensor for detection of pathogenic bacteria, specifically *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), in hospital critical areas (Surgical Centers and Intensive Care Units) to contribute to the hospital infection control. Different parameters were studied: direct immobilization of protein A of *S. aureus* on the surface of the transducer or the working electrode (screen-printed electrode - SPE), immobilization of protein A on SPEs modified with self-assembled monolayers (SAMs) of cystamine (CYS) and glutaraldehyde (GA); different incubation times and dilutions were used for both modifiers as for protein A and anti-*S. aureus* antibodies; blocking with bovine serum albumin (BSA) and immunoassay (antigen-antibody reaction, Ag-Ab). Electrochemical techniques (electrochemical impedance spectroscopy - EIS and cyclic voltammetry - CV) and non electrochemical (microscopy) were used for the characterization and construction of the immunosensor. The impedance measurements and cyclic voltammetry showed the good results with self-assembled monolayer of cystamine $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ and glutaraldehyde 2,5% with incubation periods of 2 and 1h, respectively; immobilization of protein A 1:20 ($t_{\text{incub}} = 12 \text{ h}$) and anti-*S. aureus* monoclonal Ab ($t_{\text{incub}} = 3 \text{ h}$) and step blocking with 0.5% BSA ($t_{\text{incub}} = 1 \text{ h}$). For the Ag-Ab interaction *S. aureus* ATCC - 6535 strains (analyte) were used and incubation for 30 min. The immunosensor developed has proven to be an effective method for monitoring of *S. aureus* in a hospital environment and that can be applied as an indicative tool of the effectiveness of the standards and procedures applied to the control of hospital infection.

Keywords: Biosecurity hospital. Hospital Infection. Immunosensor. Screen-printed electrodes. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da Simbologia das Cores para elaboração de mapa de risco.....	21
Figura 2	Exemplo de mapa de risco do centro cirúrgico e laboratório de reprodução humana e o grau de contaminação do ambiente hospitalar.....	22
Figura 3	Representação esquemática dos componentes de um biossensor.....	29
Figura 4	Representação esquemática da classificação dos biossensores baseada no sistema de transdução utilizado.....	38
Figura 5	Representação esquemática das estruturas componentes do anticorpo.....	48
Figura 6	Representação esquemática das associações não-covalentes entre o antígeno e o anticorpo.....	50
Figura 7	Componentes de um eletrodo impresso de ouro - adquirido da BVT Technologies.....	53
Figura 8	Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método de adsorção.....	54
Figura 9	Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método da ligação covalente.....	55
Figura 10	Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método da ligação covalente cruzada (<i>cross linking</i>).....	56
Figura 11	Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método de encapsulamento.....	57
Figura 12	Representação esquemática de formação de monocamadas auto-organizadas sobre substrato de ouro.....	58
Figura 13	Representação dos métodos de imobilização de anticorpos (IgG), de forma orientada.....	60
Figura 14	Representação de imobilização de anticorpos de forma aleatória e influência sobre sua atividade de ligação com o antígeno.....	61
Figura 15	Representação do Diagrama de Nyquist ideal.....	63
Figura 16	Representação de uma onda do potencial do eletrodo de trabalho com uma função triangular em relação ao eletrodo de referência.....	65

Figura 17	Descrição do eletrodo impresso.....	71
Figura 18	Imagens dos eletrodos impressos empregadas nos cálculos das áreas geométricas.....	71
Figura 19	Esquema da imobilização dos anticorpos monoclonais anti- <i>S. aureus</i> na superfície de ouro do eletrodo impresso.....	75
Figura 20	Esfregaço em lâmina pela coloração de Gram para <i>S. aureus</i>	77
Figura 21	Esquema da câmara úmida.....	78
Figura 22	Imagem em microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho (SPE) com ampliação de 700 ×.....	80
Figura 23	Voltamogramas cíclicos dos eletrodos SPE em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , sobre eletrodo de trabalho não modificado (a), e o eletrodo modificado com CYS (b), CYS-GA (c), CYS-GA-Proteína A (d) e CYS-GA-Proteína A-Ac (e). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%); A _{geom} = 0,0070 cm ² ; v = 20 mV s ⁻¹ . Eletrodo de referência: Ag-Pd (98/2%).....	83
Figura 24	Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado diretamente com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempos de incubação de 2 h (b) e 12 h (d) e na diluição de 1:10 com tempo de incubação de 2 h (c) em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%). Inseto: ampliação dos resultados de impedância para o eletrodo sem modificação.....	85
Figura 25	Estrutura da molécula de metionina e o enxofre de sua composição.....	86
Figura 26	Diagramas no plano complexo em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ para eletrodo impresso modificado diretamente com a proteína A nas diluições de 1:10 (a) e 1:20 (b) e com tempo de incubação de 2 h; imobilização do anticorpo monoclonal anti- <i>S. aureus</i> na diluição de 1:50 e com o tempo de incubação de 2 h sobre a superfície de ouro contendo a proteína A adicionada diretamente nas diluições de 1:10 (c) e 1:20 (d). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).....	87

Figura 27	Representação de modelo molecular de resíduos funcionais de IgG humana.....	88
Figura 28	Modelo molecular da porção F _c da IgG (vermelho) se ligando com a proteína A (em verde).....	89
Figura 29	Representação esquemática da ligação da proteína A com a superfície do eletrodo (E _T) e desta com a porção F _c do anticorpo.....	89
Figura 30	Diagramas no plano complexo em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ para eletrodo impresso modificado diretamente com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempo de incubação de 12 h (a); imobilização do anticorpo monoclonal anti- <i>S. aureus</i> nas diluições de 1:20 sobre a superfície de ouro contendo a proteína A adicionada diretamente com tempos de incubação de 6 (b) e 3 h (c). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).....	90
Figura 31	Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado com cistamina nas concentrações de 4 x 10 ⁻² (b) e 2 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (c) em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%). Inseto: ampliação dos resultados na região de altas frequências.....	91
Figura 32	Estrutura da molécula de cistamina.....	92
Figura 33	Representação esquemática da superfície de ouro com cistamina (CYS).....	92
Figura 34	Representação esquemática da ligação CYS-GA à superfície do ouro.....	93
Figura 35	Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a) e nas modificações com CYS 2 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ (b), CYS-GA (c), imobilizações da proteína A sobre a SAM de cistamina via glutaraldeído (d) e anticorpo sobre a proteína A (e), bloqueio da superfície de trabalho com SAB (f) e imunoenensaio antígeno-anticorpo na superfície do transdutor (g) em solução tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 1 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).....	94
Figura 36	Ligação da IgG com o antígeno.....	96

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1	Diferentes áreas de aplicações dos biossensores.....	33
Esquema 1	Representativo da classificação dos biossensores.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
A_{geom}	Área geométrica
Ag-Ac	Antígeno – anticorpo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A_U-SR	Ouro – tiol
CC	Centro cirúrgico
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
C_d	Capacitância da dupla camada
CDC	Center for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos)
CIH	Controle de infecção hospitalar
CIPA	Comissão Interna de Prevenção de Acidentes
C_L	Cadeia leve (<i>light</i>)
C_H	Cadeia pesada (<i>heavy</i>)
CYS	<i>Cystamine</i> (Cistamina)
E_A	Eletrodo auxiliar
EIE	Espectroscopia por impedância eletroquímica
EPI	Equipamento de Proteção Individual
E_R	Eletrodo de referência
E_T	Eletrodo de trabalho
F_{ab}	Fragment, Antigen-Binding (Fragmento de ligação ao antígeno)
F_c	Fração cristalizável
FET	Transistor de efeito de campo
FRA	<i>Frequency Response Analyses</i> (Analisador de resposta em frequência)
FRET	Transferência de energia de ressonância fluorescente
GA	Glutaraldeído
GOx	Glicose oxidada
HRP	<i>Horseradish root</i> (enzima peroxidase)
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina do tipo G

IH	Infecção Hospitalar
ISE	Eletrodos íons seletivos
ISFET	Transistor de efeito de campo seletivo a íons
log Z 	Logaritmo da impedância
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da Saúde
PNA	Ácido nucléico peptídico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução tampão fosfato salino)
PCIH	Programa de Controle de Infecção Hospitalar
PIM	Polímero de impressão molecular
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i> (policloreto de vinil)
QAI	Qualidade do ar interno
QCM	<i>Quartz crystal microbalance</i> (Microbalança de quartzo)
rad/s	Radiano por segundo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R_e	Resistência do eletrólito
R_{tc}	Resistência da transferência de carga
S	Enxofre
SAB	Soroalbumina bovina
SAM	<i>Self assembled monolayer</i> (Monocamadas auto-organizadas)
SED	Síndrome do Edifício Doente
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPE	<i>Screen printed electrode</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Variável
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância total
Z_{im}	Impedância imaginária
Z_{re}	Impedância real

Sumário

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Biossegurança.....	16
1.2 Biossegurança hospitalar.....	18
1.3 Infecção hospitalar.....	22
1.4 Métodos de controle de infecção hospitalar.....	24
1.5 Qualidade do ar interno (QAI) do ambiente hospitalar	25
1.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	27
1.7 Biossensores.....	28
1.7.1 Desenvolvimento dos biossensores: histórico.....	30
1.7.2 Aplicações dos biossensores.....	32
1.7.3 Características ideais para os biossensores.....	34
1.7.4 Classificação dos biossensores.....	35
1.7.5 Classificação dos biossensores de acordo com o mecanismo de interação.....	35
1.7.5.1 Biossensores catalíticos ou enzimáticos.....	36
1.7.5.2 Biossensores de afinidade.....	36
1.7.6 Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores.....	37
1.7.7 Imunossensores.....	42
1.7.7.1 Componentes dos imunossensores.....	43
1.8 Elemento de biorreconhecimento - anticorpo.....	44
1.9 Imunologia – conceitos básicos.....	44
1.9.1 Antígenos.....	45
1.9.2 Anticorpos.....	46
1.9.2.1 Classificação dos anticorpos.....	46
1.9.2.2 Estrutura dos anticorpos.....	46
1.9.3 Interação antígeno-anticorpo.....	48
1.10 Eletrodos impressos (<i>screen-printed electrodes- SPEs</i>).....	51
1.11 Eletrodos modificados.....	53
1.11.1 Adsorção.....	54
1.11.2 Ligação covalente.....	55

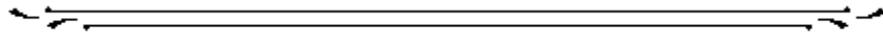
1.11.3 Ligação covalente cruzada (<i>crosslinking</i>).....	55
1.11.4 Encapsulação	56
1.12 Monocamadas auto-organizadas (<i>self-assembled monolayer - SAM</i>).....	57
1.13 Imobilização de anticorpos.....	58
1.14 Técnicas eletroquímicas.....	61
1.14.2 Espectroscopia por impedância eletroquímica (EIE).....	61
1.14.2 Voltametria cíclica.....	64
1.15 OBJETIVOS.....	66
CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO.....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1 Reagentes e soluções.....	68
2.2 Equipamentos para medidas eletroquímicas	69
2.3 Eletrodos impressos e célula eletroquímica.....	70
2.4 Metodologia.....	72
2.4.1 Manipulação e limpeza dos eletrodos impressos.....	72
2.4.2 Modificações do eletrodo de trabalho (E_T) dos SPE empregando SAM de cistamina e glutaraldeído.....	73
2.4.3 Imobilização da proteína A para <i>Staphylococcus aureus</i> via glutaraldeído na cistamina e diretamente sobre a superfície de trabalho do SPE	73
2.4.4 Imobilização dos anticorpos monoclonais anti- <i>Staphylococcus aureus</i> sobre a superfície do transdutor modificada com SAMs e proteína A.....	74
2.4.5 Bloqueio dos espaços livres entre os anticorpos com soroalbumina...76	
2.4.6 Interação antígeno-anticorpo na superfície de trabalho dos eletrodos impressos.....	76
2.4.7 Condições experimentais para as medidas de impedância.....	77
2.4.8 Monitoramento voltamétrico das modificações e imobilizações da superfície de trabalho do SPE.....	77
2.4.9 Análise da superfície de trabalho (E_T - SPE) por microscopia eletrônica de varredura.....	78

CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1 Caracterização da superfície do eletrodo de trabalho - SPE empregando técnica não-eletróquímica: microscopia eletrônica de varredura.....	80
3.2. Caracterização das SAMs, imobilizações da proteína A de <i>S. aureus</i> e anticorpo monoclonal anti- <i>S. aureus</i> usando técnicas eletroquímicas.....	80
3.2.1 Voltametria cíclica.....	80
3.2.2 Estudos de impedância eletroquímica.....	83
CAPITULO IV: CONCLUSÕES	98
CAPITULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO	112

Livro publicado:

A. C. V. Fialho; F. M. Araújo-Moreira; C. L. Almeida; A. A. P. Ferreira; C. P. Sousa.
BIOSSEGURANÇA NA ÁREA DE SAÚDE: uma abordagem interdisciplinar.
1ª. ed., São Carlos: EDUFSCar, 87 p., 2011.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS



1. INTRODUÇÃO

As atividades desenvolvidas nos ambientes de saúde, especialmente em ambientes hospitalares, requerem cuidados especiais por parte de todos aqueles que trabalham ou circulam nestas áreas visto que são consideradas locais que podem se tornar insalubres. As equipes de profissionais, inclusive terceirizados, pacientes, visitantes, acompanhantes, todos devem estar comprometidos com a recuperação da saúde dos pacientes e notadamente com o Controle de Infecção Hospitalar (CIH). Assim, o controle de infecção hospitalar tem se tornado um grande desafio para todos, no âmbito dos países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos, na premissa de evitar danos aos pacientes, altos custos de tratamento e acentuada taxa de mortalidade. A Infecção Hospitalar (IH) alcança uma média mundial em torno de 5%, no Brasil essa ocorrência é de 15,5%, dados bastante preocupantes por ocupar o terceiro lugar entre as maiores causas de morte, ficando atrás apenas de acidentes de trânsito e doenças cardiovasculares (SILVA, 2003).

Pelo exposto, medidas efetivas para o CIH são necessárias e urgentes objetivando a proteção dos pacientes, trabalhadores e frequentadores do ambiente hospitalar.

O desenvolvimento de um imunossensor possibilita a detecção de bactérias patogênicas, especialmente os *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) por ser considerado um dos principais agentes causadores de IH. Assim, há uma efetiva contribuição para o controle da contaminação do ar do ambiente hospitalar através da monitoração do mesmo e concomitantemente uma avaliação das normas de Biossegurança aplicadas para este fim.

1.1 Biossegurança

A Biossegurança é uma área que trata não somente da proteção do homem, animais e meio ambiente, mas também das relações harmônicas destes com as atividades exercidas nos ambientes de saúde, laboratoriais, de ensino, pesquisa, extensão e industriais, que requeiram ambientes não contaminados. Todas as

atividades laborais exercidas nestes ambientes devem ser regidas por portarias e leis municipais, estaduais e federais e possuir normas específicas que contemplem todas as funções exercidas nos setores, devendo as mesmas ser de conhecimento de todos os envolvidos e contidos em manuais elaborados especificamente para os ambientes.

Para Teixeira e Valle (2010) biossegurança é o conjunto de medidas destinadas para prevenção, eliminação ou diminuição de riscos relacionados às atividades de produção, ensino, pesquisa, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços que podem comprometer a qualidade dos trabalhos realizados ou a saúde dos animais, meio ambiente e do homem. A abrangência do conceito caracteriza a preocupação de proteção e prevenção para que o equilíbrio harmônico entre homem, animais e natureza não seja interceptado.

Neste contexto, analisando as atividades realizadas no âmbito hospitalar podem-se definir como insalubres à medida que haverá um ambiente passível de contaminação. Assim sendo, é de vital importância o conhecimento tanto dos riscos do ambiente laboral quanto das medidas existentes para prevenção, controle, minimização e reparação destes riscos. Estas medidas estão voltadas principalmente para o Controle de Infecção Hospitalar consideradas como grande problema de saúde pública.

Segundo as diretrizes estabelecidas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) as medidas de Biossegurança abrangem as precauções padrão e as precauções baseadas na transmissão ou precauções adicionais. As precauções padrão são consideradas as estratégias mais importantes para o CIH. Elas devem ser utilizadas e aplicadas para todos os pacientes, independentemente de diagnóstico ou percepção de um estado de infecção. Essa aplicação destina-se a reduzir o risco de transmissão de microrganismos a partir de fontes conhecidas ou desconhecidas (OSBORNE, 2003). Já as precauções baseadas na transmissão ou precauções adicionais são aplicadas quando o paciente é reconhecidamente infectado ou suspeito de infecção, elas são utilizadas quando as precauções padrões por si só não são suficientes para interceptar a infecção e incluem as precauções aéreas, por gotículas e por contato.

As normas da precaução padrão incluem: higienização das mãos; uso adequado de equipamentos de proteção individual (EPI); cuidados com instrumentos e equipamentos; limpeza do ambiente; materiais perfurocortantes e manejo da roupa

suja/contaminada. Considera-se conduta adicional importante o descarte dos resíduos de saúde que devem obedecer rigorosamente uma sequência de etapas que vão desde o local de geração do resíduo até sua disposição final, sugeridas no manual de Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde do Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2011).

1.2 Biossegurança hospitalar

O risco de contaminação no ambiente hospitalar é constante e aumenta proporcionalmente se medidas de contenção de contaminação não forem adotadas. Esta contaminação pode ser considerada essencialmente endógena quando gerada dentro do próprio hospital pelos pacientes, profissionais, visitantes e demais frequentadores. As próprias pessoas e os fômites, isto é, objetos inanimados como pratos, copos, talheres, maçanetas, corrimãos, toalhas, duchas higiênicas, laringoscópios, dentre outros; materiais e instrumentais que tenham contato com o paciente, assim como, as superfícies como bancadas, armários, mesas, paredes, piso, etc., os quais servem de nicho para albergar microrganismos (FIALHO et al., 2011).

Diante de tantas fontes de contaminação foram instituídas medidas como a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 50 de 21 de fevereiro de 2002 (ANVISA, 2011a) que dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos de saúde foram instituídos. Esta resolução sofreu uma alteração através da Resolução – RDC n° 189, de 18 de julho de 2003 (ANVISA, 2011b), onde houve alteração do Regulamento Técnico aprovado pela RDC n° 50 de 21 de fevereiro de 2002 visando estabelecer padrões para a arquitetura destes estabelecimentos com o intuito de prevenir as infecções hospitalares.

Outro critério instituído nos ambientes hospitalares foram as normatizações com relação a renovação do ar em áreas consideradas críticas, também através da Resolução RDC n° 50 de 21 de fevereiro de 2002 (ANVISA, 2011a), onde preconiza que as entradas de ar externo devem ficar o mais alto possível em relação ao nível do piso e devem estar afastadas das saídas de ar, dos incineradores e chaminés

das caldeiras. Estas saídas devem estar localizadas junto ao chão e devem seguir a Resolução RE nº 9 de 16 de janeiro de 2003 (ANVISA, 2011c), que determina a publicação de Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor, sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.

Lacerda (2003) e Alexander (2011) relatam que as áreas hospitalares possuem uma classificação, de acordo com o risco de contaminação, para poder facilitar os procedimentos de limpeza, desinfecção e mesmo a circulação de pessoas. Estas áreas são denominadas como críticas, semicríticas e não-críticas.

- Áreas críticas:

São os locais onde há pacientes mais graves devido a baixa imunidade, maior número de infecções e onde os procedimentos são mais invasivos. Correspondem aos Centros Cirúrgicos (CCs), Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), berçários, unidades de Transplantes, Hemodiálise, Banco de Sangue, dentre outros.

Nestas áreas é indicada a utilização de roupa privativa, gorro, máscara e luvas (barreiras físicas).

- Áreas semicríticas:

São aquelas onde há pacientes internados, porém o risco de infecção é menor. São as enfermarias, apartamentos, ambulatórios, salas de curativos, pronto atendimento, salas de pequenas cirurgias, banheiros, salas de exame e procedimentos, dentre outros.

È indicado que durante os procedimentos sejam utilizados aventais e luvas.

- Áreas não-críticas:

Correspondem as áreas em que o risco de contaminação é quase inexistente, como diretoria, recepção, departamento de pessoal, almoxarifado, dentre outros.

Podem ser utilizadas roupas comuns e há livre circulação das pessoas.

Outro ponto relevante na Biossegurança Hospitalar é o processamento dos artigos, os quais são também classificados de acordo com seu grau de contaminação para processamento e posterior reutilização. Os artigos podem ser:

- **Críticos:**
Possuem alto risco de infecção se estiverem contaminados. São todos aqueles artigos perfurocortantes que entram em contato com os tecidos ou tratos estéreis. Estes instrumentos devem ser preferencialmente descartados, mas na necessidade de reutilização devem ser criteriosamente esterilizados. Ex: instrumentais cirúrgicos, borracha para aspiração, cateteres, endoscópio, laringoscópios, dentre outros.
- **Semicríticos:**
Entram em contato com pele não íntegra, isto é com solução de continuidade, e membranas mucosas. Estes artigos devem ser no mínimo desinfetados ou esterilizados. Ex: inaladores, máscara de nebulização, Ambu, cânula de Guedel, espéculos vaginais, dentre outros.
- **Não-críticos:**
São os artigos que entram em contato com a pele íntegra, necessitando apenas a desinfecção quando de sua reutilização. Ex: termômetros, esfigmomanômetros, estetoscópios, comadres, bacias, cubas, dentre outros.

O hospital tem como objetivo principal a prestação de serviços na área de saúde que devem apresentar qualidade, eficácia e eficiência. Assim, para que haja segurança no ambiente hospitalar deve haver uma complexidade de temas o que requer envolvimento multiprofissional para proposição, tomadas de decisões e execuções de normas objetivando a promoção de práticas seguras de trabalho e ambientes com minimização ou ausência de riscos.

Considera-se risco a probabilidade de ocorrer algum dano ao indivíduo em suas atividades laborais, portanto a avaliação dos riscos ambientais em locais de trabalho é de fundamental importância. A avaliação dos riscos ambientais tem como objetivo principal a proteção dos trabalhadores e do meio ambiente através da análise da periculosidade ou patogenicidade do agente específico (HIRATA; MANCINI FILHO, 2008). Neste contexto, a elaboração do **Mapeamento de Riscos Ambientais** é essencial para todos os locais de trabalho, onde deverá haver um levantamento de informações sobre os riscos no ambiente e assim elaborada a representação gráfica do reconhecimento dos riscos existentes, devendo ser de conhecimento dos trabalhadores e afixados em locais de fácil visualização. No Brasil

o mapeamento de riscos surgiu através da Portaria n°. 5 de 17 de agosto de 1992, modificada pela Portaria n°. 25 de 29 de dezembro de 1994 e Portaria n°. 8 de 23 de fevereiro de 1999, tornando obrigatória a elaboração de mapas de risco pelas CIPAs das empresas (ANVISA, 2011d). Para elaboração do mapa de riscos é necessário primeiro saber os tipos de riscos classificando-os por grau de perigo (pequeno, médio e grande) e grupos conforme mostra a Figura 1.

Simbologia das Cores			Risco Químico Leve		Risco Físico Leve
No mapa de risco, os riscos são representados e indicados por círculos coloridos de três tamanhos diferentes, a saber:			Risco Químico Médio		Risco Físico Médio
			Risco Químico Elevado		Risco Físico Elevado
			Risco Biológico Leve		Risco Ergonômico Leve
	Risco Biológico Médio		Risco Ergonômico Médio		Risco Mecânico Médio
	Risco Biológico Elevado		Risco Ergonômico Elevado		Risco Mecânico Elevado

Figura 1. Representação da Simbologia das Cores para elaboração de mapa de risco. Disponível em: < <http://www.cipa.uem.br/Mapaderisco/mapaderisco01.php> >, acesso em 28.09.2011.

A elaboração do mapeamento de riscos deve ter como base a planta baixa ou croqui do ambiente mapeado. Os círculos coloridos e o tamanho devem informar o tipo e a gravidade do risco e colocados nos locais onde estão os riscos, conforme exemplificado na Figura 2. É importante que as informações sejam verdadeiras, tornando o Mapa de Risco um retrato da situação de segurança e higiene no ambiente de trabalho. O mapeamento deve ser sempre atualizado de modo que cada vez mais os profissionais aprendam a identificar e registrar graficamente os focos de acidentes contribuindo para seu controle e eliminação (HIRATA; MANCINI FILHO, 2008; ANVISA, 2011d).

A importância do mapeamento de risco para este trabalho é que o mapa serve de documento ou ferramenta comprobatória das áreas críticas do ambiente hospitalar que é considerado de grau 3 de contaminação de acordo com o Quadro I da NR 4.

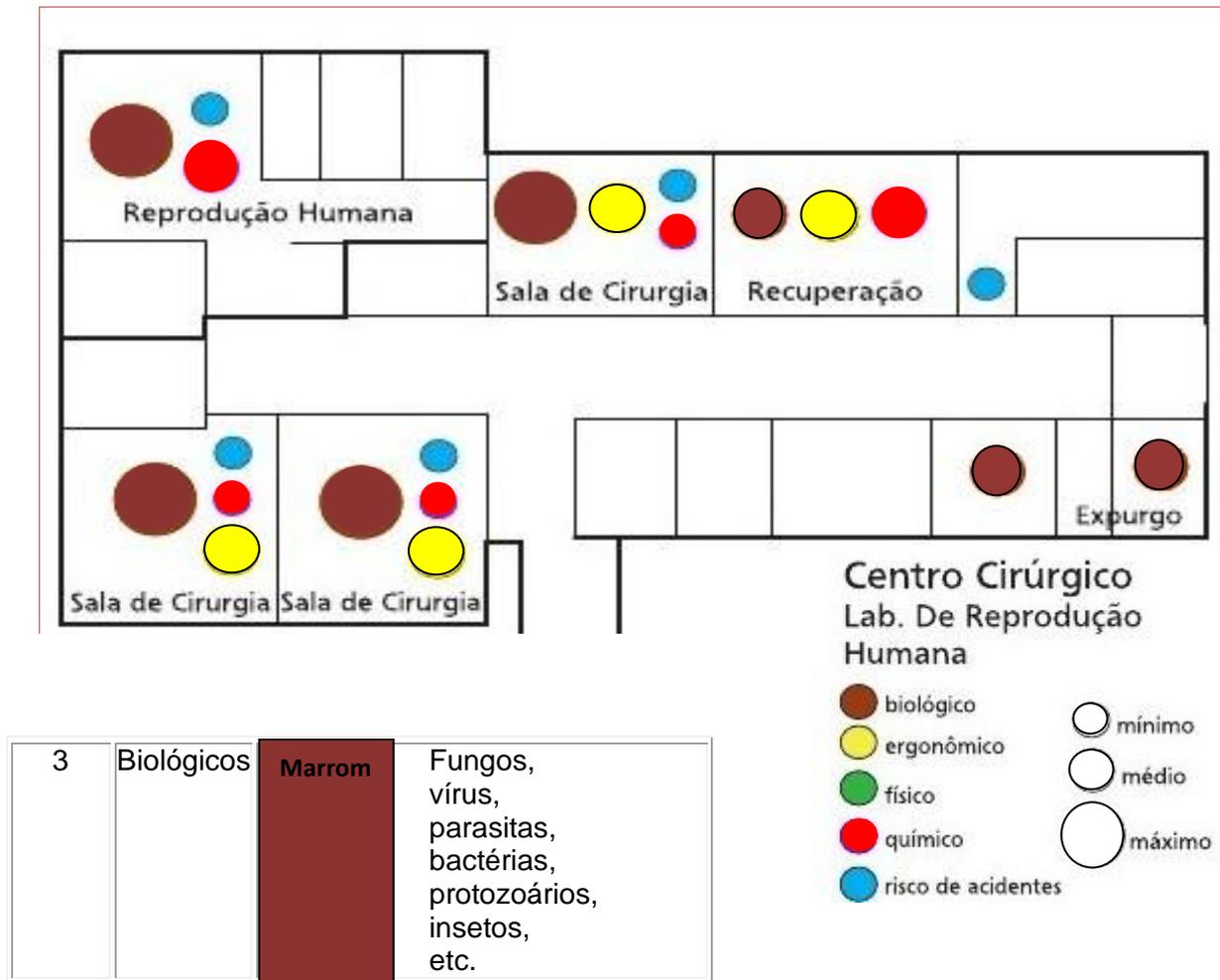


Figura 2. Exemplo de mapa de risco do centro cirúrgico e laboratório de reprodução humana e o grau de contaminação do ambiente hospitalar. Disponível em: < <http://www.cipa.uem.br/Mapaderisco/mapaderisco01.php> >, acesso em 28.09.2011.

1.3 Infecção hospitalar

De acordo com o Anexo II da Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde, a Infecção Hospitalar (IH) é aquela adquirida após a internação do paciente e se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Quando o período de incubação do microrganismo for desconhecido e não houver evidência clínica ou dados laboratoriais de infecção no momento da internação, convencionou-se IH toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 horas após a admissão do paciente. Também podem ser consideradas IH aquelas manifestadas

antes das 72 horas de internação e que estejam associadas a procedimentos de diagnósticos ou terapêuticos realizados neste período (BRASIL, 2011b).

Nogueira et al. (2009) relatam que este período de 72 horas foi convencionado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), porém há hospitais que preconizam, quando a IH se relaciona a procedimentos invasivos, como padrão 48 horas após a admissão do paciente.

Existem vários fatores que podem contribuir ou facilitar a instalação da IH, tais como: a má higienização das mãos; uso indiscriminado de antibióticos; materiais hospitalares contaminados; má higiene da equipe de profissionais, pacientes ou visitantes; baixa resistência de alguns pacientes proveniente da idade avançada, obesos, diabéticos, pacientes com câncer, HIV e outras doenças graves; crianças prematuras ou com pouco peso; assim como um longo período de internação do paciente (SANTOS et al., 2010).

Vincent et al. (2009) citam que as IH nas UTIs da América Latina consideradas mais frequentes são as infecções do trato respiratório (63,5%), seguidas das infecções abdominais (19,6%), da corrente sanguínea (15,1%), trato urinário e rins (14,3%), pele (6,6%), as relacionadas ao uso de cateteres (4,7%) e outras infecções (7,6%). Quando se faz um comparativo com a média das infecções de um modo geral no Brasil temos as infecções urinárias ocupando o primeiro lugar como causa de infecções, seguida das pneumonias, infecções da corrente sanguínea e infecções dos sítios cirúrgicos. Mantovani (2009) discorre sobre o trabalho de Vincent et al. (2009), alertando sobre os elevados índices de infecção nas UTIs na América Latina (60,3%) quase dez pontos percentuais a mais do que a média mundial (51,4%). Comparativamente a taxa de mortalidade na América Latina chega a 33% em relação a 24% da média mundial.

Samuel et al. (2010), discorrem sobre as taxas das infecções do trato urinário em UTIs na África, as quais representam 34% das infecções nosocomiais e as infecções das feridas cirúrgicas que representam 17% destas infecções.

Os microrganismos responsáveis pelas IH geralmente são da microbiota normal do indivíduo, que fica vulnerável à infecção porque sua imunidade está baixa. Porém o método de transmissão destes microrganismos pode ser tanto endógena (do próprio paciente) como exógena (origem externa ao paciente). A microbiota humana apresenta uma diversidade de microrganismos causadores de infecções como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e

Escherichia coli, enquanto que a via exógena pode incluir estes e mais outros microrganismos (AZEVEDO, 2011).

Maciel e Cândido (2010) relatam que os principais microrganismos causadores da infecção hospitalar são as bactérias, alguns vírus e fungos. Dentre as bactérias tem destaque o *Staphylococcus aureus* como importante causador das infecções no sangue periférico, sendo que as sepses, isto é, a resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso, por esta bactéria é a responsável por elevada morbidade e mortalidade.

1.4 Métodos de controle da infecção hospitalar

O Controle das Infecções Hospitalares no Brasil iniciou-se de forma mais efetiva com a Portaria MS nº 196, de 24 de junho de 1993, a qual determinava que todos os hospitais deveriam constituir suas Comissões de Controle de Infecção Hospitalar independente da unidade mantenedora. Esta portaria foi revogada e substituída pela Portaria MS nº 930 de 27 de agosto de 1992 (BRASIL, 2011 c) a qual expedia, em forma de anexos, normas para o controle das infecções hospitalares. Atualmente está em vigor a Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 2011b), a qual revogou a Portaria MS nº 930/92 e que expede as diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares combinado com esta Portaria está a Lei 9.341/97 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011 d), que dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) e criação de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) para execução deste controle.

O PCIH é um conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente, com vistas à máxima redução possível da incidência e gravidade das infecções hospitalares. Este programa deve constituir a CCIH que está incumbida de instituir e executar as ações de controle de infecção hospitalar. Nestas ações a Biossegurança tem papel relevante para o controle de infecção hospitalar.

1.5 Qualidade do ar interno (QAI) do ambiente hospitalar

A Qualidade do Ar Interno (QAI) tornou-se um tema de pesquisa de grande importância, após a descoberta de que baixas trocas de ar nestes ambientes ocasionam um aumento considerável na concentração de poluentes químicos e biológicos no ar.

Segundo Stathopoulou et al. (2008) e Morais et al. (2010), passa-se em média 87% do dia em ambientes fechados (residências, escolas e trabalho), sendo apenas 7% passados ao ar livre. Assim, a maior parte do ar inalado pelas pessoas ocorre nesses ambientes, porém a presença de poluentes traz grande probabilidade de danos à saúde. O grau de contaminação de um ambiente interno depende de vários fatores, tais como, taxa de ventilação, alta umidade, número de pessoas que ocupam o ambiente, natureza e grau de atividade exercida pelos ocupantes, limpeza e desinfecção das áreas ocupadas.

Brickus e Aquino Neto (1998) relatam que a Síndrome do Edifício Doente (SED) é um termo utilizado para descrever os efeitos adversos a saúde e ao conforto experimentado pelos ocupantes de um edifício, estando diretamente relacionados ao tempo de permanência no edifício. Yu e Kim (2010) discorrem que as principais causas dos edifícios doentes são os microrganismos e emissão dos compostos orgânicos voláteis como formaldeídos dos materiais ou produtos do edifício. Para Stryjakowska-Sekulska et al (2007) as universidades possuem vários microrganismos sendo que os gêneros bacterianos mais abundantes são os *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Flavobacterium*, seguidos pelo *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*, após ter investigado o grau de contaminação de vários setores do ambiente universitário em diferentes turnos (manhã e tarde), sendo considerados os locais mais contaminados, os banheiros, bibliotecas e salas de leitura. As variações de contaminação estavam associadas à ventilação do local.

De acordo com a Resolução/RE nº. 9 de 23 de janeiro 2003 – (ANVISA, 2011c) a qualidade do ar ambiental interior é uma condição do ar nos interiores de ambientes, resultante do processo de ocupação de um ambiente fechado com ou sem climatização artificial. O ar destes locais possui uma variedade de contaminantes que podem ser de natureza química, física e biológica os quais devem ser conhecidos e controlados tendo suas características dependentes da

qualidade do ar externo, das atividades realizadas dentro das edificações e até os materiais da construção e mobília.

Os fatores físicos, do ar dos ambientes internos, têm grande relevância com relação aos contaminantes, considerando os parâmetros como temperatura, umidade, taxa de circulação e renovação do ar dado a influência destes sobre o desenvolvimento de microrganismos. Ambientes com elevada taxa de umidade do ar e temperatura propiciam o desenvolvimento de fungos, assim como ambientes com elevada taxa de ocupação e difícil circulação do ar dificulta a diluição dos contaminantes produzidos pelos próprios usuários. Quando se trata de ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo estes fatores são regidos em conformidade com a Resolução/RE nº. 9 de 23 de janeiro 2003 – (ANVISA, 2011c). Esta resolução complementa a Portaria GM/MS nº. 3523 de 28 de agosto de 1998 (BRASIL, 2011 e) que estabelece medidas e procedimentos de limpeza e manutenção dos sistemas de climatização e os padrões referenciais para qualidade do ar de ambientes internos.

A preocupação com a qualidade do ar interno de ambientes hospitalares, através da contaminação microbiana (bioaerossóis), tem sido valorizada há algum tempo, o que se faz notar pelas recomendações usuais de limpeza e higienização dos ambientes hospitalares. A dispersão de microrganismos patogênicos no ar tem sido demonstrada ao longo dos anos. Em 1971, Lowbury et al., sugeriram que *S. aureus* poderia ser transmitido pelo contato direto e pelo ar, ressaltando a relevância da transmissão por contato indireto, através de fômites, quando pacientes queimados foram tratados com diferentes tipos de proteção. Hambraeus, (1973) demonstrou a dispersão de *S. aureus* em pacientes queimados portadores de extensas lesões e contaminação dos uniformes de enfermeiras. Porém não demonstrou que o *S. aureus* encontrado no ar era oriundo das lesões dos pacientes.

Samuel et al. (2010) discorrem sobre as infecções nosocomiais da corrente sanguínea são causadas por bactérias Gram-positivas incluindo os *S. aureus* e enterococos. A *Escherichia coli* é a causa mais comum de infecções nosocomiais do trato urinário assim como outros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococci* e *Candida spp*.

No ar dos ambientes internos encontram-se dispersos materiais particulados em suspensão, assim como os microrganismos. Os microrganismos não estão

dispersos isoladamente geralmente estão agregados ao material particulado, portanto quando se realiza amostragens de microrganismos necessariamente envolve a captura de material particulado do ar.

Os métodos disponíveis para a monitoração ou amostragem microbiológica do ar ou bioaerossóis (suspensão de microrganismos dispersos no ar) incluem: monitoração passiva e monitoração ativa. Na monitoração passiva são utilizadas placas de Petri com meio de cultura apropriado, geralmente não seletivo, as quais são expostas, para sedimentação dos bioaerossóis, por um determinado tempo, depois são incubadas para o desenvolvimento e contagem das colônias formadas. Esta monitoração aplica-se somente para microrganismos viáveis. É uma análise considerada qualitativa porque o volume do ar não é quantificado ou mensurado. A monitoração ativa requer o uso de amostradores de microbiológicos de ar, neste caso o volume do ar é conhecido considerando um método quantitativo. Nesta metodologia são utilizados meios de cultura líquidos ou sólidos e corresponde a utilização de instrumentos ou dispositivos como: *impingers* os quais utilizam meio líquido para coleta dos microrganismos; amostradores por impactação utilizam meio sólido como ágar para coleta das partículas os quais podem ser compostos por placas perfuradas (amostradores de peneira) ou por fenda (amostradores de fenda). Nestes amostradores o ar é succionado por bomba ou ventilador para o aparelho e acelerado através das placas ou fenda para sedimentação das partículas, que depois são incubadas e feitas a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (VERREAULT, MOINEAU, DUCHAINE, 2008; SRIKANTH, SUDHARSANAM, STEINBERG, 2008).

1.6 *Staphylococcus aureus*

O gênero é composto de 35 espécies, dentre elas o *Staphylococcus* tem grande relevância por estar associado a doenças em humanos atuando como principal patógeno causador de infecções tanto na comunidade como nas infecções hospitalares. Os *Staphylococcus sp* são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e anaeróbios facultativos. Morfologicamente são células esféricas podem estar agrupadas irregularmente, aos pares ou isoladas, medem em torno de 0,5 a

1,0 μ m e se desenvolvem bem em condições de alta pressão osmótica e baixa umidade o que vem a justificar o seu desenvolvimento e sobrevivência nas membranas mucosas (nasofaringe) e pele humana (SIBBALD et al., 2006; MALACHOWA et al., 2011).

A patogenicidade dos *S. aureus* está associada à ação combinada de mais de quarenta diferentes toxinas, enzimas e proteínas de superfície, isto é, há o envolvimento de um verdadeiro arsenal de fatores de virulência. Estes fatores de virulência incluem: proteínas de superfície que promovem a adesão e colonização dos tecidos do hospedeiro; invasinas responsáveis pela propagação das bactérias nos tecidos (leucocidinas, quinases e hialuronidases); fatores de superfície que inibem a fagocitose (cápsula e proteína A); propriedades bioquímicas que aumentam sua sobrevivência nos fagócitos; toxinas que danificam as membranas das células; superantígenos que contribuem para os sintomas do choque séptico e determinantes para resistência aos antibióticos (SIBBALD et al, 2006).

Entre as estruturas de superfície dos *S. aureus* que tem relevância para este trabalho está a proteína A, responsável pela ligação aos anticorpos do tipo G (IgG), através da região Fc. Os anticorpos apresentam duas regiões distintas caracterizadas pelas porções denominadas F_{ab} e F_c. A porção F_{ab} apresenta dois sítios para ligação ao antígeno e dessa forma pode neutralizar o patógeno . A porção F_c é conhecida por se ligar a receptores celulares e participar da ativação de células e também promover de forma mais eficiente a fagocitose. É conhecida na literatura que a proteína A de *S. aureus* pode se ligar a porção F_c dos anticorpos promovendo assim o escape pela inibição da opsonização e conseqüentemente inibindo a fagocitose mais eficiente (FORSTER e HÖÖK, 1998).

1.7 Biossensores

Várias definições e terminologias têm sido utilizadas para descrever os biossensores, as quais se encontram pautadas no campo de aplicação dos mesmos. Podem-se considerar os biossensores como dispositivos de detecção capazes de converter uma resposta biológica em um sinal mensurável (GRIESHABER et al., 2008). Este dispositivo deverá ter incorporado um elemento de reconhecimento

biológico (ou derivados biológicos) integrado ou intimamente associado a um transdutor, possibilitando a conversão de uma resposta biológica em sinal elétrico.

No sentido estrito da palavra “biossensor” significa a combinação de dois componentes:

- “bio” referente ao elemento de reconhecimento biológico ou biorreceptor e,
- “sensor” referindo-se ao elemento sensor ou elemento de transdução.

O elemento de reconhecimento biológico deve interagir com o analito (elemento de interesse numa análise), ocasionando mudanças físicas ou bioquímicas a serem detectadas pelo elemento transdutor, ao qual está intimamente ligado, no intuito de gerar uma resposta ou sinal.

Em uma análise mais detalhada de um biossensor pode-se descrever seus componentes como apresentado esquematicamente na Figura 3. A amostra, contendo o analito de interesse, em contato com o elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) reconhece a presença, atividade ou concentração do analito, distinguindo-o dos interferentes de maneira mais seletiva e específica. A interação entre o analito e o biorreceptor ocasiona alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas tais como: modificação do pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons, que são detectadas pelo transdutor e o sinal monitorado. Para este monitoramento, no caso de um biossensor eletroquímico do tipo impedimétrico, as medidas podem ser realizadas de acordo com o arranjo experimental mostrado na Figura 3. O monitoramento do sinal envolve um potenciostato/galvanostato e um analisador de resposta de frequência (FRA) que encaminha os dados ao microcomputador para processamento.

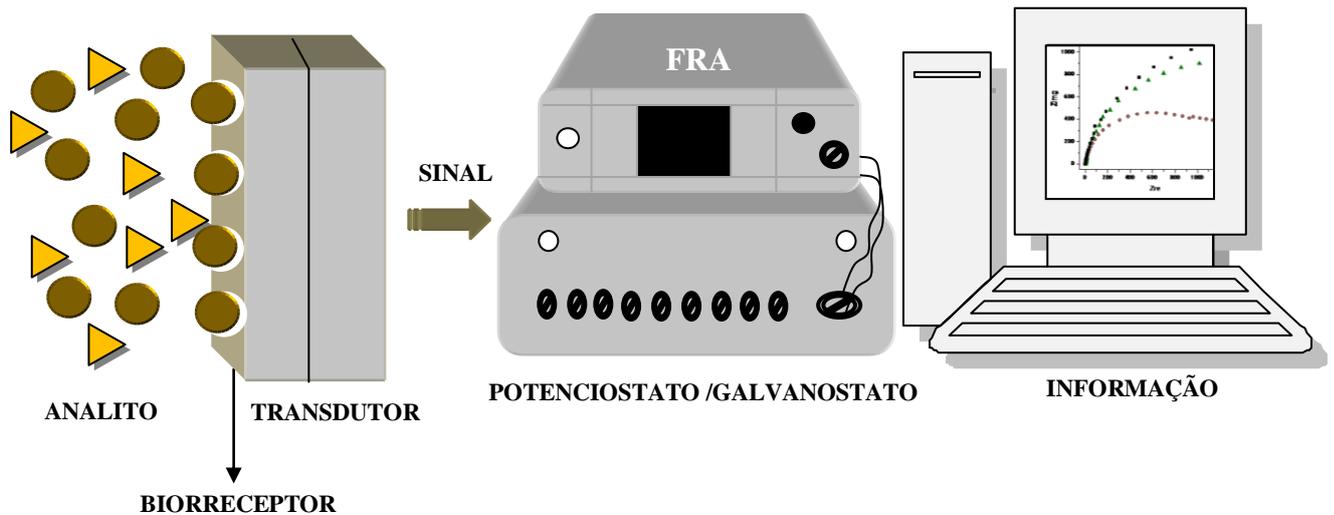


Figura 3. Representação dos componentes de um biossensor com interação do analito (●) ao elemento biorreceptor, distinguindo-os dos interferentes (▲).

O elemento de reconhecimento biológico é um componente fundamental na construção do biossensor. Constitui o elemento chave da especificidade e pode ser representado pelas seguintes biomoléculas: anticorpos ou antígenos, enzimas, ácidos nucleicos; ou pelos sistemas biológicos: receptores, células, organelas, microrganismos, tecido animal ou vegetal. A sua principal função é a sua seletividade de forma que o biossensor responda apenas a um analito em particular ou molécula de interesse, evitando interferências de outras substâncias (PARKINSON; PEJCIC, 2005; FERREIRA, 2002).

A escolha do tipo de biomolécula a ser utilizada influencia diretamente no tipo de biossensores. Por exemplo, aqueles que utilizam as enzimas imobilizadas podem ser denominados de biossensores enzimáticos onde reconhecem com bastante especificidade seu substrato havendo uma reação que vai convertê-lo em produto. Outras biomoléculas identificam seus alvos através da formação de um complexo de afinidade que pode ocorrer por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas e forças de van der Waals. Todas estas ligações são consideradas fracas, de natureza não-covalente, mas deve-se considerar que se houver a participação de várias destas ligações em um mesmo evento estas podem se tornar ligações fortes. Os biossensores cuja imobilização das biomoléculas ocorre por afinidade são conhecidos por biossensores de afinidade e, dentre estas biomoléculas as mais comumente utilizadas são os anticorpos e antígenos.

Biossensores que tiverem anticorpos ou antígenos imobilizados como biorreceptores são denominados de imunossensores.

O transdutor é a parte responsável pela transformação de uma forma de energia em outra. Deve ser sensível à presença, magnitude e variação de um dado a ser mensurado, assim como proporcionar a saída de um sinal elétrico que possa ser lido por um leitor.

A classificação dos biossensores está relacionada tanto ao tipo de transdutor que será utilizado na construção do dispositivo, como na biocamada do elemento de reconhecimento biológico, como será descrito posteriormente.

1.7.1 Desenvolvimento dos biossensores: histórico

Considera-se que os biossensores tenham surgido por volta de 1962, quando o cientista Leland C. Clark Jr., tido como o pai do conceito de biossensores, descreveu em um simpósio da *New York Academy of Sciences* “como desenvolver um sensor eletroquímico”. Estes sensores eram construídos utilizando transdutores enzimáticos, onde a glicose oxidase (GOx) era imobilizada entre duas membranas dispostas sobre o eletrodo de Clark (CLARK, 1962). Os princípios básicos destes sensores estavam pautados no eletrodo de oxigênio desenvolvido por Clark no ano de 1956, o qual é constituído de uma membrana gás-permeável através da qual o oxigênio se difunde, sendo reduzido num cátodo de platina (eletrodo de platina). Assim, Clark realizou a apreensão da enzima glicose oxidase, por meio de membranas de diálise, sendo que a diminuição da medida de concentração de oxigênio era proporcional à concentração de glicose. Na divulgação deste trabalho Clark e Lyons nominaram este dispositivo como eletrodo enzimático. Muitos escritores atribuíram, porém, à Updike e Hicks o pioneirismo desta denominação pelo fato dos mesmos, em 1967, terem expandido os experimentos de Clark e Lyons para construírem um eletrodo enzimático para glicose. Este trabalho marcou o início de grandes pesquisas na área de biossensores com aplicação em biotecnologia e meio ambiente (JOSHI, 2006; PALCHETTI; MASCINI, 2010).

Desde então se deu início ao desenvolvimento dos mais variados tipos de sensores; dezenas deles foram projetados e empregados nas mais diversas áreas, como descritos a seguir.

Em 1969, Guilbault e Montalvo desenvolveram o primeiro sensor potenciométrico enzimático pela imobilização da urease em gel de poli(acrilamida) sobre a superfície de um eletrodo de vidro seletiva a íons amônio (GUILBAULT; MONTALVO; 1969).

A utilização de transdutores térmicos em biossensores foi proposta em 1974, e os novos dispositivos foram nomeados como: sonda térmica enzimática e termistores enzimáticos. No ano seguinte, Lubbers desenvolveu um sensor óptico fluorimétrico para determinação de oxigênio e dióxido de carbono, empregando pela primeira vez feixes de fibras ópticas; este dispositivo foi denominado optodo ou optrodo (eletrodo óptico). Eles estenderam o conceito ao fazer um biossensor óptico sensível ao etanol utilizando a oxidase imobilizada na ponta da fibra óptica do sensor (PATACAS, 2007).

No avanço da evolução dos biossensores registra-se, no ano de 1975, em que Divie sugeriu a imobilização de bactérias usando-as depois como elemento biológico criando um eletrodo microbiano para a medição de álcool. Em 1976, Clemens et al. incorporaram um biossensor de glicose em um pâncreas artificial.

A idéia da construção de um imunossensor através da fixação de anticorpos em transdutores piezoelétricos ou potenciométricos surgiu nos anos 70. Porém, Liedberg et al. publicaram um artigo com uma idéia inovadora de implementação do uso da ressonância de plasma de superfície para monitorar reações de afinidade em tempo real (LIEDBERG, et al., 1983).

Os grandes avanços na área dos biossensores continuam acontecendo, porém a comercialização está diretamente atrelada à justificativa do mercado ao investimento, apesar dos mesmos resultarem de muitas pesquisas. No campo das pesquisas os biossensores tiveram um crescimento explosivo nas últimas duas décadas.

1.7.2 Aplicações dos biossensores

As áreas de aplicações dos biossensores são variadas com campos de investigações multidisciplinares e não delineados conforme mostra a Tabela 1 (CASTRO-ORTIZ et al., 2007; NAYAK et al., 2009; GASPAR, 2010). Isto se deve a sua praticidade de utilização, precisão e eficiência, tornando-os mais atrativos por serem sistemas simples, de detecção rápida, seletivo, de baixo custo e com rapidez de informação.

Tabela 1. Diferentes áreas de aplicações dos biossensores.

ÁREAS E APLICAÇÕES DOS BIOSSENSORES	
ÁREAS	APLICAÇÕES
Saúde Humana	Os biossensores têm ampla utilização em: diagnósticos, análises clínicas, terapêutica, monitoração de células cancerígenas, dentre outros. Nos diagnósticos, os resultados são fornecidos em tempo real. A mensuração dos níveis de glicose do paciente, mesmo a nível domiciliar, é um dos mais utilizados, seguidos daqueles para mensurar lactose, uréia, creatinina e colesterol
Veterinária	Para animais destinados ao abate recomenda-se o controle dos níveis de hormônios e antibióticos, o que pode ser realizado com a utilização de biossensores, assim como o controle da fertilidade e doenças infecciosas
Agricultura	Aplicação na análise <i>in situ</i> de poluentes (herbicidas, pesticidas e metais pesados) em culturas e solos; detecção, identificação e quantificação de patógenos bacterianos ou virais na lavoura e, definição de posições com o auxílio de sistema de posicionamento global (GPS) são feitas com o uso dos biossensores
Indústria Alimentícia	O controle de qualidade nas indústrias alimentícias tem ocupado papel de grande relevância no mercado. Os biossensores tem tido sua aplicação na análise da qualidade dos alimentos, para detectar contaminantes químicos, biológicos ou toxicológicos
Indústria Farmacêutica	Utilizados nos <i>screening</i> de fármacos, análise dos insumos farmacêuticos e produtos acabados e na monitoração <i>in vivo</i> da ação de fármacos e toxinas

Meio Ambiente	Monitoração e controle de contaminação ambiental como detecção de metais pesados em amostras de solo e herbicidas e pesticidas em amostras de águas dos rios e lagoas. Emissão de gases poluentes e resíduos industriais
Defesa da População Civil	Na detecção de toxinas e patógenos devido às ameaças de armas biológicas e químicas do terrorismo internacional, como o antraz, brucelose, Q fever, enterotoxina e toxinas botulínicas
Controle de Infecção Hospitalar	Os biossensores podem desempenhar importante papel no controle de partículas e principalmente agentes de infecção, sendo um campo promissor e que requer mais pesquisas

1.7.3 Características ideais para os biossensores

Os biossensores apresentam grande versatilidade e variadas características que podem torná-los cada vez mais uma ferramenta atrativa em vários campos de aplicação.

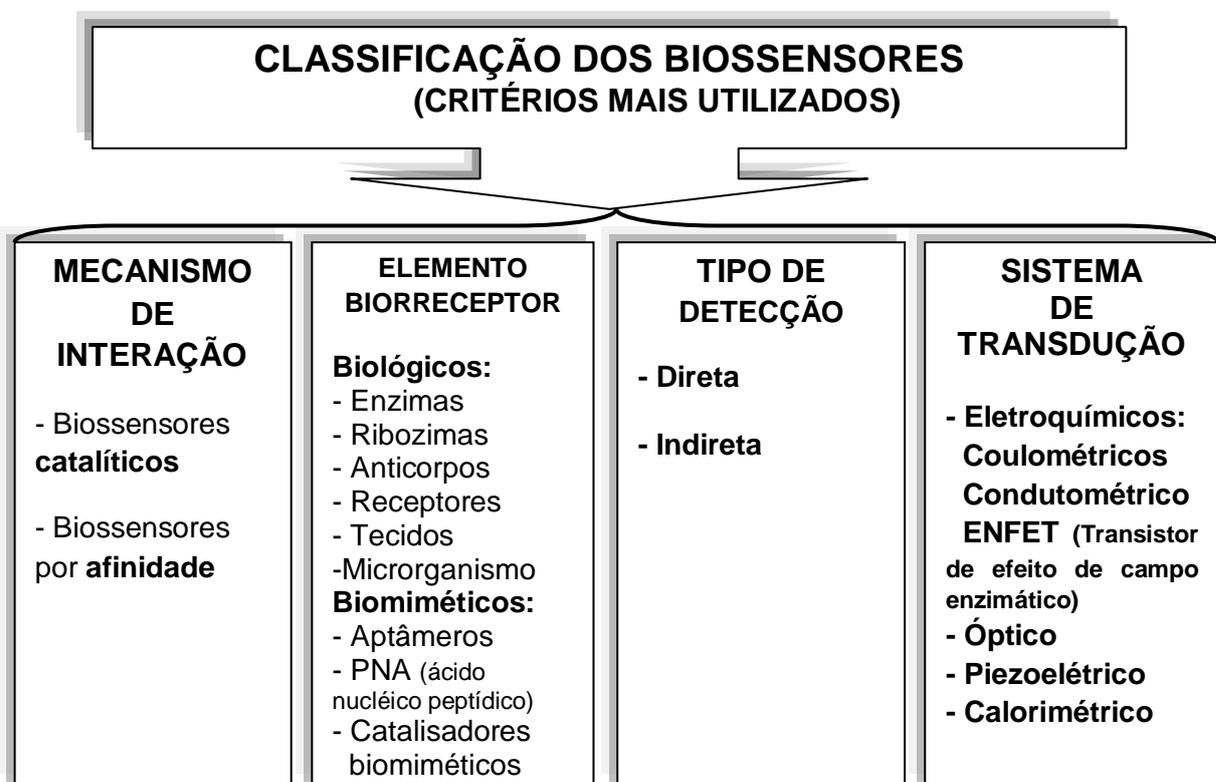
Dentre as características desejáveis ou ideais em relação a um biossensor podemos considerar (KRAMER, 2008; GALLI, 2009):

- Seletividade - o biossensor deverá ter a capacidade de distinguir a molécula de interesse dentre as demais presentes na amostra, mesmo que existam outras com propriedades similares. Não deve haver interferências com substâncias da mesma família.
- Sensibilidade – capacidade de um transdutor converter um sinal biológico em um sinal elétrico proporcional ao nível de concentração do analito na amostra. A sensibilidade de um biossensor depende do tipo de transdutor escolhido e das condições operacionais adequadas.
- Estabilidade - propriedade que analisa a maior quantidade de tempo possível que uma biomolécula permanece com suas características básicas de biorreconhecimento, ou seja, seu tempo de vida.
- Reprodutibilidade - capacidade de repetir o experimento mesmo que em laboratórios diferentes ou em condições operativas diferentes, por aplicação do mesmo protocolo, obtendo resultados similares ao original.

- Repetibilidade – propriedade de repetição do ensaio quando efetuado mais de uma vez pelo mesmo operador. Entende-se ainda, como expressão quantitativa do erro associado ao operador, a partir da medição com materiais idênticos, mesmo equipamento e mesmas condições operativas.
- Baixo custo – o custo deve ser preferencialmente baixo, mesmo para aqueles que forem fabricados em grande escala.
- Simplicidade de operacionalização – não necessita de equipe especializada para seu manejo e operação. Quando portáteis devem ser capaz de fazerem as análises em tempo real.

1.7.4 Classificação dos biossensores

Na classificação dos biossensores podem ser considerados diferentes critérios como: elemento de biorreconhecimento (biorreceptores), o tipo de transdutor utilizado, sendo que se deve ponderar a interação ou combinação entre os dois (Esquema 1). É de grande relevância também a classificação pautada no mecanismo de interação analito-biorreceptor e a metodologia utilizada na detecção (MALANDAIN; FAYOLLE; BEDOUELLE, 2005; APODACA, 2006).



Esquema 1. Representativo da classificação dos biossensores.

1.7.5 Classificação dos biossensores de acordo com o mecanismo de interação

Nesta classificação têm-se parâmetros como a natureza (moléculas, células, microrganismo, dentre outros) e função (catálise ou afinidade) do elemento de biorreconhecimento para que ocorra a formação do complexo analito-biorreceptor. O biorreceptor deve obedecer a alguns requisitos essenciais para formação deste complexo dentre eles, tem que possuir uma afinidade suficientemente forte pelo analito, o suficiente para distingui-lo dentre tantos outros elementos e manter a estabilidade por certo tempo. Para que ocorra esta interação deve haver uma simples aproximação ou contato do receptor com o analito, como no caso de antígenos e anticorpos, ou uma interação de reação catalítica com a formação enzima-substrato-produto (CHOU, 2011; GIFFORD, 2008).

1.7.5.1 Biossensores catalíticos ou enzimáticos

Os biossensores enzimáticos utilizam as enzimas como elementos de reconhecimento biológico, a qual deve detectar seletivamente o analito de interesse produzindo uma resposta bioquímica que deve ser convertida em um sinal elétrico mensurável. Segundo Paliwal (2008), o método de reação catalítica da enzima pode ocorrer através de dois eventos: conversão catalítica do analito pela enzima ou pela inibição da atividade enzimática pelo analito de interesse.

A especificidade da enzima para determinado composto (substrato) ou classe de compostos é que determina os vários tipos de biossensores enzimáticos citados na literatura. A alta seletividade e a rápida reação enzimática na detecção do analito proporcionam a estes biossensores excelente seletividade e sensibilidade, sendo comumente usados com transdutores amperométricos (CHOU, 2011).

1.7.5.2 Biossensores de afinidade

A caracterização deste biossensor se faz pela habilidade de ligação do biorreceptor ao analito na detecção de substâncias, isto é, a relação entre ambos

ocorre por uma interação, sem nenhuma reação catalítica ou consumo de substrato com geração de produto. Quando ocorre a formação do complexo analito-biorreceptor pode haver uma alteração conformacional da biomolécula ou alteração física do meio de imobilização, o qual indica este evento (PATACAS, 2007).

Uma das grandes vantagens deste sistema é a possibilidade de utilização em configurações integradas tipo arranjos o que permite uma multianálise e/ou informação biológica ampla, em tempo mínimo. Porém, algumas desvantagens podem ser citadas tais como: alguns passos que devem ser acrescentados ao processo, como lavagem e separação de moléculas que possam permanecer em excesso no sistema, além da adição de substratos específicos para promoção da relação de afinidade do complexo. Os elementos de biorreconhecimento mais utilizados são os anticorpos, células, oligonucleotídeos, lectinas, aptâmeros, polímeros de impressão molecular (PIMs), entre outros. O PNA (ácido nucléico peptídico) é utilizado em biossensores baseados na sinalização por transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET) onde o PNA é marcado com fluoresceína e usado como sonda para análise de DNA associado a um polímero conjugado de natureza catiônica (PF). Possui grande indicação para detecção de microrganismos (APODACA, 2006).

A classificação dos biossensores quanto ao tipo de interação com o analito tem caráter bastante abrangente, podendo englobar tanto os classificados de acordo com o elemento biorreceptor quanto àqueles que são classificados de acordo com o tipo de detecção. Na classificação por detecção direta considera-se que a interação analito-receptor ocorra em tempo real, característica das que ocorrem entre células receptoras e anticorpos. A detecção indireta encontra-se pautada na participação de elementos secundários que geralmente são catalíticos, tais como as enzimas ou entre antígeno anticorpo com transdução amperométrica.

Entre os biossensores por afinidade temos os imunossensores que serão descritos em detalhes posteriormente.

1.7.6 Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores

Em uma análise mais concisa da classificação dos biossensores pode-se afirmar que na construção de um biossensor, definido o campo de atuação, o analito de interesse e transdução, que a sua classificação vai se enquadrar cada uma

referente ao mecanismo de interação, elemento biorreceptor, tipo de detecção e sistema de transdução.

A escolha do sistema de transdução está intimamente relacionada com o tipo de elemento de biorreceptor para que haja uma funcionalidade precisa do sistema e conseqüentemente do dispositivo.

Segundo Chou (2011) o sistema de transdução pode ser classificado de acordo com a Figura 4:

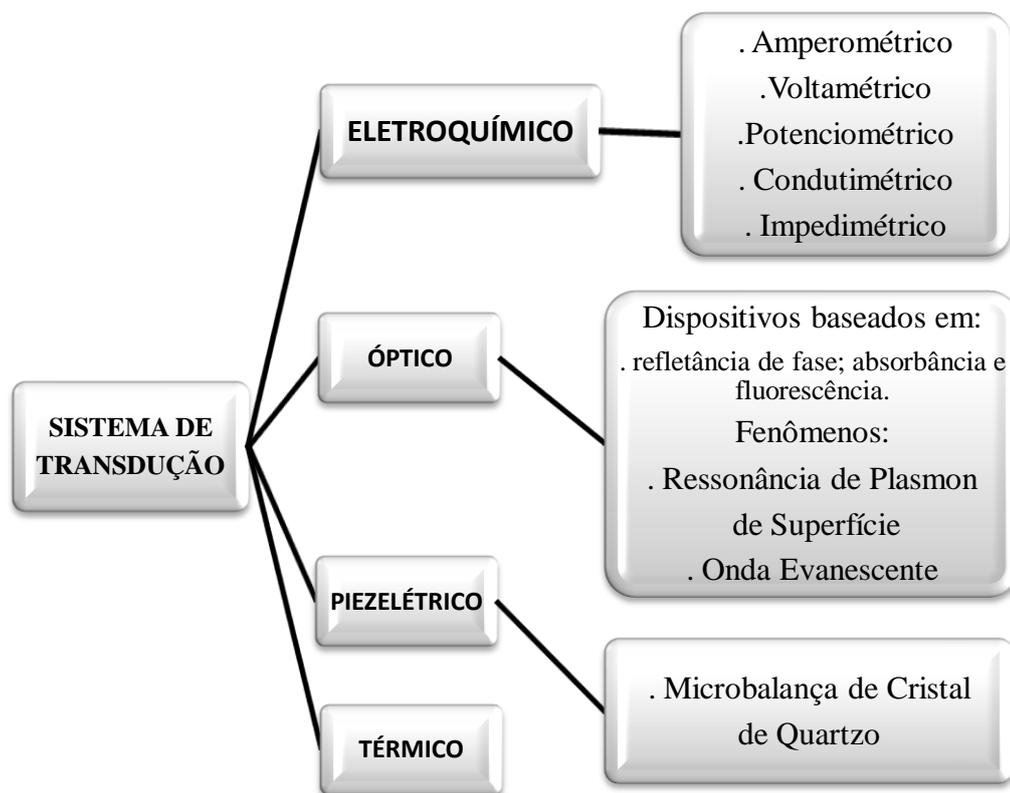


Figura 4. Representação esquemática da classificação dos biossensores baseada no sistema de transdução utilizado. Adaptado de Chou (2011).

O princípio de funcionamento dos biossensores com transdutores **eletroquímicos** se baseia nas modificações das propriedades elétricas, de natureza interfacial da medida eletroquímica, ocasionadas durante uma reação química, pela produção e consumo de íons ou elétrons (PATEL; MISHRA; MANDLOI, 2010). As vantagens destes biossensores estão na possibilidade de miniaturização relativamente fácil, além da pequena quantidade de amostra a ser utilizada para detecção, baixo custo o que possibilita uma produção em série e comercialização.

Os transdutores eletroquímicos transformam o sinal de interação entre o analito e o biorreceptor em sinal elétrico (YAMANAKA et al., 2009).

Os biossensores **amperométricos** se fundamentam na medida de corrente proveniente de uma reação de oxidação ou de redução da espécie eletroativa, no eletrodo de trabalho, que é mantido em um potencial fixo com relação ao eletrodo de referência. A corrente produzida é linearmente proporcional à concentração do analito. (PALIWAL, 2008; HERNÁNDEZ, 2008). Estes biossensores geralmente utilizam três tipos de eletrodos: o eletrodo de trabalho no qual ocorrem as reações de interesse na interface eletrodo/solução; o eletrodo de referência em função do qual ocorre as variações de potencial e referência constante e o eletrodo auxiliar onde há o fechamento do circuito elétrico em associação com o eletrodo de trabalho por onde passa a corrente gerada. Acoplado ao sistema, o potenciostato desempenha a importante função de ajustar o potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, mantendo a voltagem entre eles em nível constante e monitorando a corrente gerada. O eletrodo de trabalho é fabricado, geralmente, utilizando um metal nobre e outros materiais compatíveis com uma camada formada pelo elemento de biorreconhecimento. As vantagens destes biossensores são o baixo custo, praticidade, simplicidade, confiabilidade e não há necessidade de submeter a amostra a um pré-tratamento (MELO, 2008).

Ao contrário dos amperométricos, os biossensores **voltamétricos** funcionam com uma variação de potencial (aumento ou diminuição) para o sistema de detecção até ocorrer a oxidação ou redução do analito com variação da corrente de pico para mais ou para menos (CHOU, 2011). Segundo Brett & Brett (1996) um sensor voltamétrico registra vários pontos no perfil corrente-potencial ou em uma região eleita deste perfil. O parâmetro mais importante para seletividade destes sensores e dos amperométricos é o potencial que será aplicado no sistema.

No que se refere aos biossensores **potenciométricos**, medem o potencial da célula eletroquímica em correntes quase nulas. O funcionamento dos mesmos está diretamente relacionado com o tipo de eletrodo a ser utilizado, pois variando o tipo de material do eletrodo (vidro, sal iônico, metal, semicondutores, etc) há um funcionamento diferente deve-se, porém considerar que em princípio qualquer eletrodo pode ser utilizado para medidas potenciométricas, porém ressalta-se a importância dos eletrodos seletivos. Pohanka e Skládal (2008) discutiram que os biossensores potenciométricos são baseados nos eletrodos íons seletivos (ISE) e

nos transistores de efeito de campo seletivos a íons (ISFET). A saída do sinal é feita diretamente dos íons que se encontram acumulados na membrana em contato com a solução.

A condutância é medida pelos biossensores **condutimétricos**, entre um par de eletrodos metálicos tendo como consequência a produção de espécies iônicas, resultantes da interação de uma enzima com o analito. Quando uma reação enzimocatalítica gera um produto ocorre uma mudança de condutância que é utilizada pelo biossensor. Utilizam-se eletrodos de metais nobres (ouro, prata, platina, cobre, níquel ou cromo) na superfície dos quais são imobilizadas as enzimas que interage com o analito específico levando a produção de produtos, ao ser aplicado um campo elétrico alternado, o que vai modificar a condutância na camada enzimática (QIAN, 2009; SILVA, 2004).

Os biossensores **impedimétricos** são aqueles que utilizam medidas de impedância eletroquímica para a detecção da interação antígeno-anticorpo na superfície modificada do eletrodo. Quando ocorre a interação há um aumento no valor da resistência de transferência de carga sendo que a reação farádica fica cada vez mais dificultada (PRODRONIDIS, 2009). Escamilla - Gómez et al. (2009) discorrem sobre o desenvolvimento de imunobiossensores impedimétricos para a detecção e a quantificação de *Escherichia coli* em amostras de água de rio e de torneira utilizando eletrodos impressos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas.

O princípio de funcionamento dos biossensores **ópticos** se baseia na medição das variações que são produzidas nas propriedades da luz, em consequência da interação que ocorre entre o analito e o elemento de biorreconhecimento. Estas propriedades podem ser a absorção, reflexão, bio ou quimiluminescência, emissão, dispersão, polarização, dentre outras (APODACA, 2006; YAMANAKA et al., 2009). Dentre os biossensores ópticos encontram-se os biotodros, de ressonância de plasmon de superfície e os de ondas evanescentes. Os **optodros** (sensor de fibra óptica) são dispositivos sensores que utilizam a fibra óptica em uma extremidade onde é imobilizado o elemento de reconhecimento e na outra extremidade há o sistema de detecção. Neste tipo de biossensor é necessária a utilização de marcadores que funcionam como sistema de sinalização, tais como os corantes, moléculas fluorescentes ou bio e quimifluorescentes. Quando houver a interação entre o analito e o elemento de reconhecimento causando uma variação detectável

pelo marcador esta se propaga pela fibra até o sistema de detecção (APODACA, 2006; RUMAYOR, 2005). As ondas plasmons de superfície podem ser consideradas como ondas eletromagnéticas que se propagam na interface de uma superfície metálica e um dielétrico. Nos biossensores baseados em **ressonância de plasmon de superfície** quando ocorre a ligação de moléculas-alvo com ligantes imobilizados em superfícies há uma mudança do índice de refração do meio nas proximidades da superfície. Para ocorrência deste evento, deve haver a incidência de uma luz polarizada, proveniente de um meio de maior índice de refração, sobre uma superfície metálica fina (ouro ou prata) onde deve estar depositada a amostra de interesse. A monitoração desta mudança fornece informações, em tempo real e com exatidão, sobre a interação do analito com o receptor, afinidade para o tipo de receptor, associação e dissociação da cinética de interação (APODACA, 2006; PALIWAL, 2008; HERNÁNDEZ, 2008). Os biossensores ópticos baseados na tecnologia de **onda evanescente** têm como princípio de funcionamento a reflexão interna total, onde um feixe de luz se propaga pelo interior da fibra, penetra no meio circundante tendo a intensidade do campo eletromagnético evanescente um decaimento exponencial a partir do núcleo da fibra e distância da superfície (POPA, 2009; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Assim, quando há ligação do analito com o receptor ocorrem mudanças que são registradas no índice de refração causadas pela interação das moléculas próximas a superfície do sensor dentro do campo evanescente (LIN, 2003). A reflexão interna depende das características de reflexão dos meios, opticamente transparentes, com índice de refração no limite de dois meios dielétricos, se o ângulo de incidência for maior que o ângulo crítico há uma reflexão interna total. Considera-se a onda evanescente como um componente do sensor que interage com os componentes que estejam na superfície ou próximo desta havendo penetração no meio de menor índice de refração (LIU; TANG, 1999). Os biossensores baseados em ondas evanescentes tem tido grande aplicações nas ciências principalmente quando são utilizados anticorpos e outros pares receptores-ligantes, como proteína-DNA, interações DNA-DNA, bibliotecas de fagos, vírus-proteínas, dentre outros.

Os biossensores **piezelétricos** operam baseados no princípio de geração de dipolos elétricos quando um cristal anisotrópico é submetido a um estresse mecânico. Há o revestimento do cristal piezelétrico com materiais biológicos que pode ser anticorpos, enzimas, dentre outros, com alta seletividade para um

determinado analito. Quando o analito é adsorvido há um aumento da massa do cristal e alteração da frequência de oscilação, podendo ser determinada a quantidade de material recolhido. Assim, a sensibilidade de detecção de massa em um cristal de quartzo piezelétrico que ressoa em uma frequência é a característica mais preponderante dos mesmos (BABACAN et al. 2000; RAHAIE; KAZEMI, 2010).

O princípio de detecção piezelétrica foi preconizado por Sauerbrey, por volta de 1959, quando o autor propôs a utilização da microbalança de cristal de quartzo (QCM), mostrando que, quando havia variação na frequência ressonante, esta ocorria em $\pm 2\%$ e era diretamente proporcional a adição de massa depositada sobre a superfície do cristal, sendo posteriormente comprovado por outros autores. Ele estabeleceu uma equação que permitia inferir a massa depositada (MANDELIS; CHRISTOFIDES, 1993). Entre os materiais mais utilizados nos biossensores piezelétricos tem-se a **microbalança de cristal de quartzo**, a qual é formada por uma lâmina fina de cristal de quartzo fixada por dois eletrodos metálicos para contato elétrico, esta é revestida por filmes finos de vários tipos onde será caracterizada a seletividade por meio de adsorção. Todo processo de coleta de dados é feita pela leitura da diferença da frequência entre a microbalança de quartzo e o cristal de referência. É importante que ambos, a microbalança e o cristal de referência estejam sob as mesmas condições de temperatura, porque em temperaturas diferentes os cristais de quartzo têm frequência diferente (FELIZARDO, 2006).

Os biossensores **térmicos** utilizam o calor gerado quando ocorre a interação entre o analito e o receptor para transformar em energia elétrica. Eles geralmente são construídos através da imobilização de moléculas de enzimas sobre sensores de temperatura, quando o analito entra em contato com a enzima, a reação de calor da enzima é mensurada e calibrada com relação à concentração do analito. Isto se deve ao fato de que todos os processos bioquímicos envolvem mudanças de entalpia, como acontece nas reações enzimáticas onde mudanças de entalpia molar são significativas. A entalpia é caracterizada pela variação na medida da quantidade de energia que pode ser absorvida/cedida em um sistema termodinâmico ou que este pode trocar com o meio. Considerando-se a entalpia molar estas variações são representadas por um mol de substância que constitui o sistema. A medição da temperatura geralmente é feita através de um termistor, considerando que o calor

total ou o calor absorvido é proporcional a entalpia molar e o número de moléculas na reação (SILVA, 2004; APODACA, 2006, MOHANTY; KOUGIANOS, 2006).

1.7.7 Imunossensores

São dispositivos baseados na interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) que leva à formação de um imunocomplexo entre estes dois componentes como resultado da sensibilidade e alta especificidade entre os mesmos. Esta interação acarreta mudanças ou variações nas propriedades ópticas, de massa, cargas elétricas, calor, dentre outros, que podem ser detectados até uma ordem de 10^{-9} mol L⁻¹, estes dispositivos se baseiam nos princípios de imunoensaios. Os imunossensores podem ser distinguidos dos imunoensaios por estes não possuírem transdutores integrados ao sistema analítico. Imunoensaio é um processo analítico baseado na ligação entre o anticorpo e antígeno podendo ser utilizado para detecção dos mesmos. É considerada uma técnica analítica para medidas quantitativas, aplicada para uma variedade de concentrações e matrizes biológicas e em diferentes formatos. A característica mais marcante dos imunoensaios está relacionada com sua especificidade que é produto da reação de complementaridade (HOCK,1997; YAMANAKA et al.,2009; MEIRELLES et al.,2006).

O elemento receptor dos imunossensores tanto pode ser anticorpos como antígenos, estes vão desencadear interação entre o antígeno e anticorpo, o que origina o nome de imunossensor. Estes dispositivos podem ser de diversos tipos tendo a sua nomeação baseada no transdutor utilizado, como discorrido na classificação dos biossensores (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; MALANDAIN; FAYOLLE; BEDOUELLE; 2005).

Os imunossensores, por não possuírem atividade catalítica, não geram produtos e nem consomem substratos, devem ter como medidas para sua atividade de interação antígeno anticorpo a utilização de algum elemento de biorreconhecimento marcado ou substâncias que venham a competir com o analito pela ligação ao elemento de reconhecimento sendo denominada detecção indireta. Outro método utiliza a detecção direta através da interação do elemento de biorreconhecimento e o analito, monitorados pelas alterações que ocorrem, tais

como: transferência de cargas, alteração de massa, variações nas propriedades de luz, calor, dentre outras (SOUZA, 2010; JIANG et al., 2008).

1.7.7.1 Componentes dos imunossensores

Os imunossensores pertencem à classe dos biossensores por afinidade, da mesma forma que estes, têm como componentes básicos: **elemento de biorreconhecimento** que pode ser o anticorpo ou antígeno que deverá ser imobilizado na superfície de um **transdutor** o qual vai converter os eventos biofísicos ou bioquímicos em sinal elétrico, cujo processamento de dados deverá ser efetuado pela **parte eletrônica** do sistema.

Neste trabalho, anticorpos foram utilizados como elementos de biorreconhecimento, dada a sua grande especificidade e seletividade ao analito de interesse e sobre os quais será feita uma abordagem específica.

1.8 Elemento de biorreconhecimento - anticorpo

Os anticorpos têm tido ampla aplicação na construção de biossensores por afinidade (imunossensores), devido à sua alta especificidade mesmo em matrizes complexas, amostras em pequenas quantidades ou em baixas concentrações, pouca quantidade de reagentes, além da facilidade de miniaturização e automatização dos dispositivos, tendo ampla aplicação em diagnósticos, terapêuticas, pesquisas, dentre outros.

O elemento de biorreconhecimento é um dos requisitos fundamentais para a construção dos imunossensores, sendo necessário conhecimento sobre o tipo de elemento que se irá trabalhar para que se possam obter resultados esperados.

1.9 Imunologia - conceitos básicos

Abbas; Janeway Jr. (2008) conceituaram a imunologia como ciência que trata dos mecanismos de defesa do organismo contra infecções. A imunologia está relacionada ao estudo do sistema imune ou da imunidade; eventos que são ativados

quando o organismo entra em contato com microrganismos ou outras estruturas moleculares estranhas. Assim, a imunidade é a proteção do organismo contra doenças, tendo como responsáveis barreiras físicas, células e moléculas que compõem o sistema imunitário produzindo a resposta imunitária.

Melvold e Sticca (2007) discorrem que o sistema imune é um dos mais importantes quando se trata da proteção dos organismos contra a invasão, ou mesmo ingestão, de micróbios e parasitas, o mesmo objetiva detectar, isolar e eliminar substâncias estranhas. Moser e Leo (2010) definiram o sistema imunológico como composto por um conjunto de mecanismos de defesa como: barreiras externas incluindo as físicas, tais como a pele, epitélios ciliados e membranas mucosas; e químicas, como as enzimas destrutivas presentes em secreções e os ácidos do estômago; e pela resposta imune inata e adaptativa.

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra substâncias estranhas e se limita a capacidade de distinguir um microrganismo de outro, por possuir um comportamento estereotípico funcionam similarmente frente a maioria dos invasores. As células que compõem a imunidade inata se originam do sistema hematopoético as quais compreendem células residentes em tecidos, como os macrófagos e células dendríticas; além das células móveis, como os neutrófilos, eosinófilos e monócitos (MOSER e LEO, 2010).

O sistema imune adaptativo possui mecanismos de defesa que são mais evoluídos depois de estimulados pela primeira exposição ao agente invasor, quando há uma segunda exposição com o mesmo agente invasor a resposta de defesa será mais efetiva e intensa. Os eventos que mais caracterizam a imunidade adaptativa são a especificidade e capacidade de resposta para diferentes moléculas, além de seu potencial de “memória” com respostas mais intensas depois de repetidas exposições a um mesmo microrganismo. Compõe o sistema imune adaptativo os linfócitos T e B e as demais células provenientes do mesmo, assim como moléculas de anticorpos. (ABBAS; JANEWAY Jr., 2008; MOSER e LEO; 2010).

1.9.1 Antígenos

Van Regenmortel e Altschuh (2002) conceituaram antígeno como qualquer elemento (célula, molécula ou macromoléculas) capaz de provocar uma resposta

imune e ser reconhecido especificamente pelos produtos da resposta imune – anticorpos. A maioria dos antígenos são proteínas considerados grandes, geralmente os compostos antigênicos são componentes de microrganismos invasores como paredes celulares, toxinas de bactérias, cápsulas, fímbrias; componentes de vírus, dentre outros. Porém devem ser considerados os antígenos não microbianos nos quais estão inclusos células provenientes de outros organismos como tecidos, órgãos transplantados, proteína do soro ou pólen ou *self*. Os antígenos possuem um tamanho de 10.000 ou mais daltons, qualquer substância estranha que possuir uma massa molecular baixa, em torno de 2.000, não é considerada antigênica sendo denominadas **haptenos**, pequena molécula que se liga ao anticorpo mais não induz a imunidade.

1.9.2 Anticorpos

No sangue e linfa circulam unidades denominadas células B, as quais produzem moléculas glicoprotéicas denominadas **anticorpos**. Os anticorpos foram os primeiros elementos do sistema imune a serem identificados. Eles são proteínas reativas a antígenos que estão presentes no soro imune chamado antissoro.

Os anticorpos possuem a notável capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se, inativar ou dar início ao processo de eliminação dos antígenos. Os anticorpos pertencem à família das proteínas globulares chamadas **imunoglobulinas (Ig)** (ZOLA, 2010).

1.9.2.1 Classificação dos anticorpos

Existem cinco classes de imunoglobulinas IgA, IgD, IgE, IgG, IgM as quais diferem uma das outras pelo tamanho, carga elétrica, composição de aminoácidos e disposição das ligações dissulfeto. A IgG é considerada um tipo de anticorpo mais abundante no soro e mais importante, respondendo por cerca de 80% de todos os anticorpos do soro e formam ligações mais estáveis do que outras Ig (ALBERTS et al., 2008).

As IgGs promovem a proteção do organismo contra ataque de bactérias e vírus, as toxinas bacterianas, podendo também ativar o sistema de complemento. Elas se fazem presentes no organismo através dos líquidos teciduais, provindo dos vasos sanguíneos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

1.9.2.2 Estrutura dos anticorpos

Os anticorpos são imunoglobulinas que reconhecem o antígeno que estimulou sua formação, são considerados bivalentes por possuírem dois sítios de ligação aos antígenos.

A estrutura básica do anticorpo consiste de uma forma de “Y” (ver figura 5) com quatro cadeias de polipeptídicas:

- Duas leves (*light*, L) – C_L
- Duas pesadas (*heavy*, H) - C_H

Os termos “leve” e “pesada” referem-se às massas moleculares relativas. Estas cadeias são idênticas, as leves entre si e as pesadas também entre si, e ligadas por ligações dissulfeto intercadeia e intracadeia (VAN REGENMORTEL e ALTSCHUH, 2002).

A Figura 5 representa esquematicamente a estrutura do anticorpo. As duas extremidades dos braços do anticorpo são denominadas de **regiões variáveis** (V) leves (*light*) ou pesadas (*heavy*), que tem início na porção amino terminal, nesta porção a sequência de aminoácidos diferem de uma molécula para outra, o que caracteriza o sítio de ligação ao antígeno denominado **paratopo**, sendo que estes aminoácidos são complementares aos que formam o **epítipo** do antígeno. No epítipo se localiza a proteína de reatividade antigênica (VAN REGENMORTEL e ALTSCHUH, 2002; MARQUES, 2005). Esta região corresponde a **porção F_{ab}** do anticorpo. A produção de anticorpo tem início com a ligação do epítipo do antígeno com o paratopo do anticorpo na superfície das células B. Em continuidade as cadeias leves existem o remanescente da cadeia que são as **regiões constantes** (C_L) e o restante da cadeia pesada com três domínios (C_H). Na extremidade C terminal está localizado o fragmento ou a **porção F_c**, é uma porção cristalizável – verificado nos primórdios das investigações que quando armazenados sob refrigeração estes cristalizavam. As células do sistema imune reconhecem esta

porção e fazem a ligação do anticorpo, por esta região, aos receptores de membrana dos macrófagos e outras células do sistema imune.

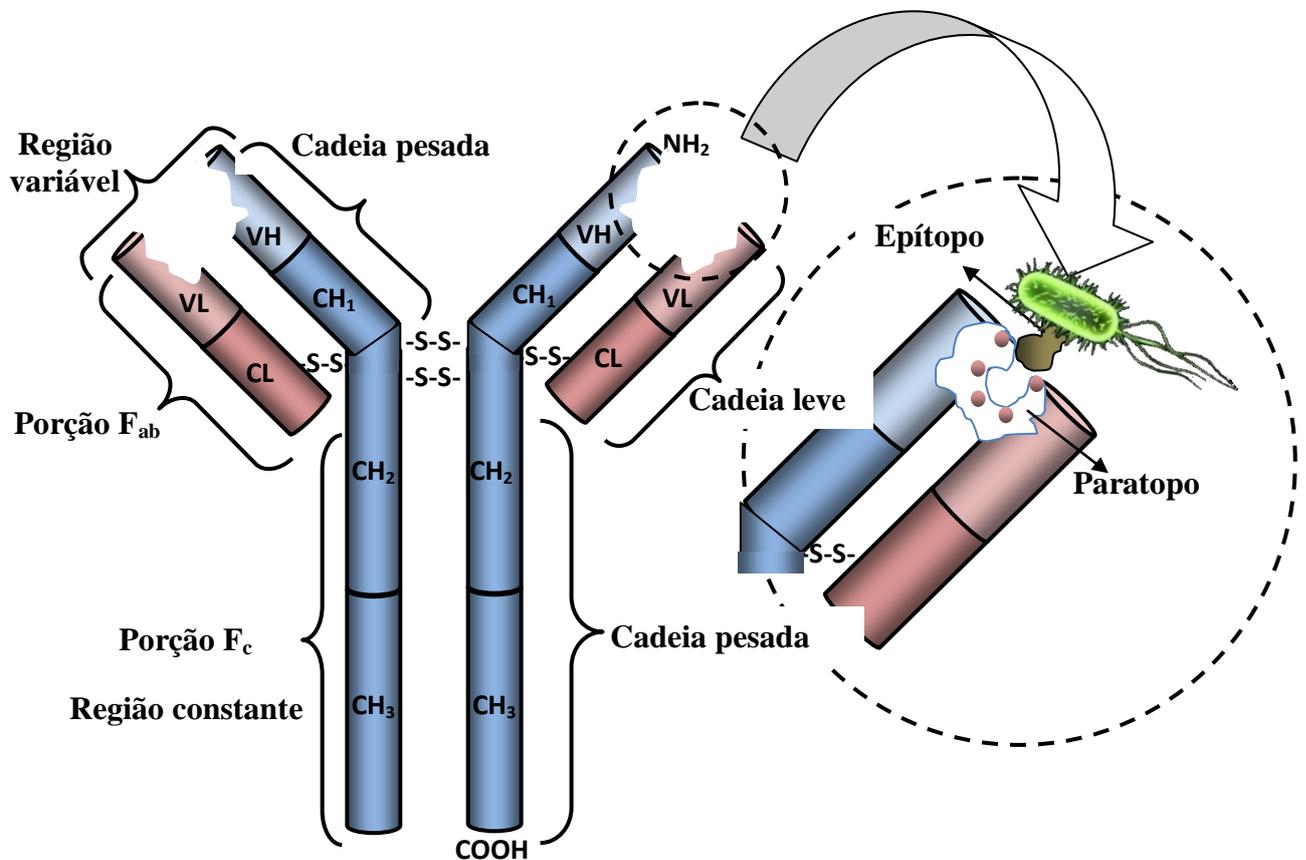


Figura 5. Representação esquemática das estruturas componentes do anticorpo. Adaptado de Fährnich (2002).

1.9.3 Interação antígeno-anticorpo

Kumagai; Tsumoto (2001) descreveram o termo afinidade entre o antígeno e o anticorpo como a força de ligação entre o determinante antigênico do antígeno, mais precisamente o epítopo, com o sítio de ligação ao antígeno no anticorpo, paratopo. A avides, com uma conotação diferente da afinidade, as forças de ligação ocorrem entre anticorpos e antígenos multivalentes.

A maioria das forças que atuam na atração primária entre epítopos e paratopos são interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre os radicais do antígeno e aminoácidos do anticorpo. Estas interações são reversíveis e não-covalentes envolvendo ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações coulombianas e ligações hidrofóbicas.

A ligação entre o antígeno-anticorpo pode ser expressa conforme mostra a Equação 1:



Esta interação dá uma constante de afinidade K_A , as direções das reações podem ocorrer para direita ou para esquerda permitindo as associações e dissociações respectivamente. Assim, a constante de equilíbrio é expressa pela constante de associação (K_A), de acordo com a Equação 2 (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; ELGERT, 2009):

$$K_A = \frac{[\text{AcAg}]}{[\text{Ac}] [\text{Ag}]} \quad (2)$$

Onde:

K_A = constante de associação ou afinidade

$[\text{AcAg}]$ = concentração do complexo

$[\text{Ac}]$ = concentração de anticorpos com sítios livres

$[\text{Ag}]$ = concentração de antígenos livres

São consideradas de alta afinidade essas interações com valores das constantes entre 10^4 e 10^{12} mol L⁻¹.

Elgert (2009) considera que as forças de ligação que contribuem para a interação do complexo anticorpo-antígeno são baseadas em ligações não-covalentes que são de natureza fraca quando comparadas com as covalentes e efetivas somente em pequenas distâncias entre os elementos.

A Figura 6 está representando esquematicamente as ligações não-covalentes que ocorrem entre antígenos e anticorpos, com ênfase nos quatro tipos de forças que mantêm estas ligações. Uma das condições fundamentais para que estas forças possam atuar é a necessidade da proximidade entre um grupo e outro das moléculas. Nas forças de atração Coulombianas (iônicas e eletrostáticas) íons positivos e negativos, em virtude de suas cargas elétricas, se atraem. No caso da interação Ag-Ac as forças de atração ocorrem entre as cadeias laterais das

proteínas de cargas opostas do epítopo e o sítio de ligação do anticorpo. As forças de van der Waals representam uma interação entre nuvens de elétrons do orbital externo de duas moléculas diferentes. A perturbação temporária dos elétrons de uma molécula formadora de dipolo vai induzir a formação do dipolo em outra molécula que esteja próxima, os dois dipolos geram uma atração entre eles. As ligações de Hidrogênio ocorrem através das ligações de hidrogênios, entre átomos eletronegativos das moléculas que estejam próximas.

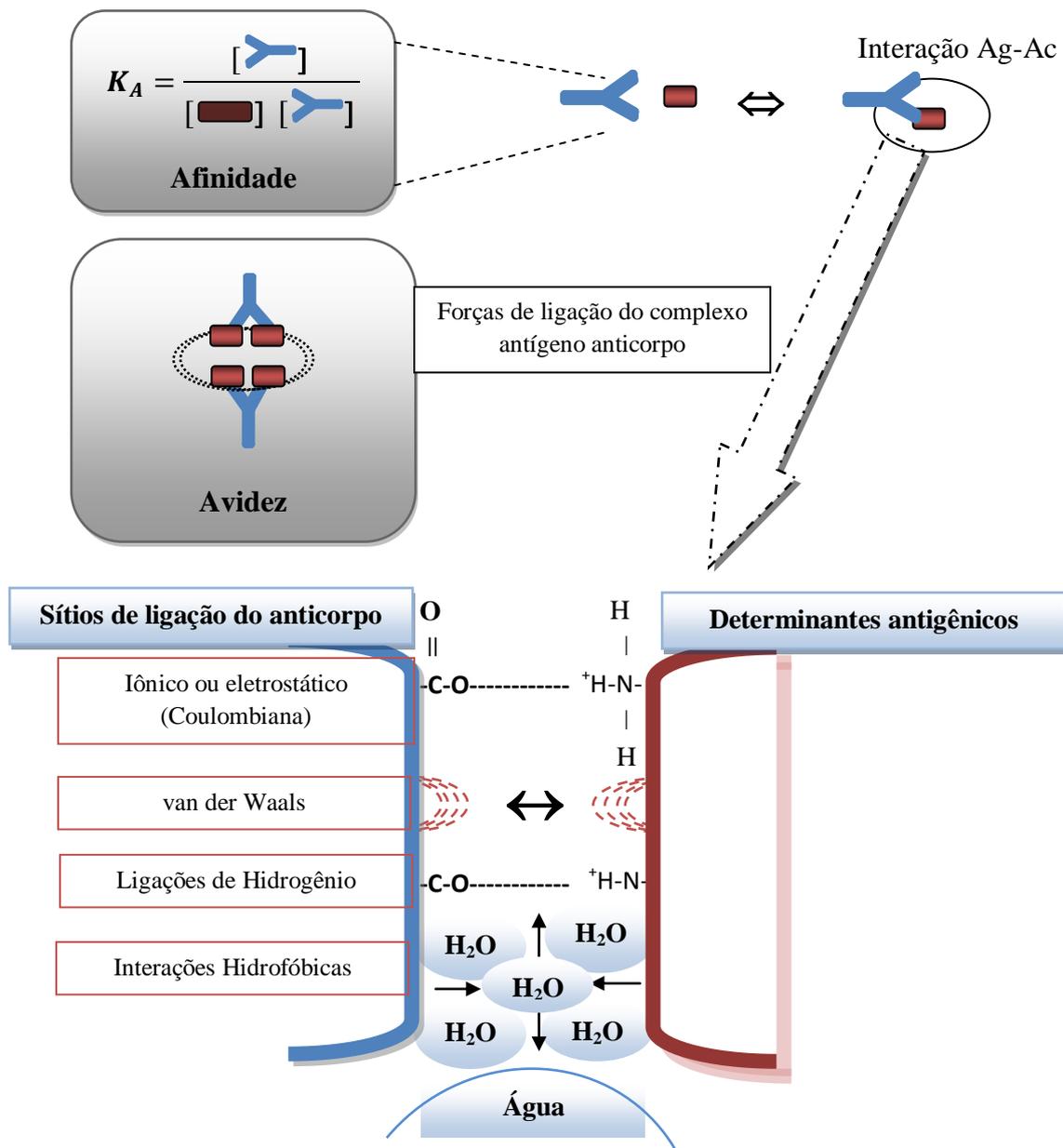


Figura 6. Representação esquemática das associações não-covalentes entre o antígeno e o anticorpo. Adaptado de Elgert (2009). In: Immunology: understanding the immune system.

Nas interações hidrofóbicas os grupos hidrofóbicos entre duas moléculas que se encontram normalmente solvatados por moléculas de água, interagem quando as superfícies dos mesmos se aproximam promovendo um colapso na estrutura da água oportunizando a interação ocasionada pela desorganização do sistema (DELVES; ROITT, 2006).

1.10 Eletrodos impressos (*screen-printed electrodes- SPE*)

A tecnologia dos eletrodos impressos (*screen-printing technology*) permite a produção em massa destes eletrodos e por um baixo custo. As grandes vantagens proporcionadas por estes eletrodos são a facilidade de utilização associada à alta sensibilidade, seletividade, precisão, estabilidade e respostas rápidas.

Desde o ano de 1990 a tecnologia de *screen-printed* ou tecnologia de *silk screen* tem sido empregada na indústria de microeletrônicos, através dos eletrodos impressos (*screen-printed electrode - SPE*). Um dos primeiros dispositivos a serem comercializados com esta tecnologia foi a dos biossensores para monitoração do nível de glicose no sangue de pessoas com diabetes (CLARK e LIONS, 1962).

Os eletrodos impressos são dispositivos produzidos com diferentes tintas de impressão depositadas em vários substratos, sendo os mais utilizados os de plásticos (PVC) ou de cerâmica de alumina. Os processos de fabricação podem ser realizados de modo a variar de procedimentos, desde os mais “artesanal”, ou seja, pela própria mão do operador ou por máquinas semiautomáticas ou totalmente automatizada (NASCIMENTO; ANGNES, 1998; COOPER; CASS, 2004).

Na confecção dos eletrodos impressos são seguidas etapas consideradas básicas para o procedimento e enumeradas por Nascimento; Angnes (1998) como: eleição adequada e preparo da tinta, escolha da tela, método de impressão, secagem e cura. A relevância da escolha do substrato também deve ser ressaltada, devendo ser pautada na funcionalidade e parâmetros do sensor.

Aryasomayajula (2008) conceituou matriz de substrato como o material que vai servir de suporte e fornecer superfície para impressão do eletrodo. É importante que o material do substrato seja termicamente e quimicamente inerte, com baixa corrente residual e alta condutividade elétrica capazes de resistirem às gerações de sinais produzidas pelos biossensores. A frequente utilização do PVC se baseia nas

características por ele apresentada como suas propriedades dielétricas, inércia química, baixo custo e fácil operacionalização. Outro substrato bastante utilizado é a cerâmica com excelentes propriedades como alta resistência, dureza, resistência ao calor e a corrosão.

Cooper; Cass (2004); Aryasomayajula (2008) discorreram sobre a escolha das tintas como sendo uma etapa importante para o processo de impressão, estas devem ser depositadas sequencialmente através de telas sobre o substrato, onde haverá reprodução do desenho. As tintas podem ser condutoras e dielétricas. Nas tintas condutoras o material utilizado pode ser pó de metais como ouro, platina, prata, paládio e carbono, as quais estão dispersas no ligante. Para detecção eletroquímica de substâncias o ouro tem sua indicação como material apropriado para fabricação de eletrodos impressos. As tintas dielétricas geralmente são feitas de polímeros ou cerâmicas na forma de isolamento ou encapsulamento. Estas devem ser compatíveis com o substrato, isto é, tinta de PVC para substrato de PVC.

Os eletrodos impressos possuem a vantagem de serem descartáveis, além da facilidade de miniaturização, pois pelo seu formato planar, propicia a sua integração a pequenos dispositivos portáteis. O sistema integrado de três eletrodos - eletrodo de trabalho (E_T); referência (E_R) e auxiliar (E_A) viabilizam sua utilização no sistema requerido pelo potenciostato.

A Figura 7 representa um eletrodo impresso de ouro possuindo como componentes: substrato ou suporte de cerâmica de alumina; eletrodo de trabalho – elaborado a partir de uma mistura de ouro/paládio (98/2%); eletrodo de referência - de prata/paládio (98/2%) e o eletrodo auxiliar - de ouro/paládio (98/2%); a camada isolante revestindo as trilhas condutoras e os contatos elétricos.

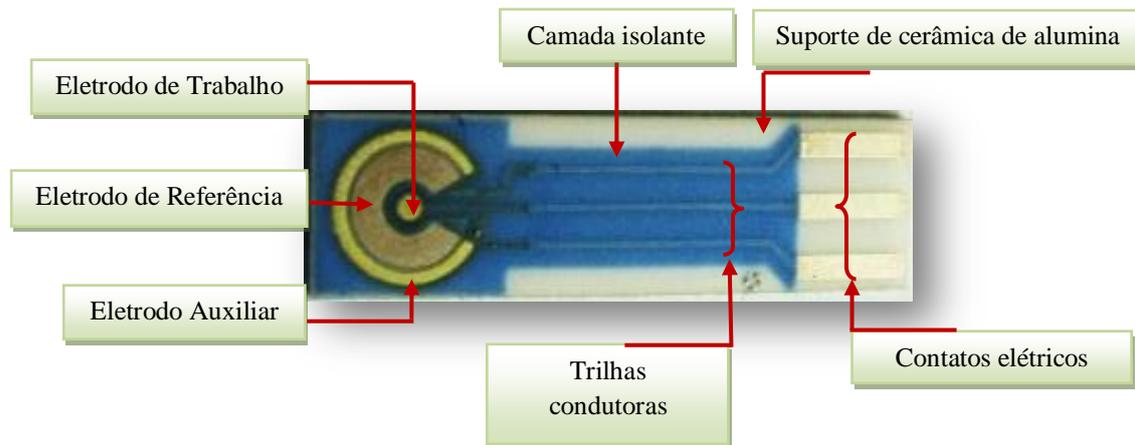


Figura 7. Componentes de um eletrodo impresso de ouro - adquirido da BVT Technologies.

1.11 Eletrodos modificados

A modificação de superfícies de eletrodos objetiva principalmente o controle das reações que ocorrem na interface eletrodo/solução propiciando a seletividade para um determinado analito.

Edwards; Bergren; Porter, (2007) conceituaram eletrodos quimicamente modificados como material condutor ou semicondutor revestido com um filme ou camada monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico, os quais alteram as propriedades eletroquímicas, ópticas, dentre outras, da interface eletrodo/solução. Moses, Wier, Murray (1975) foram os pioneiros a introduzir o termo eletrodos modificados quimicamente, no início dos anos 70, para designar aqueles eletrodos que tinham imobilizado, em suas superfícies, espécies quimicamente ativas objetivando controlar as propriedades físico-químicas da interface eletrodo/solução. Esta iniciativa da modificação das superfícies dos eletrodos se deu em face da busca pelo controle de uma maior seletividade, sensibilidade e estabilidade química e eletroquímica para os eletrodos, possibilitando deste modo sua aplicabilidade em áreas diversas e com várias finalidades.

Pereira; Santos e Kubota (2002) discorreram sobre os métodos de modificação das superfícies dos eletrodos ressaltando a diversidade dos mesmos, com o objetivo da manutenção das propriedades físicas e químicas do agente modificador, o que vai permitir ao eletrodo a geração de novas propriedades que vão diferir das

anteriores à modificação. Na modificação da superfície dos eletrodos devem ser considerados dois itens, o eletrodo base (ouro, platina, filme de mercúrio, carbono vítreo, fibras de carbono e pasta de carbono) e o agente modificador a ser utilizado. Mayes (2002) relata que a diversidade de metodologias e a escolha adequada estão vinculadas ao tipo de aplicação do dispositivo, do tipo de transdutor, da natureza do componente biológico e da amostra.

Dentre os métodos mais utilizados para a modificação do transdutor encontram-se a adsorção, ligação covalente, encapsulamento e *cross-linking*.

1.11.1 Adsorção

É um dos métodos mais simples onde o agente modificador deve ser diluído em um solvente adequado e o eletrodo, a ser modificado, imerso nesta solução para promover a exposição do mesmo ao agente modificador ou pela transferência de uma alíquota da solução para superfície a ser modificada – método “*coating*” (Figura 8). Como o processo de adsorção é baseado no equilíbrio, deve-se atentar para ocorrência de dessorção do agente modificador para solução ocasionado por variações das forças iônicas, solvente e pH do meio de reação (BIDMANOVÁ, 2007; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA; 2002).

O processo de adsorção envolve interações do tipo ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou hidrofóbicas.

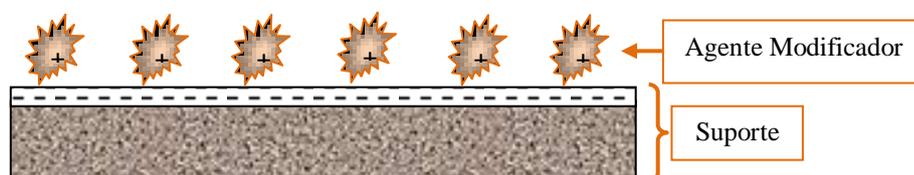


Figura 8. Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método de adsorção. Adaptado de Mendes (2006).

1.11.2 Ligação covalente

As modificações por ligações covalentes são caracterizadas por ligações entre grupos reativos (hidroxila, carbonila, tiol, fenol, imidazol, amino) ligados à superfície sólida do suporte, com grupos não ativos ou grupos funcionais do material biológico. Assim, o modificador será ligado covalentemente ao suporte conforme esquematizado na Figura 9. Mendes (2006) discorre sobre esta metodologia que deve ser realizada pelas etapas: ativação da superfície do eletrodo; interação do elemento biológico e posterior remoção das moléculas que estejam fracamente ligadas. Este tipo de modificação é mais estável que as demais, sendo a ligação enxofre-ouro (tiol) de grande relevância na modificação dos transdutores.

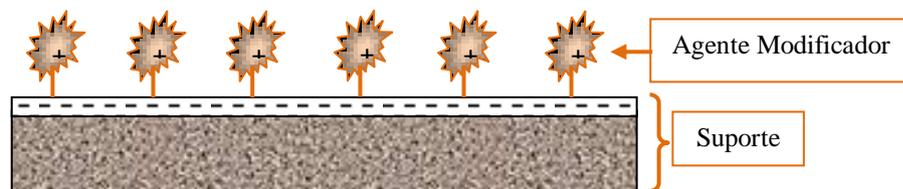


Figura 9. Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método da ligação covalente. Adaptado de Mendes (2006).

1.11.3 Ligação covalente cruzada (*cross-linking*)

Este método utiliza reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído, ácido bis-diazobenzidina-2,2"-dissulfônico, 4,4' difluoro-3,3' dinitrodifenilsulfona, diazobenzidina, tolueno-2,4-diisotiocianato e hexametilenodiisocianato) os quais realizam a ligação entre o agente modificador e o suporte sólido através de seus grupos reativos. As ligações formadas são consideradas fortes havendo formação de um sistema reticulado como conseqüência das ligações cruzadas que se formaram entre as moléculas do agente modificador e as do suporte (Figura 10). A técnica mais preconizada é realizada pela imersão do suporte em solução constituída pelo agente modificador e reagente de maneira a cobrir toda a superfície a ser modificada, deixando por alguns minutos este contato de acordo com o material utilizado, tempo suficiente para formação de uma película, para

posteriormente proceder as lavagens e secagens do suporte modificado (MELO, 2009; MARQUES; YAMANAKA, 2008; MENDES, 2006).

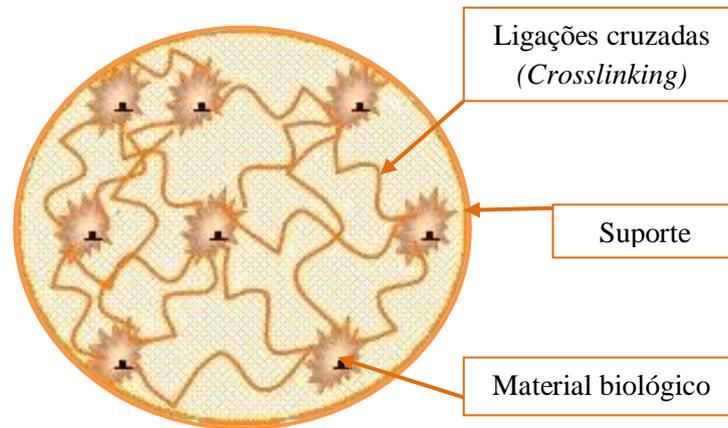


Figura 10. Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método da ligação covalente cruzada (*crosslinking*). Adaptado de Mendes (2006).

1.11.4 Encapsulamento

No encapsulamento a metodologia emprega uma membrana revestindo a superfície do suporte onde deverá ser confinado o material biológico. Estas membranas são semipermeáveis (náilon, nitrato de celulose, acetato de celulose, resina, colágeno, dentre outros) ou matrizes poliméricas (gelatina, poliácridamida, colágeno, alginato, dentre outros) conforme mostra a Figura 11. Os tamanhos dos poros controlam a passagem das moléculas através do mesmo, moléculas grandes ficam retidas, não entram nem saem, porém substratos e produtos pequenos passam livremente através da membrana semipermeável (MENDES, 2006; BIDMANOVÁ, 2007).

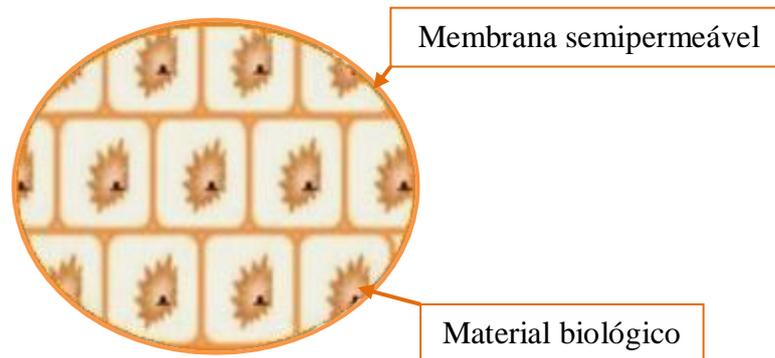


Figura 11. Representação esquemática de modificação de eletrodos pelo método de encapsulamento. Adaptado de Mendes (2006).

1.12 Monocamadas auto-organizadas (*self-assembled monolayer - SAM*)

As SAMs constituem uma metodologia baseada na interação de moléculas com o substrato e estas camadas monomoleculares altamente organizadas e com formação espontânea são resultantes da imersão de uma superfície sólida em solução contendo moléculas anfóteras (tióis, derivados do alquil, dentre outros). A adsorção das moléculas na superfície resulta da afinidade de um grupo funcional do adsorvente com a superfície do substrato. Estas ligações, para organização das camadas, ocorrem por interações hidrofóbicas das cadeias ligadas ao grupo funcional ($-NH_2$, $-COOH$ e $-OH$) (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003). Após esta interação com o substrato, a outra extremidade da monocamada com grupos reativos define as propriedades do eletrodo.

Monocamadas auto-organizadas têm sido bastante utilizadas na umectação, adesão, corrosão, catálise, nanolitografia e biossensores. Pagliai (2009) discorre sobre recentes técnicas de impressão por microcontato (μ CP) que têm sido preconizadas com a utilização de SAMs, onde um molde elastomérico (molde mestre) que é exposto previamente às moléculas que formarão a SAM e posteriormente por contato físico com o substrato haverá a deposição da SAM no substrato. Esta técnica pode ser aplicada na construção de biossensores em escala nanométrica, embora ainda não tenha tido grandes avanços.

Ferreira et al (2009) discorreram sobre a utilização pelo grupo de SPEs modificados com SAMs de cistamina e glutaraldeído como suporte para construção

de biossensores para diagnóstico de doença de Chagas, baseando-se na interação entre a proteína Tc85 de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e anticorpos anti-*T. cruzi* presentes no soro humano.

A Figura 12 ilustra esquematicamente a formação de monocamadas, enfatizando que um dos sistemas mais utilizados tem sido dos tióis e alcanotióis sobre a superfície de ouro dada a estabilidade da ligação Au-SR, resultando em uma estrutura bem organizada e orientada.

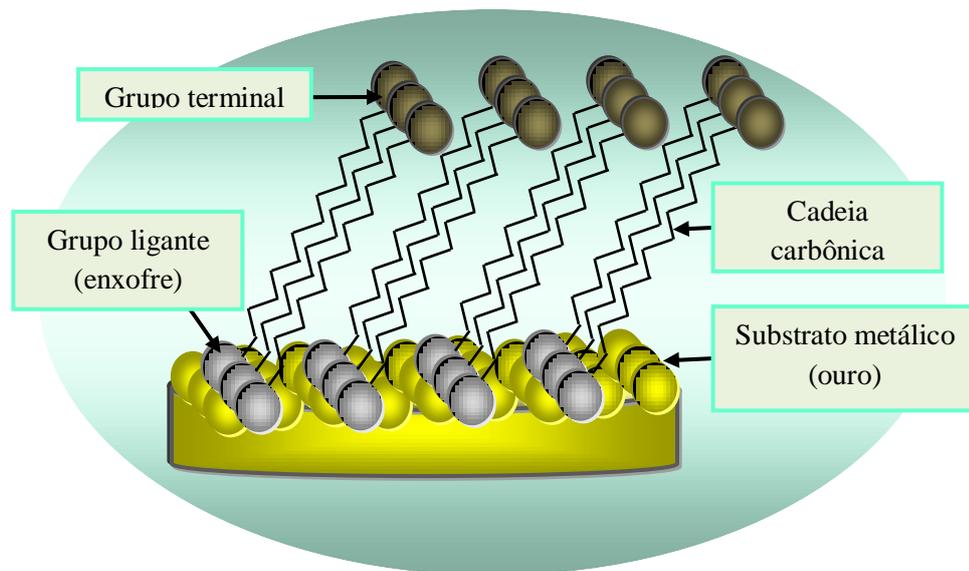


Figura 12. Representação esquemática de formação de monocamadas auto-organizadas sobre substrato de ouro. Adaptado de Marques (2009).

1.13 Imobilização de anticorpos

A imobilização de anticorpos sobre materiais de superfícies sólidas tem sua utilização em diversas áreas dentre elas, imunossensores, purificações e imunoensaios para diagnóstico, porém há relatos sobre alguns problemas relacionados com a baixa atividade biológica dos Ac após imobilização, fato atribuído às orientações aleatórias das macromoléculas assimétricas. Assim sendo, a escolha da metodologia adequada a ser utilizada nas imobilizações de Ac é de crucial importância (DUGAS; ELAISSARI; CHEVALIER, 2010).

A imobilização de anticorpos, funcionando como elemento de biorreconhecimento, deve obedecer a padrões para proporcionar um bom

desempenho para detecção e posterior conversão de sinais não-elétricos em sinais elétricos. Riccardi; Costa; Yamaka (2002) relataram que a eficiência da interação analito-receptor requer que o anticorpo seja bastante específico para captura do antígeno, ressaltando a necessidade da superfície sólida também possuir características fundamentais como capacidade de ligação a imunorreagentes, ligação estável e não desnaturar a molécula imobilizada.

Yoon; Hwang; Kim (2011) mencionaram que as técnicas mais utilizadas para imobilização de anticorpos em superfícies sólidas são pela adsorção física, ligação covalente, *cross-linking* e *entrapment* em gel, atentando que a utilização destes métodos pode resultar em uma diminuição da atividade de ligação e seletividade dos anticorpos após a imobilização, o que pode ser ocasionado pelas orientações inadequadas ou desnaturação dos anticorpos. Portanto, muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de sítios específicos na imobilização de anticorpos, dentre eles a imobilização da proteína A ou G na superfície sólida antes de imobilizar os anticorpos. Mouri et al., (2010) preconizaram as imobilizações através de técnicas foto-induzidas para IgG utilizando azopolímeros, onde as interações eletrostáticas entre a IgG e o azopolímeros com grupos funcionais (COOH e NMe₂), desempenhando importante papel na orientação da imobilização da IgG.

Yoon; Hwang; Kim (2011) desenvolveram uma técnica onde a orientação do anticorpo foi mantida pela proteção do sítio de ligação antígeno-anticorpo do anticorpo, antes da imobilização, com uma mistura ω -funcionalizada da monocamada auto-organizada de ácido 12-mercaptododecanóide e 1-heptanotiol, obtendo resultados significativamente melhores quando comparados com a utilização de imobilização aleatória.

Dugas; Elaissari; Chevalier (2010) discorreram sobre as metodologias utilizadas para imobilização de anticorpos com ênfase às reações diretas aos sítios de ligações, para tanto sugeriram três principais estratégias para imobilização. A primeira enfatiza a ligação seletiva entre o fragmento F_c dos anticorpos com receptores específicos como a proteína A ou G. Nesta técnica o suporte sólido deve estar biofuncionalizado, ou modificado pela proteína, dando condições para ligação dos anticorpos através de seus fragmentos F_c. As outras duas metodologias se baseiam na imobilização química dos anticorpos ao suporte sólido, onde o sítio de ligação do anticorpo são as ligações dissulfeto da região de dobradiça, para tanto o

anticorpo deve ser submetido a tratamentos químicos, fotoquímicos ou enzimáticos para haver redução destas ligações, criando assim sítios específicos para os grupos tióis. Na terceira técnica é criado um sítio específico reativo na metade do carboidrato, mais especificamente, no domínio CH_2 do fragmento F_c , o carboidrato é modificado pela abertura de um anel específico. Os autores enfatizaram ainda a imobilização direta dos anticorpos ao suporte sólido efetivada pela reação do grupo aldeído com o amino ou hidrazidas funcionalizadas em suportes sólidos ou pela imobilização indireta utilizando *cross-linkers* heterobifuncionais obtendo excelentes resultados. A Figura 13 ilustra esquematicamente os métodos de imobilização acima abordados.

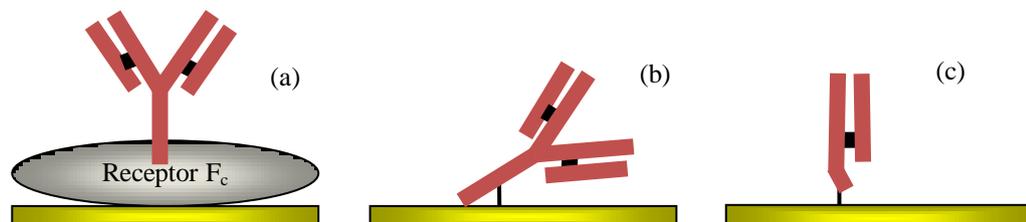


Figura 13. Representação dos métodos de imobilização de anticorpos (IgG), de forma orientada. (a) ligação do anticorpo ao suporte sólido pelo fragmento F_c ; (b) ligação do anticorpo ao suporte pelo domínio CH_2 do fragmento F_c e (c) onde anticorpo é imobilizado ao suporte pelo grupo sulfidríla da região C-terminal do fragmento F_{ab} . Adaptado de Dugas; Elaissari; Chevalier (2010). In: Recognition receptors in biosensors.

Nisnevitch; Firer (2001) discorreram sobre a imobilização de anticorpos com orientação aleatória, o que ocorre porque a molécula do anticorpo possui vários grupos de lisina em sua superfície vindo a propiciar múltiplos pontos de ligação dos anticorpos a uma superfície, quando esta ligação ocorre no sítio de ligação do antígeno (F_{ab}) considera-se a habilidade de ligação do anticorpo seriamente comprometida ou eliminada. A Figura 14 representa as possibilidades de ligação do anticorpo a uma superfície sólida, conseqüentemente sua capacidade de ligação ao antígeno como totalmente ou parcialmente ativa e inativa.

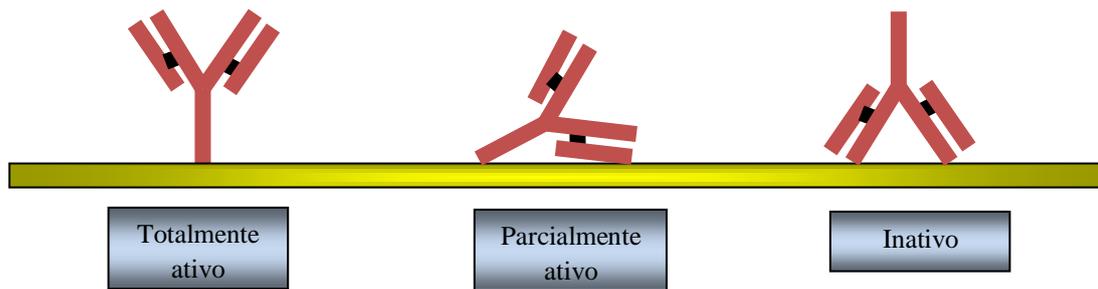


Figura 14. Representação de imobilização de anticorpos de forma aleatória e influência sobre sua atividade de ligação com o antígeno. Adaptado de Nisnevitch, Firer (2001).

1.14 Técnicas eletroquímicas

1.14.1 Espectroscopia por impedância eletroquímica (EIE)

A impedância eletroquímica é definida como a razão entre uma perturbação aplicada a um sistema formado de uma interface eletrodo/solução e a resposta correspondente a esta perturbação, geralmente um sinal alternado. Assim, é aplicado um sinal senoidal de pequena amplitude, poucos milivolts, em intervalos de frequência amplos e realizada análise da resposta do sistema à perturbação. A aplicação do sinal senoidal pode ser feita utilizando uma célula eletroquímica convencional constituída pelo eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar (contra-eletrodo) e o eletrodo de referência, além de um analisador de resposta de frequência, o qual mede a resposta da corrente no sistema à medida que varia a frequência do sinal senoidal, devidamente acoplado a um potenciostato. Esta medida da impedância de um sistema eletroquímico é denominada espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Damos; Mendes; Kubota (2004) relataram que quando é efetuado o monitoramento entre o potencial aplicado e a corrente são obtidos a impedância do sistema e o ângulo de fase, este considerado a defasagem da corrente correlacionada ao potencial que foi aplicado. Através das medidas de impedância e ângulo de fase podem-se realizar procedimentos avaliativos relacionados ao

transporte de cargas, dupla camada, capacitância redox, condutividade iônica, dentre outros.

Os resultados de impedância podem ser representados pelos Diagramas no Plano Complexo ou de Nyquist, que relaciona a impedância imaginária (Z_{im}) com a impedância real (Z_{re}) e os Diagramas de Bode, que relaciona a impedância total do sistema (Z) e o ângulo de fase (θ) com a frequência, as informações provenientes do diagrama de Bode podem ser complementares àquelas fornecidas pelo diagrama de Nyquist (PEREZ, 2010; PINTO, 2008).

Um dos métodos mais utilizados é o diagrama de Nyquist, onde a impedância pode ser expressa como número complexo onde a resistência é a componente real e a capacitância a componente imaginária.

A Figura 15 representa um diagrama de Nyquist ideal apresentando na região de altas frequências um semicírculo e nas de médias e baixas frequências uma variação linear. O semicírculo, na região de altas frequências, mostra o efeito de relaxação de transferência de carga (frequência no máximo do semicírculo), onde podem ser obtidos os valores R_e , R_{tc} e C_d . Onde: o R_e é a resistência do eletrólito mais o eletrodo (obtido na interseção do semicírculo com o eixo real em altas frequências). Quando há a segunda interseção do semicírculo com o eixo real podem ser encontrados os valores $R_{tc} + R_e$, onde o R_{tc} é a transferência de carga entre o eletrodo/eletrólito. O C_d representa a capacitância da dupla camada formada pelo acúmulo de cargas na interface eletrodo/eletrólito e R_L a resistência limite. Assim, a região de altas frequências esta associada com a resistência da solução eletrolítica e a de baixas frequências representam o processo de transporte de massa por difusão de íons, já a região entre a de altas frequências e as de baixas associa-se com a resistência de transferência de carga na interface (GIROTTI; De PAOLI, 1998; SANTANA, 2007; PEREZ, 2010).

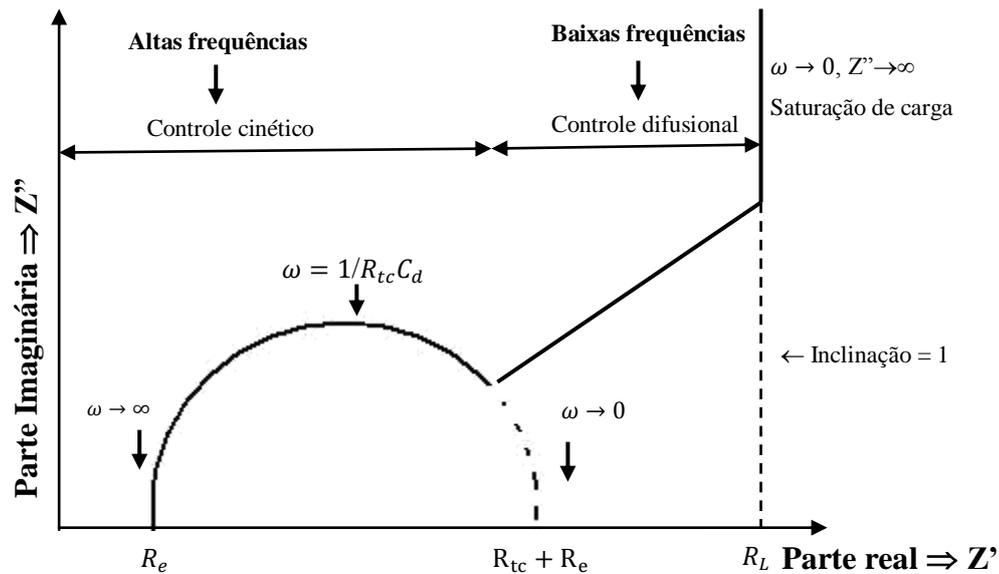


Figura 15. Representação do Diagrama de Nyquist ideal. Adaptado de Girotto; De Paoli (1998).

A segunda forma de representação da impedância é pelos diagramas de Bode que consiste de um plano de eixos ortogonais nos quais se tem no eixo das ordenadas duas grandezas o logaritmo da impedância ($\log |Z|$) em ohms e o ângulo de fase (θ) em graus; no eixo das abscissas tem-se o logaritmo da frequência angular ($\log \omega$), onde ω é expresso em radianos/segundo (rad/s). As informações geradas pelo diagrama de Bode são importantes e podem apresentar informações complementares aquelas obtidas a partir do diagrama de Nyquist (LISDAT, SCHÄFER, 2008; ARENA, 2010; PEREZ, 2010).

A EIE tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta de detecção de vários tipos de interações moleculares, tais como imunossensores, hibridização de DNA, testes rápidos biomoleculares, monitoração de cultura de células. Os imunossensores impedimétricos tem tido ampla aplicação em áreas diversificadas, baseada na multiplicidade de vantagens por eles apresentados, assim como na monitoração das etapas do processo de construção de biossensores e de interação nos processos de biorreconhecimento.

Ferreira et al. (2009) relataram que dentre os métodos eletroquímicos utilizados para monitoração das propriedades das monocamadas auto-organizadas em superfície de ouro, a EIE é preferencialmente eleita sendo a caracterização das mesmas feita através da mensuração de transferência de carga do par redox, tanto

na presença quanto na ausência de monocamadas auto-organizadas (eletrodos *bare*), e pela inclinação da porção linear da impedância real *versus* plots de frequência^{-1/2}, nas regiões de baixas frequências para eletrodos *bare* e eletrodos modificados.

1.14.2 Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroquímica através da qual se obtém dados referentes a uma espécie química de interesse, tais como: valor do potencial de pico, intensidade de corrente dos picos (anódico e catódico), dentre outros. Um analito passa ser determinado por voltametria é necessário que a espécie a ser determinada seja eletroativa.

Na voltametria cíclica é aplicado um potencial, na forma de uma onda triangular, em uma célula eletroquímica e a corrente que flui através desta deverá ser medida em função do potencial. O potencial é aplicado no eletrodo de trabalho e à medida que este potencial se torna mais negativo (varredura catódica), há um aumento da energia dos elétrons e o eletrodo se torna uma fonte de elétrons provocando um fluxo de elétrons entre o eletrodo e a solução o que permite a redução da espécie na interface eletrodo/solução. Quando os potenciais são mais positivos, ocorre o inverso, a energia dos elétrons diminui e ocorre a oxidação da espécie (varredura anódica). O potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado durante a varredura de potencial. O resultado obtido como resposta a essa perturbação são curvas de corrente vs potencial e terão formas dependentes das características do sistema, tais como reversibilidade ou não, presença de reações químicas acopladas ao processo do eletrodo, etc (GRIESHABER et al., 2008; MÓDOLO, 2009). Fundamentalmente, a corrente resultante dependerá de duas etapas do processo total (difusão da espécie eletroativa à superfície do eletrodo e reação de transferência de carga).

A Figura 16 representa uma varredura do potencial do eletrodo de trabalho com uma função triangular em relação ao eletrodo de referência. É representado apenas o primeiro ciclo, mas dependendo dos dados ou informações desejadas podem ser realizados vários ciclos (GUIMARÃES, 2006). É uma técnica adequada para estudos

iniciais das características dos compostos e também para examinar sistemas eletroquímicos complexos, como os sistemas envolvendo as reações enzimáticas.

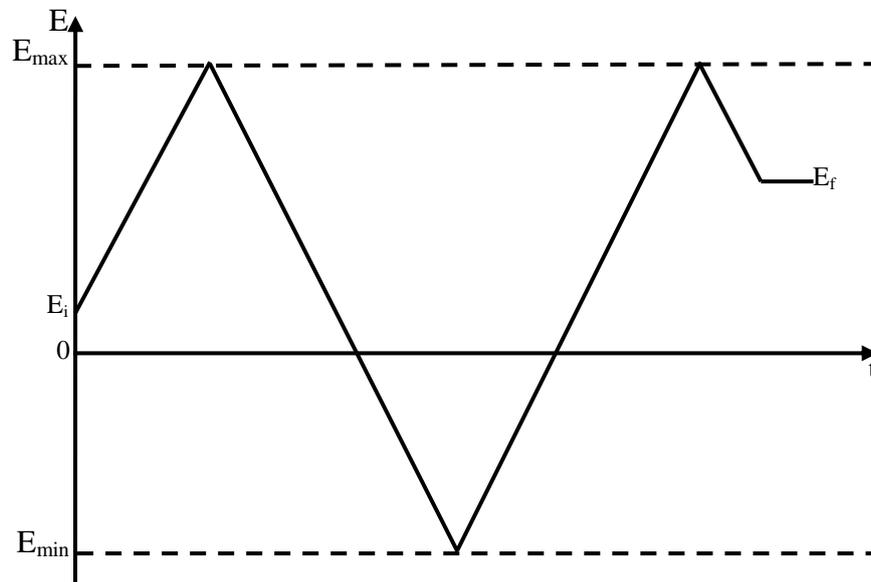


Figura 16. Representação da variação do potencial aplicado com o tempo em VC com os parâmetros mais importantes: potencial inicial (E_i), potencial máximo (E_{max}), potencial mínimo (E_{min}) e o potencial final (E_f). Adaptado de Brett e Brett (1996).

As técnicas de voltametria podem ser aplicadas em várias áreas especialmente quando se deseja saber a eletroatividade de compostos (moléculas biológicas), as reações químicas acopladas e estudar superfícies de eletrodos. Vários trabalhos foram realizados utilizando a voltametria. Ferreira; Yamanaka; Benedetti (2007) realizaram estudos de eletrodos de ouro policristalino (poli) modificados por SAM de cistamina e glutaraldeído e monitoraram a reação enzimática (HRP) em meio de iodeto, para construção de sensores, utilizando a técnica de voltametria cíclica. Hleli et al (2006) caracterizaram as propriedades da monocamada mista e todas as etapas de construção de imunossensor para detecção de atrazina utilizando voltametria cíclica.

1.15 OBJETIVOS

- Desenvolver imunossensor impedimétrico para detecção de *Staphylococcus aureus*, em áreas críticas hospitalares (Centros Cirúrgicos e Unidades de Terapias Intensivas – UTIs);
- Contribuir para o Controle de Infecção Hospitalar com um método efetivo de monitoração da contaminação do ar do ambiente hospitalar;
- Atuar como indicativo da efetividade das metodologias indicadas e adotadas para conter a IH;
- Oportunizar, quando houver contaminação ambiental, que as medidas de Biossegurança e outras normas sejam revistas e tenham adequações às suas especificidades.

CAPÍTULO II
DESENVOLVIMENTO



DESENVOLVIMENTO

Os experimentos para o desenvolvimento do imunossensor impedimétrico foram realizados nos laboratórios do Instituto de Química da UNESP, Campus de Araraquara e da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar):

- Laboratório de Eletroanalítica, do Departamento de Química Analítica, UNESP: preparo das soluções, modificações das superfícies dos eletrodos e medidas de voltametria cíclica.

- Laboratório de Eletroquímica, do Departamento de Físico-Química, UNESP: realizadas as medidas de impedância eletroquímica de todas as etapas do desenvolvimento do imunossensor e aquisições das imagens de microscopia dos eletrodos impressos.

- Laboratório de Microbiologia do Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, para manipulação e preparo das lâminas com os *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e soluções

Na preparação da solução tampão salino fosfatado (PBS) foram empregados reagentes fornecidos pela Sigma-Aldrich e o procedimento foi conforme o *Methods in Enzymology* (SIDNEY; NATHAN, 1955). Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada ($\rho = 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) fornecida pelo sistema Mili-Q (Millipore Inc., USA). Todos os materiais utilizados foram submetidos ao processo de limpeza (lavagem com Extran e/ou desinfecção com etanol) para remoção de qualquer resíduo orgânico ou impurezas que pudessem vir a interferir nas medidas.

O reagente cistamina (CYS) foi adquirido da Sigma-Aldrich ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2$) e soluções aquosas com diferentes concentrações foram obtidas. Glutaraldeído (GA) a

25% obtido da Sigma-Aldrich ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$), diluído em PBS, foi utilizado como SAM reativa para aminas.

A proteína A de *S. aureus*, obtida da Sigma-Aldrich, é uma proteína produzida pela parede celular dos *S. aureus* e que possui alta afinidade para se ligar às IgGs, foi utilizada para a modificação do eletrodo de trabalho sobre as SAMs de cistamina + glutaraldeído ou diretamente sobre a superfície eletródica do SPE.

Os anticorpos utilizados foram imunoglobulinas IgG monoclonais de ratos que reconhecem especificamente os peptídeoglicanos das paredes celulares dos *S. aureus*, Proteína A negativa de *S. aureus* e *S. epidermidis*, obtidos da Abcam (Cambridge, MA, USA).

Os espaços livres entre os anticorpos foram bloqueados com soroalbumina bovina (SAB - Sigma-Aldrich) para evitar as reações inespecíficas, diluída em PBS contendo 0,002% de Tween 20.

Para o imunoenensaio foram utilizadas cepas de *S. aureus* ATCC (6535) como analito (antígeno) cedidas pela Prof^a. Cristina Paiva de Sousa do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar.

Para as medidas de impedância e voltametria cíclica foi usada a solução tampão salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) como eletrólito de suporte contendo o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

2.2 Equipamentos para medidas eletroquímicas

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram efetuadas no modo potenciostático, empregando um sistema da EG&G PAR, que consiste de um potenciostato modelo 283, um detector de resposta em frequência, modelo 1025, controlado pelo programa *Electrochemistry PowerSuite* (Princeton Applied Research). Todas as medidas foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday conectada a um terra real; o tempo de estabilização do potencial de circuito aberto foi controlado pelo programa M352 da *Princeton Applied Research*.

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em um potenciostato/galvanostato $\mu\text{AUTOLAB}$ Type III e um software GPES 3.0 (*General Purpose Electrochemical System*) para o tratamento dos dados.

Análises da superfície de trabalho do eletrodo impresso foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), marca Topcon, SM-300. Para a visualização dos eletrodos impressos e cálculos das áreas geométricas foi empregado um estereomicroscópio binocular, modelo Q734ZT, marca Quimis, ampliação de 40× e contendo uma câmera fotográfica acoplada, modelo SDC-312, marca Quimis.

Microscópio óptico trinocular com amplitude de 800× acoplado a uma câmera da marca Samsung, modelo SDC-415ND e software Image Tool foi usado na análise dos esfregaços de *S. aureus* em lâminas preparadas pela coloração de Gram.

Para a obtenção das medidas de pH, empregou-se um pHmetro da marca Digital Gehaka modelo PG 2000.

2.3 Eletrodos impressos e célula eletroquímica

Os eletrodos impressos (*screen-printed electrodes* - SPE) foram adquiridos da BVT Technologies (Brno, Czech Republic) sendo do modelo AC1.W1. RS.

A Figura 17 representa esquematicamente a descrição dos eletrodos impressos em suporte de cerâmica. Estes possuem dimensões que correspondem a um comprimento de 25,5 mm; largura de 7,2 mm e espessura de 0,6 mm, conforme especificações do fabricante. O dispositivo serigrafado é constituído por um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho, (pseudo) referência e auxiliar, tendo os mesmos a seguinte composição:

- Eletrodo de trabalho (E_T): Au-Pd (98/2%), $A_{geom} = 0,0070 \text{ cm}^2$;
- Eletrodo de referência (E_R): Ag-Pd (98/2%), $A_{geom} = 0,137 \text{ cm}^2$;
- Eletrodo auxiliar (E_A): Au-Pd (98/2%), $A_{geom} = 0,072 \text{ cm}^2$.

Estes sistemas de eletrodos estão revestidos por uma camada isolante que reveste as trilhas condutoras até próximo aos contatos elétricos.

- Os contatos elétricos são constituídos de prata.

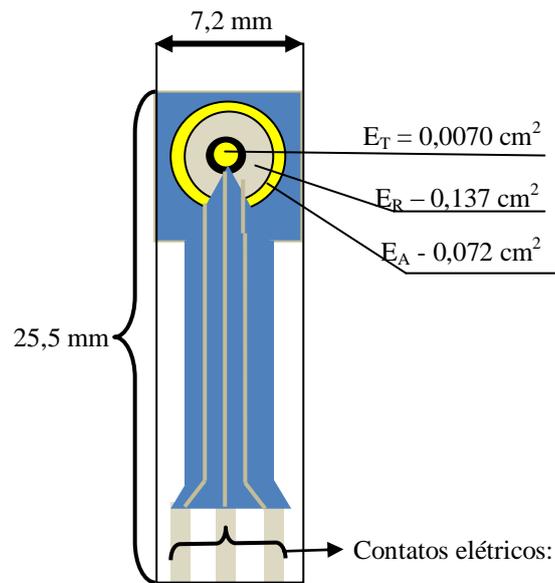


Figura 17. Descrição do eletrodo impresso.

As áreas dos eletrodos impressos foram calculadas com base nas imagens obtidas conforme mostra a Figura 18.

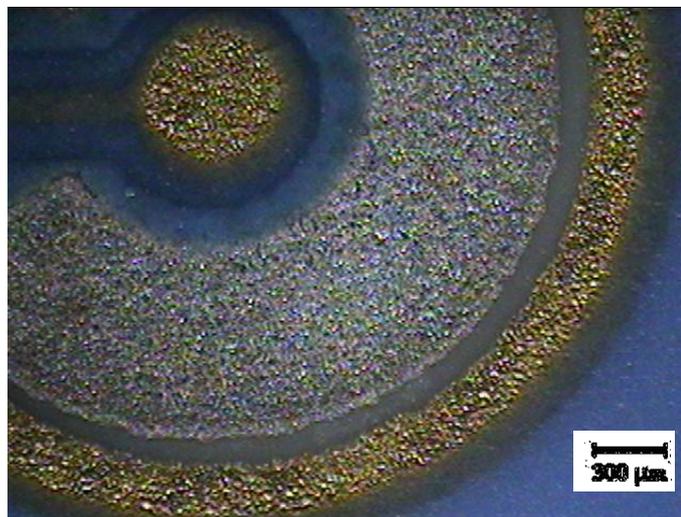


Figura 18. Imagem dos eletrodos impressos empregadas nos cálculos das áreas geométricas obtida no Laboratório de Eletroquímica do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química, UNESP, Campus de Araraquara.

Para as medidas eletroquímicas foi usada uma célula eletroquímica convencional de 2 mL de eletrólito de suporte contendo as espécies redox

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A célula eletroquímica foi adaptada no interior de uma Gaiola de Faraday com o intuito de proteger o sistema de perturbações elétricas ou eletromagnéticas. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$).

2.4 Metodologia

No desenvolvimento do imunossensor impedimétrico, dois procedimentos para a imobilização dos anticorpos (Ac) anti- *Staphylococcus aureus* na superfície do eletrodo impresso foram estudados:

a) SAM de cistamina ($\text{SH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$) + glutaraldeído ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHO}$) + proteína A de *S. aureus* + Ac anti-*S. aureus*;

b) Proteína A de *S. aureus* + Ac anti-*S. aureus*.

Com a imobilização dos anticorpos anti-*S. aureus* sobre a superfície do transdutor modificado, os espaços livres entre os anticorpos foram bloqueados com soroalbumina bovina para evitar reações inespecíficas. Então o imunossensor, por meio de reação de afinidade, reconheceu o antígeno e tal reação foi monitorada por impedância eletroquímica.

2.4.1 Manipulação e limpeza dos eletrodos impressos

Os eletrodos foram recebidos em pacotes de alumínio selados e isolados individualmente para evitar contato com a atmosfera. Em todas as etapas os eletrodos foram cuidadosamente removidos de sua embalagem (somente antes do uso) com auxílio de uma espátula para romper a proteção de alumínio, tendo-se o cuidado de não tocar nas áreas dos eletrodos nem dos contatos para evitar contaminação. Os eletrodos foram lavados com etanol (não lavar os contatos elétricos) e água Milli Q e a secagem feita à temperatura ambiente.

2.4.2 Modificações do eletrodo de trabalho (E_T) dos SPE empregando SAM de cistamina e glutaraldeído

A metodologia de ligação covalente de bioligantes à superfície do eletrodo de ouro impresso, modificação química com cistamina e ativação com glutaraldeído (Figura 19) foi realizada segundo Horáček e Skládal (HORÁČEK, J. SKLÁDAL, P., 1997):

- A) Lavagem dos eletrodos com etanol;
- B) Secagem à temperatura ambiente;
- C) Aplicação de 10 µL de solução aquosa de cistamina 2×10^{-2} ou 4×10^{-2} mol L⁻¹ sobre a superfície do eletrodo de trabalho;
- D) Incubação por 2 h à temperatura ambiente;
- E) Lavagem dos eletrodos com água destilada, por imersão e agitação branda, três vezes de cinco segundos;
- F) Adição de 10 µL de solução de glutaraldeído (GA) 2,5% em solução tampão salino (PBS) 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5) por eletrodo;
- G) Incubação por 1 h à temperatura ambiente;
- H) Lavagem conforme item E;

2.4.3 Imobilização da proteína A para *Staphylococcus aureus* via glutaraldeído na cistamina e diretamente na superfície de trabalho do SPE

A proteína A foi imobilizada sobre a SAM de cistamina via glutaraldeído (Figura 19) e também adicionada diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho - SPE. Em ambos os procedimentos empregou-se uma alíquota de 10 µL da solução tampão salino 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5) contendo as diferentes diluições da proteína A (1 mg/mL⁻¹). A adição direta da proteína A sobre a superfície de ouro foram investigadas nas diluições de 1:10 e 1:20 e com tempo de incubação de 2 h. Também foi estudado o tempo de incubação de 12 h para a diluição de 1:20 da proteína A. Diluição de 1:20 foi usada para a imobilização da proteína A sobre as monocamadas (CYS-GA) e tempo de incubação de 12 h. Em ambos os procedimentos experimentais a incubação ocorreu à temperatura de 4-8°C. Decorrido o tempo de incubação procedeu-se a lavagem na mesma solução tampão

de diluição da proteína A, por imersão e agitação branda, três vezes com duração de 5 segundos em cada lavagem. As avaliações das imobilizações da proteína A foram empregando impedância eletroquímica.

2.4.4 Imobilização dos anticorpos monoclonais anti- *Staphylococcus aureus* sobre a superfície do transdutor modificada com SAMs e proteína A

Com base nos resultados de impedância, procedeu-se a imobilização dos anticorpos monoclonais somente sobre as SAMs contendo a proteína A (Figura 19). Foi estudada a diluição de 1:20 para o anticorpo monoclonal em solução tampão salino $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ (pH 7,5) a partir de uma solução estoque de $0,0184 \text{ mg mL}^{-1}$. Uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ foi adicionada sobre a superfície de trabalho modificada (CYS + GA + proteína A) e incubada à temperatura ambiente durante 3 h. Após o tempo de incubação, os eletrodos foram lavados na mesma solução tampão de diluição dos anticorpos, por imersão e agitação branda, três vezes com duração de 5 segundos em cada lavagem. Medidas de impedância foram realizadas para avaliar a imobilização dos anticorpos monoclonais.

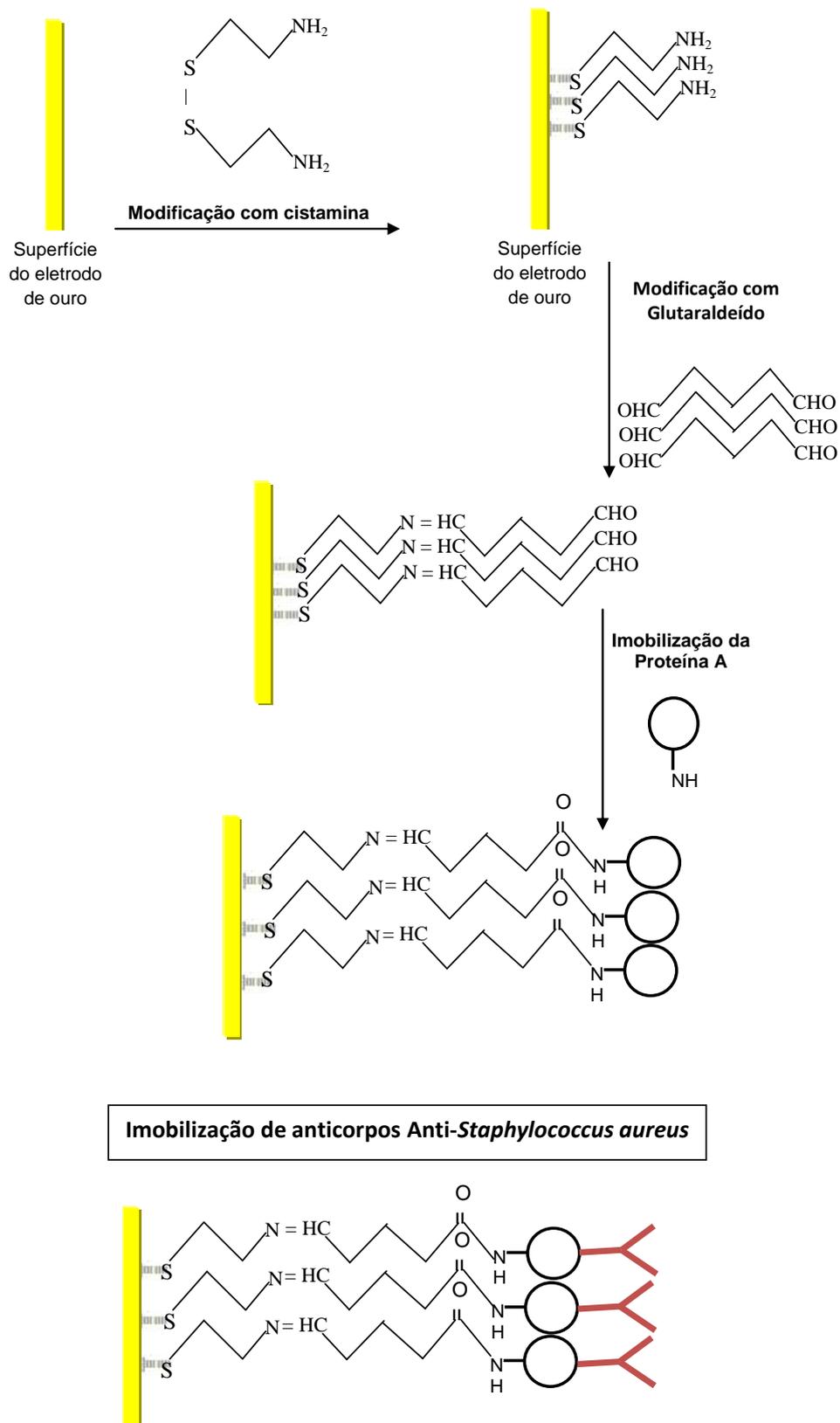


Figura 19. Esquema da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-*S. aureus* na superfície de ouro do eletrodo impresso.

2.4.5 Bloqueio dos espaços livres entre os anticorpos com soroalbumina

Após modificações e imobilização dos anticorpos orientados pela presença da proteína A na superfície do eletrodo impresso, realizou-se o bloqueio da superfície com a aplicação de 10 μL de solução tampão PBS-T (solução tampão PBS 0,1 ml L^{-1} (pH 7,5) contendo 0,02% de Tween 20) acrescida de 0,5% de soroalbumina bovina (solução de bloqueio). Solução de bloqueio sobre a superfície do transdutor com incubação de 1 h foi adotada para o desenvolvimento do imunossensor. O bloqueio da superfície do sensor foi avaliado através de medidas EIS.

2.4.6 Interação antígeno-anticorpo na superfície de trabalho dos eletrodos impressos

No desenvolvimento do imunossensor, estudos preliminares foram realizados empregando cepas de *S. aureus* ATCC – 6535, como antígeno específico para o anticorpo monoclonal. Uma amostra de *S. aureus* coletada em meio de cultura foi primeiramente diluída em água peptonada tamponada e em seguida na proporção de 1:1 em solução de bloqueio (solução tampão PBS-T). Sobre a superfície do SPE modificado e contendo os anticorpos anti-*S. aureus* imobilizados foi aplicado 10 μL da solução antigênica. O tempo de incubação para a reação de afinidade foi de 30 min à temperatura ambiente. Para melhor visualização das bactérias a serem empregadas no imunoenensaio, foi preparada um esfregaço em lâmina pela coloração de Gram conforme mostra a Figura 20.

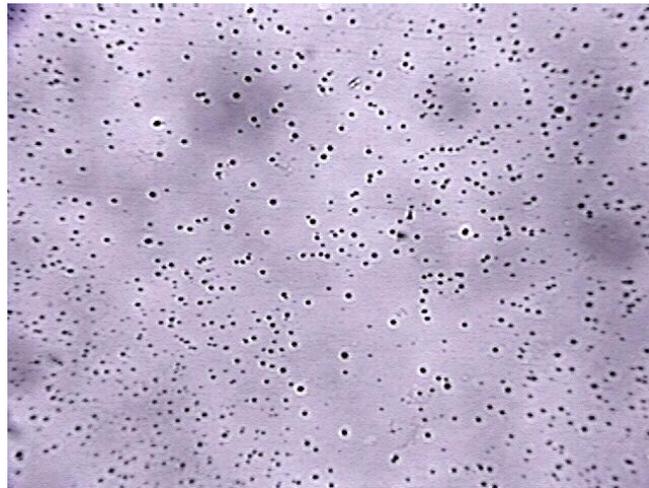


Figura 20. Esfregaço em lâmina pela coloração de Gram para *S. aureus*. Imagem obtida no Instituto de Química, UNESP, Campus de Araraquara.

2.4.7 Condições experimentais para as medidas de impedância

Para os eletrodos não modificados ou modificados, as análises de impedância foram realizadas no intervalo de frequência de 50 kHz a 10 mHz. Os eletrodos foram transferidos imediatamente para a célula eletroquímica. Os tempos de estabilização do potencial e corrente foram de 15 min, respectivamente, empregando o potencial de circuito aberto (E_{OC}). Foi aplicada uma amplitude de 10 mV (rms - *root mean square*) previamente determinada, 10 pontos/década e um capacitor de 0,1 μF conectado entre o eletrodo de referência e um fio de platina. As medidas foram realizadas em solução tampão PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,5) aerada e contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1×10^{-3} mol L^{-1} . Todas as medidas de impedância foram realizadas em triplicata, temperatura ambiente e empregando uma gaiola de Faraday.

2.4.8 Monitoramento voltamétrico das modificações e imobilizações da superfície de trabalho do SPE

Para o monitoramento voltamétrico do SPE sem modificações (*bare*) e nas modificações (CYS e CYS-GA) e imobilizações (SAMs + proteína A e SAMs + proteína A + Ac) foi utilizado o intervalo de potencial de $-0,25$ a $+0,40$ V em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

2.4.9 Análise da superfície de trabalho (E_T - SPE) por microscopia eletrônica de varredura

A caracterização morfológica da superfície de trabalho sem qualquer modificação foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observar a rugosidade e a uniformidade da camada de pasta metálica sobre a matriz de cerâmica quanto à presença de espaços ou cavidades existentes após o processo de fabricação do eletrodo impresso. As medidas de microscopia foram realizadas com um feixe de elétrons de 20 kV de potência e ampliação de $700 \times$.

Para todas as etapas de modificações, imobilização do anticorpo monoclonal e imunoenensaio sobre a superfície de trabalho do transdutor, os tempos de incubação, seja à temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C}$) ou sob refrigeração ($4-8^\circ\text{C}$), ocorreram em câmara simulando atmosfera umidificada com o objetivo de evitar a evaporação do pequeno volume adicionado sobre a superfície de trabalho do transdutor. Um recipiente plástico contendo água foi colocado no centro da placa de Petri e ao redor os eletrodos impressos conforme mostra a Figura 21, simulando uma câmara úmida.



Figura 21. Esquema da simulação de câmara úmida. Placa de Petri com tampa tendo os SPEs em etapas de modificações e/ou imobilizações, contendo no centro tampa com água

CAPÍTULO III
RESULTADOS E DISCUSSÕES



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização da superfície do eletrodo de trabalho - SPE empregando técnica não-eletrólítica: microscopia eletrônica de varredura

A Figura 22 mostra a imagem topográfica da superfície (Au-Pd) do eletrodo de trabalho impresso (SPE) em que foram realizadas todas as modificações e imobilizações empregando microscopia eletrônica de varredura. A imagem indica uma superfície irregular e com alta rugosidade com o emprego da pasta metálica (Au/Pd) no processo serigráfico. Estas irregularidades e defeitos da superfície podem causar uma distribuição de corrente heterogênea, o que pode gerar uma maior complexidade na resposta eletroquímica.

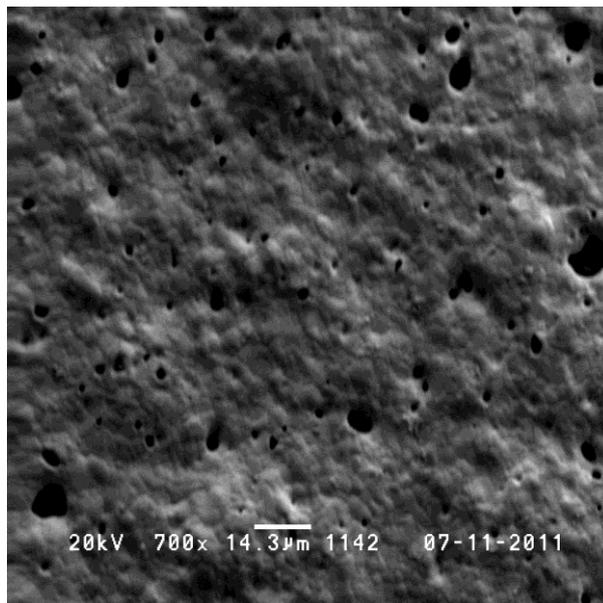


Figura 22. Imagem em microscopia eletrônica de varredura da superfície do eletrodo de trabalho (SPE) com ampliação de 700× obtida no Instituto de Química, UNESP, Campus de Araraquara.

3.2. Caracterização das SAMs, imobilizações da proteína A de *S. aureus* e anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* usando técnicas eletroquímicas

3.2.1 Voltametria cíclica

O processo de transferência de elétrons envolvendo as espécies $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ foi investigada sobre a superfície do eletrodo de trabalho (SPE) contendo as SAMs de CYS e CYS-GA e com as imobilizações da proteína A de *S. aureus* e do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* usando voltametria cíclica. A Figura 23 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos a 20 mV s^{-1} para o eletrodo não modificado (*bare*) e com modificações e imobilizações em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5).

Para o eletrodo de trabalho sem modificação (Figura 23a), foi obtido um típico voltamograma cíclico empregando o par redox ferri/ferro com um par de picos a $+0,04 \text{ V}$ (pico catódico) e $+0,18 \text{ V}$ (pico anódico), caracterizando um processo de transferência de elétrons quase-reversível. O processo de transferência de carga com ferro/ferricianeto nesta etapa ocorreu com uma área efetiva do eletrodo de $0,0056 \text{ cm}^2$. Essa área pode ser obtida a partir da equação de Randles-Sevcik (NICHOLSON e SHAIN, 1964) desde que conhecidos o número de elétrons, coeficiente de difusão e concentração da espécie eletroativa, velocidade de varredura do potencial e corrente de pico a uma dada temperatura.

A modificação do eletrodo impresso com CYS (Figura 23b) somente deslocou ambos os picos, catódico ($+0,03 \text{ V}$) e anódico ($+0,15 \text{ V}$), para valores menos positivos e com pequeno aumento na intensidade de corrente. Esta pequena distorção quando comparado com o eletrodo sem modificação sugere que a reação de transferência de elétrons ocorre sem um significativo efeito de barreira e que a cistamina não bloqueia totalmente a superfície do eletrodo. Isto significa que uma superfície com baixa cobertura foi provavelmente obtida e com fácil acesso das espécies eletroativas por difusão em áreas não modificadas da superfície eletródica. Baixa cobertura com cistamina sobre SPE Au/Pd foi previamente observado por FERREIRA et al., 2009. Outro fator que pode influenciar a cobertura da superfície com CYS é a presença de um excesso de cargas positivas sobre o amino grupo, devido ao pH da água (pH 6,5) durante a formação da SAM comparado com o pK_a da CYS (8,2). O excesso de cargas positivas pode contribuir para o aumento da repulsão lateral, na qual pode diminuir a cobertura da superfície. Outros resultados eletroquímicos sugerem a possibilidade de influência de cargas positivas sobre a cistamina e a difusão das espécies redox para as áreas não modificadas (FERREIRA et al., 2009).

Quando o glutaraldeído foi adicionado sobre a SAM de cistamina (Figura 23c), observou-se um pequeno decréscimo na intensidade de corrente dos picos do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ e um aumento na diferença de potencial entre os picos catódico (0,0 V) e anódico (+0,20 V). Este resultado sugere algum bloqueio na reação de transferência de elétrons e conseqüentemente uma perda na reversibilidade. A aplicação da equação de Randles-Sevcik forneceu valores de área iguais a 0,0065 e 0,0039 para os eletrodos impressos modificados com CYS e CYS-GA, respectivamente.

A Figura 23d mostra a imobilização da proteína A de *S. aureus* sobre as SAMs de CYS-GA. Os picos anódico ($\approx +0,24$ V) e catódico ($\approx -0,012$ V) não são bem definidos e ocorre um aumento de separação entre os mesmos. Esta é a indicação de um maior impedimento na transferência de cargas envolvendo as espécies redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Quando a proteína A foi adicionada sobre as monocamadas (CYS-GA), uma densa camada foi provavelmente formada através da ligação covalente entre o grupo aldeído terminal da SAM de glutaraldeído e o grupo NH_2 da proteína, inibindo o processo Faradáico.

Com a imobilização do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* (Figura 23e), o voltamograma tende a uma forma sigmoideal, o que mostra um maior bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho. Observa-se uma maior separação dos picos anódico ($\approx +0,28$ V) e catódico ($\approx -0,045$ V), o que é indicativo de uma baixa reação de transferência de carga.

Os resultados obtidos mostraram que a voltametria cíclica tradicional é adequada para o estudo envolvendo as diferentes etapas de construção do imunossensor.

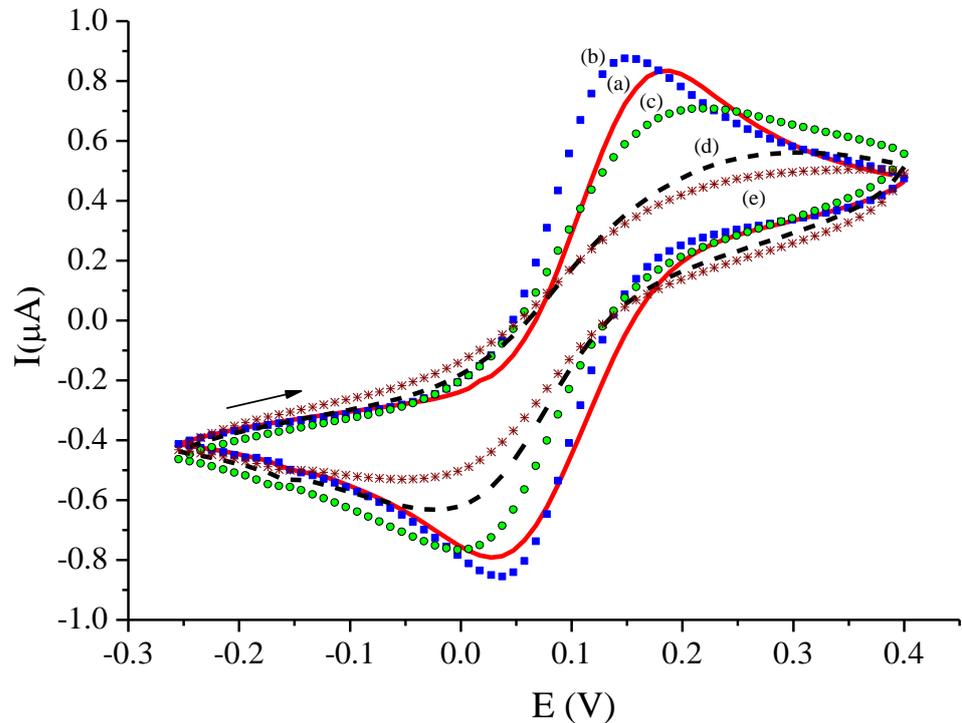


Figura 23. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos SPE em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} 1 x 10⁻³ mol L⁻¹, sobre eletrodo de trabalho não modificado (a), e o eletrodo modificado com CYS (b), CYS-GA (c), CYS-GA-Proteína A (d) e CYS-GA-Proteína A - Ac (e). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%); A_{geom} = 0,0070 cm²; v = 20 mV s⁻¹. Eletrodo de referência: Ag-Pd (98/2%).

3.2.2 Estudos de impedância eletroquímica

Antes da aquisição dos espectros de impedância, os potenciais de circuito aberto para o eletrodo de trabalho sem modificação (*bare*) e nas diferentes etapas de modificações na presença do par redox foram observados e o potencial de estabilização foi ao redor de +0,120 V. Inicialmente foram realizadas medidas de impedância do eletrodo sem modificação, para posterior análise dos resultados de impedância com os eletrodos impressos modificados. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

A Figura 24 mostra os diagramas de impedância no plano complexo ($-Z_i$) versus (Z_r) para o eletrodo sem modificação e com a proteína A adicionada diretamente na superfície do eletrodo de trabalho na presença do par redox

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. O inserto da Figura 24 corresponde à ampliação dos resultados de impedância para o eletrodo sem modificação. Observa-se na Figura 24a a presença de um semicírculo seguido de um prolongamento linear com um ângulo ao redor de 40° , onde o raio do semicírculo representa o processo cinético de transferência de elétrons e a reta caracterizando o processo difusional das espécies eletroativas. O eletrodo modificado com proteína A diretamente sobre a superfície (E_T) na diluição 1:20 e com tempo de incubação por 2 h (Figura 24b), houve um aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo. Com o mesmo procedimento de modificação da superfície eletródica com a proteína A na diluição 1:10 direto e com tempo de incubação de 2 h (Figura 24c), verifica-se que um aumento da impedância, o que mostra um maior bloqueio da superfície à transferência de elétrons. Com o intuito de garantir uma melhor imobilização da proteína A na superfície metálica foi investigado o comportamento impedimétrico com a diluição 1:20 e tempo de incubação 12 h (*overnight*) (Figura 24d). Os resultados mostraram um aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo em comparação com o tempo de incubação de 2 h (Figura 24b). Neste caso o aumento de resistência na transferência de elétrons na presença das espécies redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ mostra uma maior cobertura da superfície do eletrodo, o que não garante a permanência da camada protéica nas etapas subsequentes de construção do imunossensor.

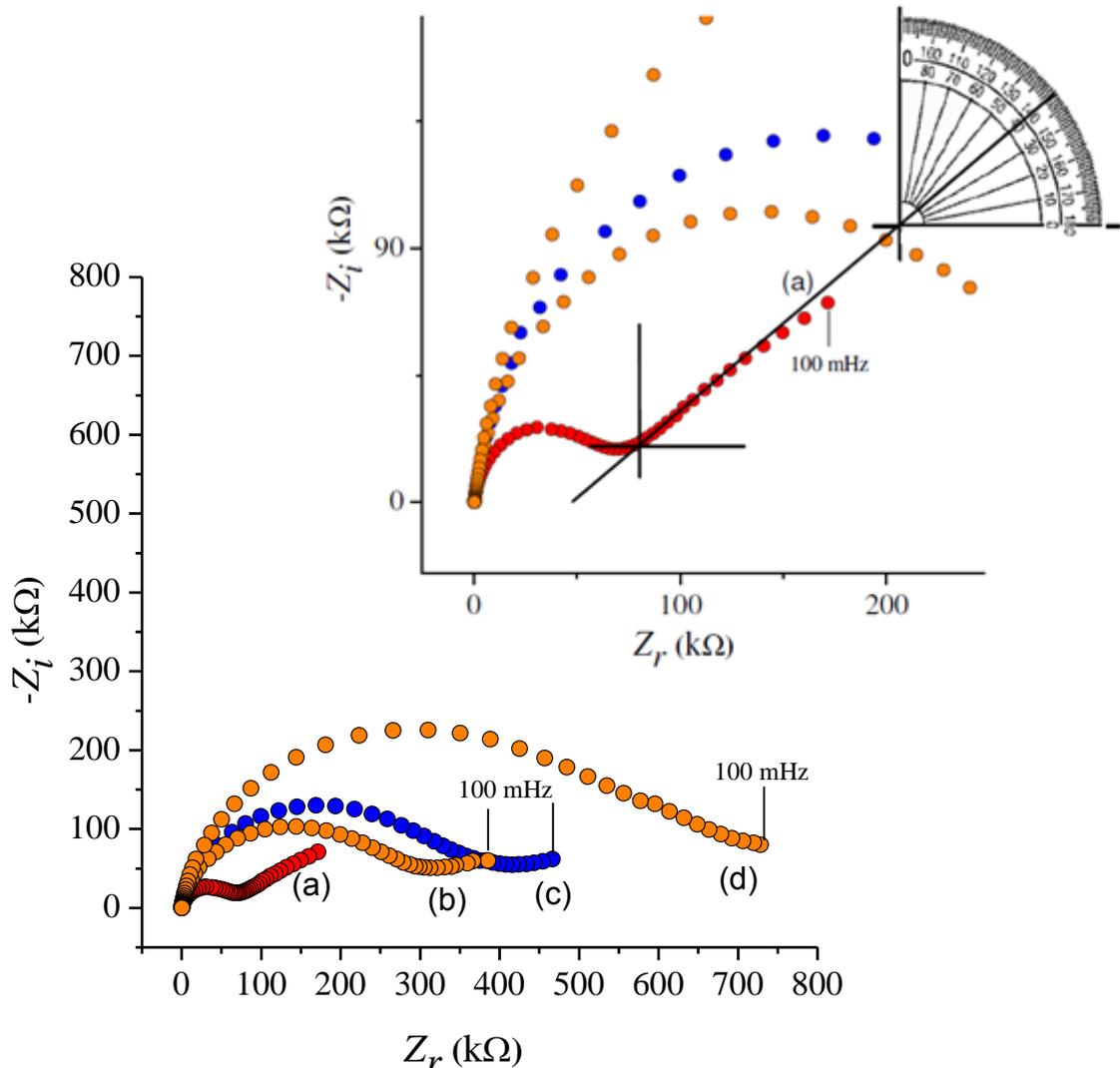


Figura 24. Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado, sem SAM, com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempos de incubação de 2 h (b) e 12 h (d) e na diluição de 1:10 com tempo de incubação de 2 h (c) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%). Inseto: ampliação dos resultados de impedância para o eletrodo sem modificação.

A proteína A é um componente da parede celular do *S. aureus* que se liga com a parte F_c das moléculas de imunoglobulinas G (IgG) de muitas espécies de mamíferos. A vantagem da utilização da proteína A para posterior imobilização do anticorpo é uma orientação adequada que ela proporciona ao Ac que vai se ligar a sua superfície. Quando imunoglobulinas como IgG são imobilizadas em superfícies

sólidas sua atividade geralmente é diminuída sendo que a principal razão é uma imobilização com orientação aleatória. Portanto, a imobilização de Ac mediada pela proteína A leva a imunorreações altamente eficientes o que aumenta o desempenho do sistema utilizado.

As interações eletrostáticas podem ser consideradas um fator importante para adsorção das proteínas juntamente com o pH da solução e forças iônicas. A proteína A possui entre suas características um ponto isoelétrico (pI) que é de 5,1 ponto este onde há um equilíbrio entre suas cargas elétricas (LINDMARK, MOVITZ, SJÖQUIST, 1977). Interações eletrostáticas e outros tipos de ligações fracas fazem com que as proteínas tendam a se agregar e precipitar quando estão no seu pI. Assim sendo, a adsorção de proteínas por interações eletrostáticas é mínima quando o pH da solução utilizada é próximo ao seu ponto isoelétrico porque o aumento na força iônica da solução bloqueia as cargas da proteína e da superfície reduzindo a adsorção (NATH et al., 2004). Os resultados de impedância apresentados na Figura 24 mostraram a adsorção da proteína A na superfície de ouro nas diferentes diluições em solução tampão salino fosfato 0,1 ml L⁻¹ (pH 7,5). A presença de aminoácidos que apresentam em sua estrutura o elemento químico enxofre (Figura 25) é de fundamental importância para garantir a interação da proteína A com o substrato ouro. A proteína A de *S. aureus* apresenta pouca quantidade de aminoácidos metionina na estrutura molecular (UHLÉN et al., 1984), o que pode significar uma fraca adsorção e um provável processo de lixiviação.

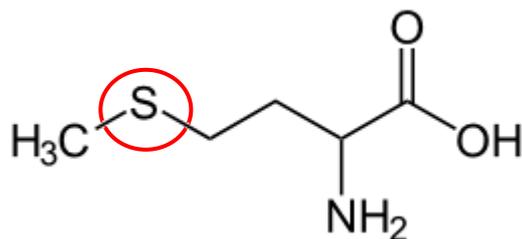


Figura 25. Estrutura da molécula de metionina e o enxofre de sua composição.

A Figura 26 mostra os resultados de impedância para as diferentes diluições 1:10 (Figura 26a) e 1:20 (Figura 26b) da proteína A e com tempo de incubação de 2 h. A indicação do processo de lixiviação da proteína A da superfície de ouro pode

ser observado com os resultados de impedância em que os anticorpos monoclonais anti-*S. aureus* na diluição de 1:50 e com tempo de incubação de 2 h foram imobilizados sobre a camada protéica (Figura 26c e 26d). A diminuição da impedância real e imaginária do arco capacitivo em ambos os casos indica que durante a etapa de lavagem da superfície do eletrodo de trabalho, após o tempo de incubação com os anticorpos, foi determinante para o desprendimento da proteína A e/ou proteína A-Ac.

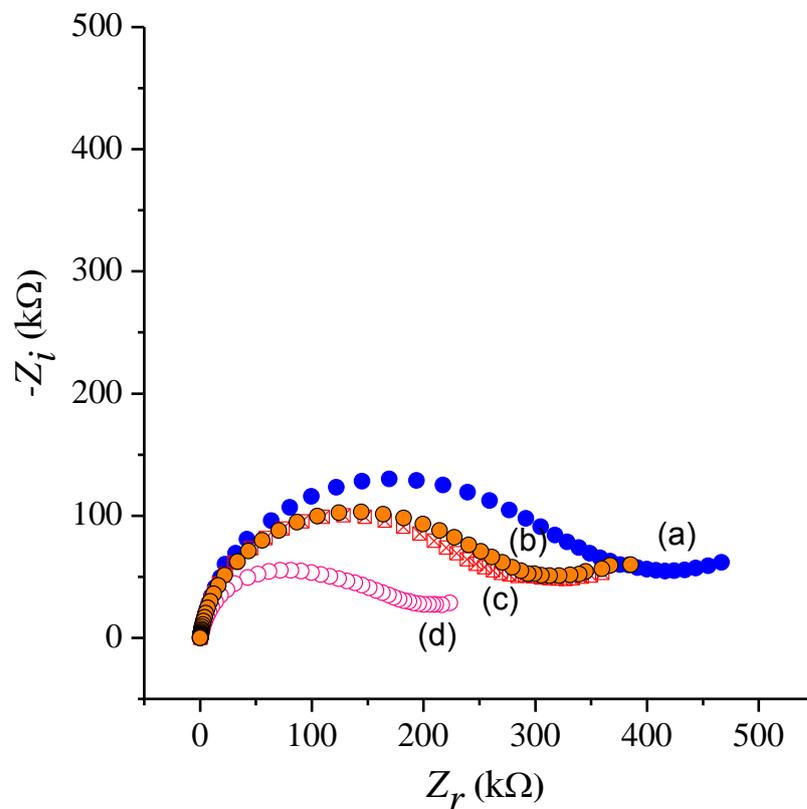


Figura 26. Diagramas no plano complexo em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodo impresso modificado diretamente com a proteína A nas diluições de 1:10 (a) e 1:20 (b) e com tempo de incubação de 2 h; imobilização do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* na diluição de 1:50 e com o tempo de incubação de 2 h sobre a superfície de ouro contendo a proteína A adicionada diretamente nas diluições de 1:10 (c) e 1:20 (d). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).

A imobilização de anticorpos monoclonais anti- *S. aureus* sobre a proteína A ocorre devido a uma interação entre a porção F_c do anticorpo com a porção NH₂-terminal da proteína. O domínio da proteína A que se liga com a IgG consiste de três α -hélices anti-paralelas, sendo que a terceira se rompe quando a proteína é complexada com a região F_c da IgG. Na Figura 27 pode-se observar um modelo molecular de IgG1 humana onde os resíduos possuem cores diferentes para melhor ilustrar as características da molécula.

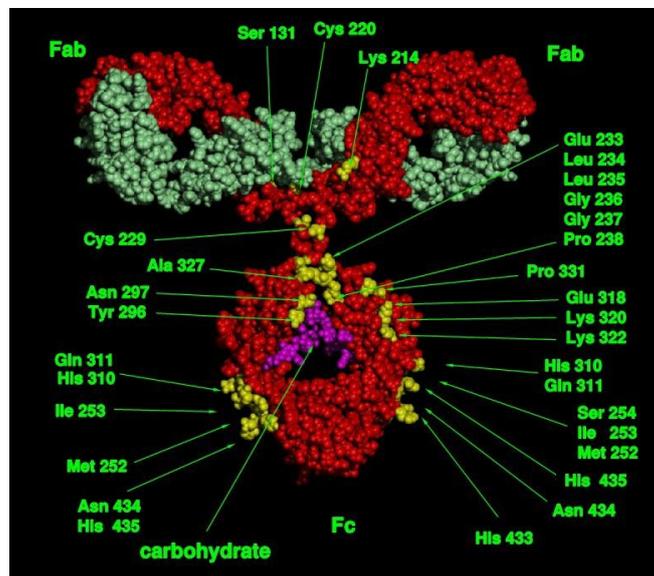


Figura 27. Representação de modelo molecular de resíduos funcionais de IgG humana. Disponível em: <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/functions/ig1func.html>

A Figura 28 é uma representação molecular do sítio de ligação da porção F_c, em cor vermelho, de uma IgG humana para a proteína A, em cor verde, correspondendo a interface entre os domínios CH₂ e CH₃ da porção F_c.

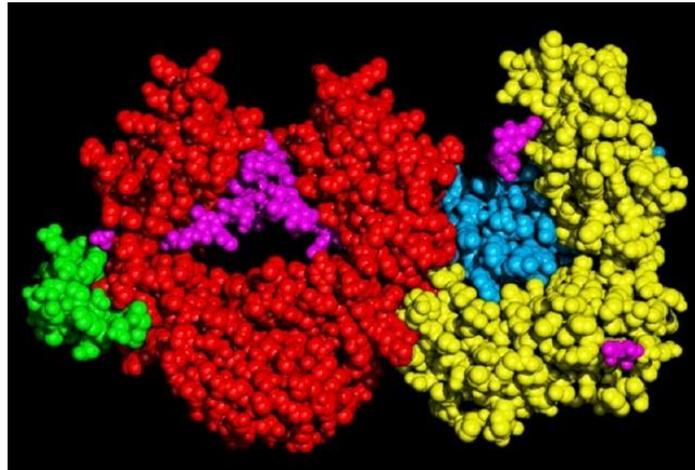


Figura 28. Modelo molecular da porção F_c da IgG (vermelho) se ligando com a proteína A (em verde). Disponível em: <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/functions/fcrnpa.jpg>.

A Figura 29 está representando esquematicamente as modificações e imobilizações realizadas no eletrodo e caracterizadas eletroquimicamente na Figura 23.

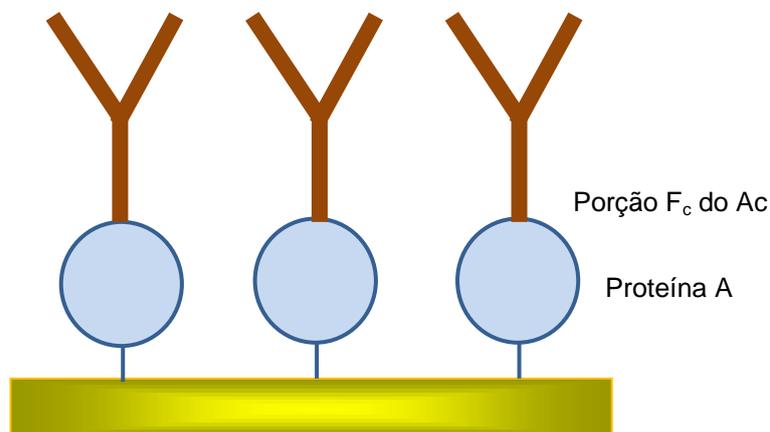


Figura 29. Representação esquemática da ligação da proteína A com a superfície do eletrodo (E_T) e desta com a porção F_c do anticorpo.

Com base nos resultados de impedância mostrados nas Figuras 23 d e 30a em que a proteína A foi adicionada diretamente na superfície de ouro na diluição de 1:20 e incubação de 12 h, diferentes tempos de incubação e diluição de 1:20 para os

anticorpos anti-*S.aureus* foram estudados. Para os tempos de incubação dos anticorpos de 3 e 6 h, Figuras 30c e 30b, respectivamente, não se observou diferenças significativas entre os resultados de impedância. Diferença expressiva ocorreu entre os arcos capacitivos correspondentes aos anticorpos imobilizados nos diferentes tempos de incubação e o que contém somente a proteína A imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho. O decréscimo nos valores de impedância é indicativo do processo de lixiviação da proteína A e conclui-se que a imobilização direta da proteína A não é o melhor procedimento analítico para o desenvolvimento do imunossensor. Assim, uma nova metodologia para a imobilização da proteína A passa a ser estudada empregando monocamadas auto-organizadas (SAMs).

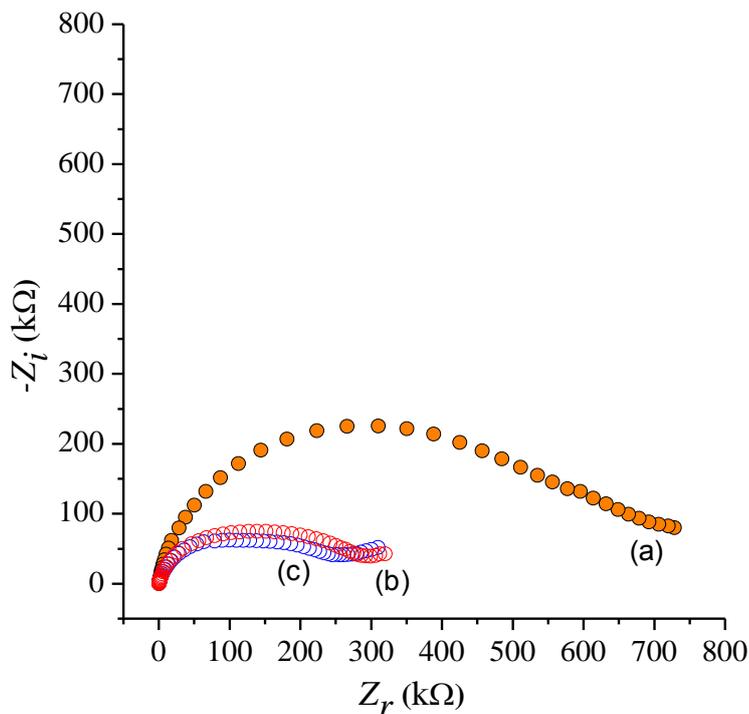


Figura 30. Diagramas no plano complexo em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) na presença do par redox Fe(CN)₆^{3-/4-} 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ para eletrodo impresso modificado diretamente com a proteína A na diluição de 1:20 e com tempo de incubação de 12 h (a); imobilização do anticorpo monoclonal anti-*S. aureus* nas diluições de 1:20 sobre a superfície de ouro contendo a proteína A adicionada diretamente com tempos de incubação de 6 (b) e 3 h (c). Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).

Utilizou-se cistamina para modificação do eletrodo de trabalho nas concentrações de 4×10^{-2} e $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, para avaliar o melhor recobrimento da superfície. Conforme observado na Figura 31 e na ampliação da região referente às altas frequências, os resultados de impedância para as concentrações de cistamina 4×10^{-2} (Figura 31b) e 2×10^{-2} (Figura 31c) mostraram-se similares. Verifica-se um pequeno arco capacitivo em altas a médias frequências e um processo difusional acentuado para ambas as superfícies recobertas com SAM CYS. A modificação com CYS apresentou um padrão difusional de transferência de elétrons bem significativo o que pode ser justificado pela formação de uma camada com irregularidades ou defeitos permitindo assim a transferência de elétrons.

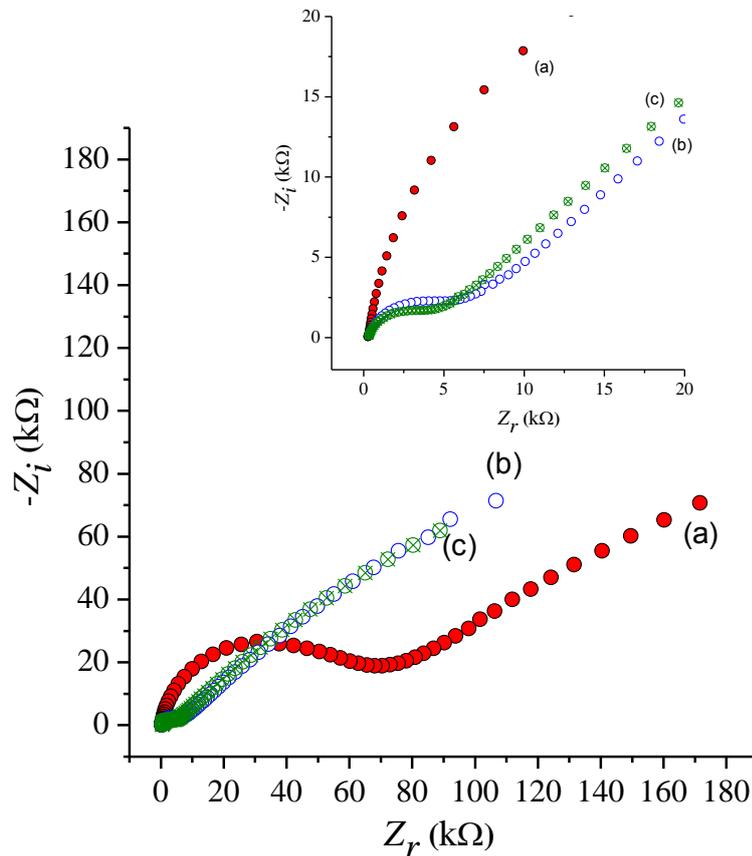


Figura 31. Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a), modificado com cistamina nas concentrações de 4×10^{-2} (b) e $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (c) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%). Inseto: ampliação dos resultados na região de altas frequências.

As ligações da cistamina com a superfície do ouro é do tipo tiol onde o átomo de enxofre forma ligações Au–S, ficando seus grupos amino livres ativos para ligações com outros grupos da monocamada. Estas ligações podem levar a formação de cadeias carbônicas curtas e espaçadas resultando uma monocamada com pouco grau de organização o que justifica a diminuição da impedância observada na Figura 31(b) e (c). Isto sugere que a reação de transferência de elétrons ocorre como se não houvesse uma barreira de espessura significativa e que a CYS não está bloqueando totalmente a superfície do eletrodo favorecendo um processo de difusão das espécies eletroativas permitindo a passagem das mesmas para superfície do eletrodo através das áreas não recobertas. A presença de um excesso de cargas positivas sobre o amino grupo também contribui para a diminuição da impedância real e imaginária do arco capacitivo (FERREIRA et al., 2009).

A cistamina é um dissulfeto, portanto possui dois átomos de enxofre ligados entre si, como mostra a Figura 32, tendo nas outras extremidades o grupo amina (NH_2). Quando há imobilização da cistamina, ocorre o rompimento das ligações S-S e cada enxofre será adsorvido na superfície do eletrodo, isto se dá devido a alta afinidade do enxofre pelo Au.

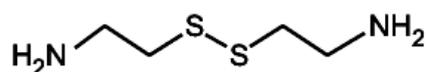


Figura 32. Estrutura da molécula de cistamina

O átomo de enxofre da molécula propicia a ligação de uma cadeia de hidrocarbonetos de comprimentos variados à superfície do metal, o que pode ocorrer por ligações covalentes, enquanto que a estabilização da estrutura das moléculas vizinhas ocorre por interações de van der Waals, conforme mostra a Figura 33.

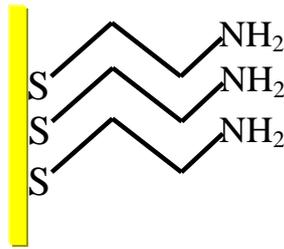


Figura 33. Representação esquemática da superfície de ouro com monocamada de cistamina (CYS) clivada

Quando o GA é adicionado sobre a monocamada de CYS o grupo carbonila do GA reage com o grupo amina da CYS ficando o outro grupo carbonila (GA) livre na superfície, conforme observado na Figura 34. O GA em solução tampão tem seu pH reduzido sugerindo que os grupos aldeídos do GA adquirem cargas negativas e reagem com a CYS através da formação da base de Schiff (HAYAT, 2000).

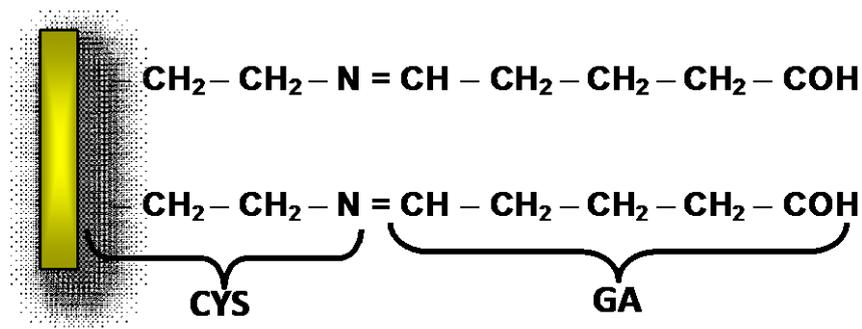


Figura 34. Representação esquemática da ligação CYS-GA à superfície do ouro. Adaptado de: Ferreira; Yamanaka; Benedetti, 2007.

A Figura 35 (a - g) mostra as etapas de construção do imunossensor e imunoensaio na presença do analito (*S. aureus*). Na modificação do eletrodo com CYS, incubação por 2 h, (Figura 35b) e CYS-GA (Figura 35c) verificou-se um comportamento representado inicialmente por um semicírculo típico da resistência de transferência de elétrons seguido de um processo difusional.

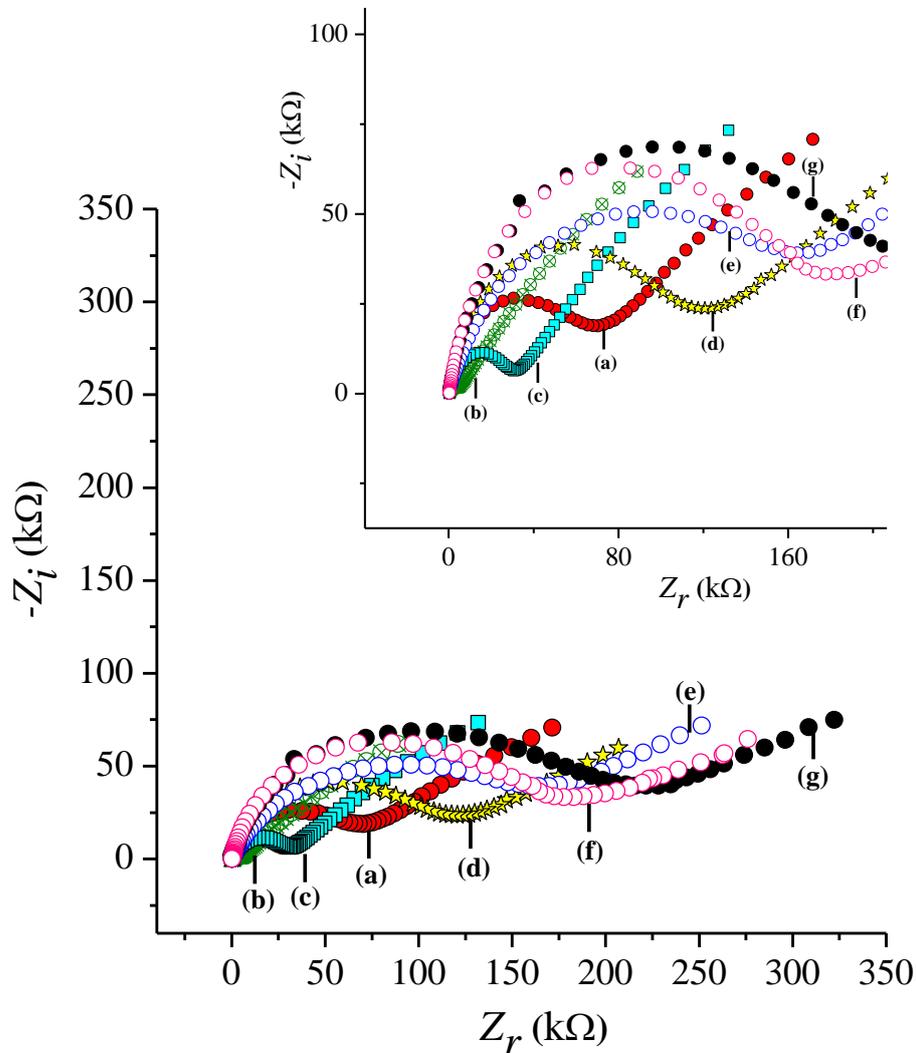


Figura 35. Diagramas no plano complexo para eletrodo impresso sem modificação (a) e nas modificações com CYS $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (b), CYS-GA (c), imobilizações da proteína A sobre a SAM de cistamina via glutaraldeído (d) e anticorpo sobre a proteína A (e), bloqueio da superfície de trabalho com SAB (f) e imunoenensaio antígeno-anticorpo na superfície do transdutor (g) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) na presença do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho: Au-Pd (98/2%).

A imobilização da proteína A (Figura 35d) sobre o eletrodo modificado com CYS-GA mostrou um aumento de impedância bem caracterizado em comparação

aos recobrimentos com as SAMs. Na interação GA - proteína A, os grupos amino da proteína se ligam com o grupo aldeído do GA através da formação de base de Schiff. Entre os fatores que influenciam a interação GA – proteína A, o pH é considerado um dos mais importantes. O aumento do pH geralmente aumenta a capacidade de ligação do GA, ou seja um aumento na concentração de íons-H acelera a ligação do GA, sendo que o pH considerado ideal para ligações com proteínas é 7,5 a 8,0, um pouco superior ao fisiológico que é entre 7,2 a 7,4 (HAYAT, 2000).

O eletrodo modificado com CYS-GA-proteína A, no qual se imobilizou os anticorpos anti-*S. aureus* apresentou um aumento da impedância real e imaginária do arco capacitivo, o que representa um maior grau de resistência a transferência de elétrons (Figura 35e). O resultado de impedância foi significativo com o bloqueio com soroalbumina bovina (Figura 35f). A principal finalidade deste bloqueio é preencher as irregularidades da superfície após as modificações evitando assim as reações inespecíficas no imunoensaio. No estudo preliminar empregando *S. aureus* como antígeno específico para o anticorpo monoclonal, observou-se um significativo aumento do arco capacitivo, o que mostra a ocorrência da interação antígeno-anticorpo (Figura 35g). Novos imunoensaios serão de fundamental importância para assegurar os resultados do imunossensor impedimétrico.

Na etapa de aplicação do imunossensor em amostras contendo *S. aureus*, a reação de afinidade antígeno (analito) - anticorpo envolve as regiões determinantes de complementaridade ou CDRs (*complementarity determining regions*) conforme mostra a Figura 36. Na porção N-terminal dos anticorpos localizam-se os fragmentos F_{ab} onde se encontram os dois sítios de ligação (CDRs) ao antígeno as quais se ligam por complementaridade ao epítipo do antígeno. Esta região hipervariável forma cinco ou seis alças que compreendem um total de cerca de cinquenta resíduos de aminoácidos, os quais participam na formação do paratopo da molécula de Ig. Assim, o paratopo é constituído de peptídeos contendo aminoácidos que são complementares àqueles que são constituintes do epítipo do antígeno. A maior força que atua na atração primária entre epítopos e paratopos são as interações hidrofóbicas e eletrostáticas (VAN REGENMORTEL; ALTSCHUH, 2002).

A Figura 36 representa o processo de interação Ag-Ac, no qual ocorrem múltiplas reações químicas, não covalentes, sendo individualmente fracas (ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações hidrofóbicas,

conforme representado na Figura 6), mas em conjunto vão conferir uma força de coesão considerável. As reações seguem um padrão onde a molécula se amolda a outra por mecanismo de indução. Há uma complementaridade entre os sítios de ligação específicos e um encaixe entre as moléculas.

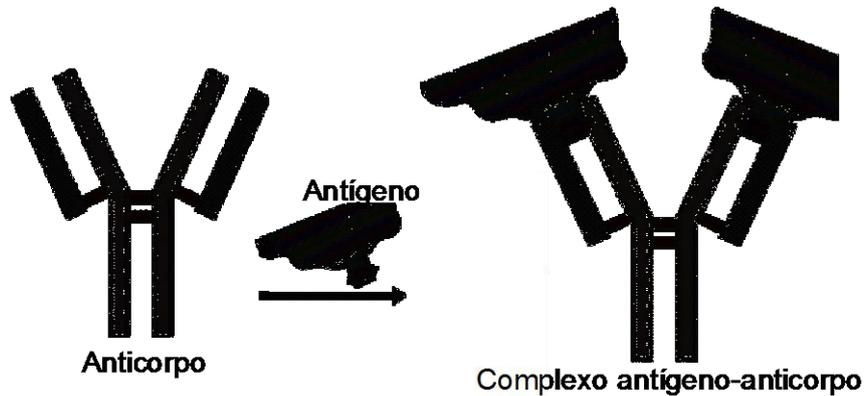


Figura 36. Ligação da IgG com o antígeno. Adaptado de: Nelson; Cox (2008). In: Lehninger Principles of Biochemistry.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES



4. CONCLUSÕES

Imunossensor impedimétrico para detecção de *S. aureus*, em áreas críticas hospitalares (Centro Cirúrgicos e Unidades de Terapias Intensivas - UTIs) foi desenvolvido neste trabalho. Optou-se pela utilização de eletrodos impressos (SPE) devido ao baixo custo, praticidade, fácil operacionalização, descartável e a facilidade de miniaturização. Vários experimentos eletroquímicos (EIE e VC) e não eletroquímicos foram realizados durante a construção do imunossensor.

A imobilização direta da proteína A sobre a superfície do eletrodo de trabalho impresso não mostrou ser um procedimento analítico adequado para o desenvolvimento do imunossensor, principalmente quando os anticorpos anti-*S. aureus* foram imobilizados sobre a camada protéica em que se observou um decréscimo nos valores de impedância indicando um processo de lixiviação da proteína A. Com base nos resultados obtidos, optou-se pela imobilização da proteína A empregando monocamadas auto-organizadas (SAMs).

Estudos voltamétricos mostraram que a utilização da SAM de cistamina não proporciona um bom recobrimento da superfície eletródica. Um maior grau de resistência na transferência de elétrons, caracterizando um maior recobrimento da superfície do eletrodo, foi observado nas etapas subsequentes da construção do imunossensor quando o eletrodo modificado com CYS-GA, proteína A, imobilização dos anticorpos anti-*S. aureus* e bloqueio com BSA.

As medidas EIS e VC mostraram os melhores resultados com SAM CYS $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e GA 2,5% com tempos de incubação de 2 e 1 h, respectivamente; imobilizações da proteína A 1:20 (*overnight*) e Ac monoclonais anti-*S. aureus* ($t_{\text{incub}} = 3 \text{ h}$) e etapa de bloqueio com SAB 0,5% ($t_{\text{incub}} = 1 \text{ h}$).

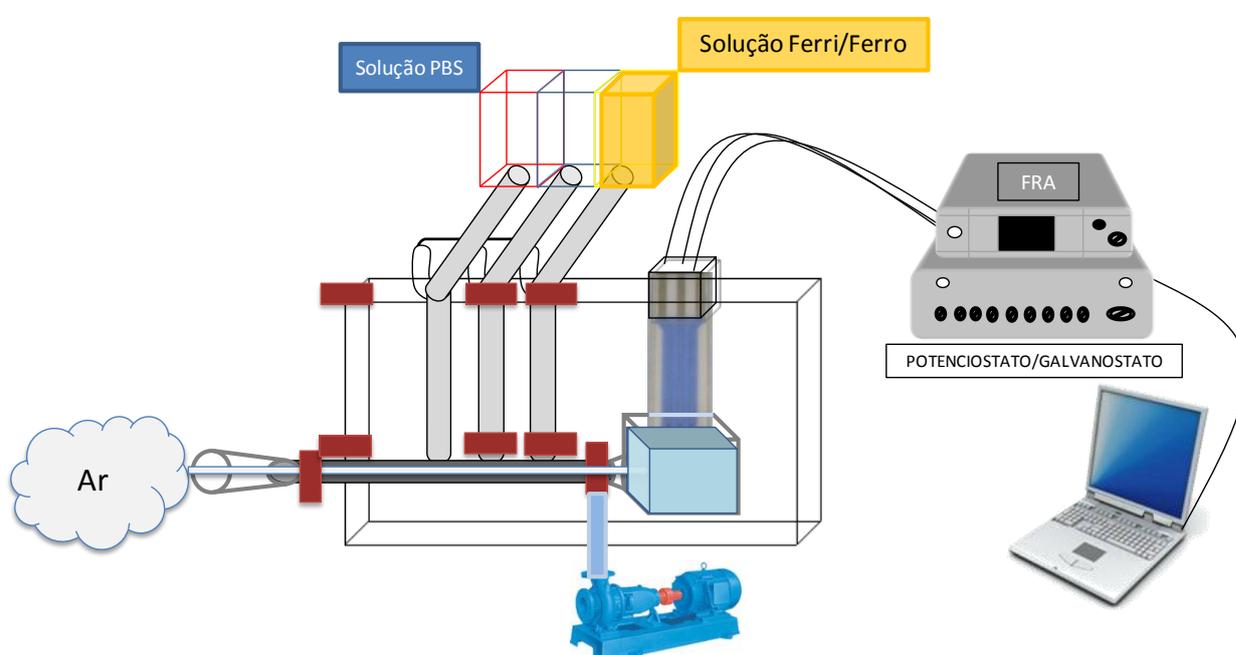
Na reação de imunoensaio, em estudo preliminar, utilizou-se *S. aureus* como antígeno específico para o anticorpo monoclonal. A interação antígeno-anticorpo foi observada por medida de impedância a qual apresentava um significativo aumento do arco capacitivo. Outros imunoensaios serão de fundamental importância para assegurar os resultados do imunossensor impedimétrico.

O imunossensor impedimétrico deverá atuar como uma ferramenta analítica de fundamental importância para detecção de *S. aureus* em áreas críticas hospitalares (Centros Cirúrgicos e UTIs).

Com a possibilidade de detecção de bactérias em ambientes críticos hospitalares as Comissões e órgãos responsáveis pelo Controle da Infecção Hospitalar podem monitorar a efetividade das medidas preventivas e de biossegurança que estão sendo aplicadas nestes ambientes e em casos de contaminação poder revê-las e adequá-las.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos, outros experimentos deverão ser realizados dentro do processo de otimização da metodologia analítica para melhor garantir a eficiência do imunossensor impedimétrico. A construção da parte eletrônica do dispositivo, conforme mostra a Figura abaixo, com coleta de amostras de ar será fundamental para a implantação tecnológica. Novas perspectivas também são colocadas no desenvolvimento do imunossensor para detecção de outras bactérias patogênicas do âmbito hospitalar.



CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABBAS, A. K. e JANEWAY Jr., C. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell.**, v.100, p.129–138, 2000.

_____; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6th ed. Elsevier. 2008.

ALBERTS, B; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. Garland Science. United State of America. 2007. 1566 p.

ALEXANDER, L. L. **Nosocomial Infections**. 72 f. CME Resource. California. 15 jan 2010. Disponível em: < http://www.netcegroups.com/372/Course_9447.pdf>. Acesso em: 3 set 2011.

ANVISA. Resolução RDC n° 50 de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 21 fev 2002. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/50_02rdc.pdf> Acesso em: 22 ago. 2011a.

_____. Resolução RDC n° 189 de 18 de julho de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, altera o Regulamento técnico aprovado pela RDC n° 50 de 21 de fevereiro de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 jul 2002. Disponível em < <http://pnass.datasus.gov.br/documentos/normas/75.pdf> > Acesso em: 22 ago.2011b.

_____. Resolução RE n° 9 de 16 de janeiro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 16 jan 2003. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/09_03_1.pdf > Acesso em: 30 ago. 2011c.

_____. **Apostila de Segurança no ambiente hospitalar**. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_hosp.pdf. Acesso em < 28 set. 2011 d. 172 f.

APODACA, F. O. O. **Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapêutica**. 148 f. Apresentação para ingresso como Acadêmico do Instituto de España Real Academia Nacional de Farmacia. Espanha. 2006.

ARENA, F. A. **Estudos físico-químicos e de lixiviação de calcopirita (CuFeS₂) por acidithiobacillus ferrooxidans**. 106 f. Dissertação (Mestre em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

AZEVEDO, G. G. Microbiota endógena humana e a importância do Projeto Microbioma Humano. **Boletim do PET**, n.12, p.1-13, jun 2010. Disponível em: < http://pet.ufma.br/biologia/images/PDF/boletim_junho_12.pdf>. Acesso em: 01 set 2011.

BABACAN, S.; PIVARNIK, S.; LETCHER, S.; RAND, A. G. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. **Biosens. Bioelectron.** v.15, p. 615–621, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.182 p.(Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_gerenciamento_residuos.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2011a.

_____. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 2.616 de 12 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição à Portaria MS 930/92. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 13 mai 1998. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm >. Acesso em: 23 ago. 2011b.

_____. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 930 de 27 de agosto de 1992. Expede, na forma dos anexos, normas para o controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 27 ago 1992. Disponível em: < file: ///F: /IH/Anvisa%20Legislação%20-%20Portarias.htm > Acesso em: 23 ago 2011c.

_____. Lei nº 9.431 de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção do programa de controle de infecção hospitalar (PCIH) e criação de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) para execução deste controle. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 06 jan 1997. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis/leis/9431_97.htm >. Acesso em: 23 ago 2011d.

_____. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº. 3523 de 28 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico contendo medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção de sujidades por métodos físicos e manutenção do estado de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a Qualidade do Ar de Interiores e prevenção de riscos à saúde dos ocupantes de ambientes climatizados **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 31 ago 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/3523_98.htm>. Acesso em: 31 ago 2011e.

BIDMANOVÁ, S. **Development and Construction of Biosensors for Detection of Halogenated Compounds in the Environment**. 75 f. Tese (Specialization in Microbiology) - Masaryk University, Faculty of Science .Brno. 2007.

BRETT, A. M. O.; BRETT C. M. A. **Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações**. Livraria Almedina. Coimbra. 1996.

BRICKUS, L. S. R.; AQUINO NETO, F. R. A qualidade do ar de interiores e a química. **Quim. Nova**, v.22, n.1, p.65-74. 1999.

CASTRO-ORTIZ, L. P.; PABELLO, V. M. L.; PIETRINI, R. V. Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. **Rev. Int. Contam. Ambient.**v. 23 n.1, p. 35-45. 2007.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosens. Bioelectron.** v. 17, p.441–456, 2002.

CHOU, L.C.S. **Development of a glucose sensor using screen-printing and electrophoretic deposition.** 130 f. Tese (Doctor of Philosophy) - School of Graduate Studies - Case Western Reserve University. Cleveland. 2011.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. N. Y. Acad Sci.** v. 102, p.29-45, 1962.

COOPER, J. M.; CASS, A. E. G. **Biosensors.** 2nd ed. Oxford University Press. United States. 2004. 268 f.

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J., BURTON, R. D., ROITT, I. M. **Roitt's essential immunology.** 11nd ed. Blackwell.. United States. 2006. 496 f.

DUGAS, V., ELAISSARI, A., CHEVALIER, Y. Surface sensitization techniques and recognition receptors immobilization on biosensors and microarray. In: ZOUROB, M., ELWARY, S., KHADEMHOSEINI, A. **Recognition receptors in biosensors.** Springer-Verlag. New York. 2010. 849 f.

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. Chemically Modified Electrodes. In: ZOSKI, C. G. **Handbook of Electrochemistry.** Elsevier. Netherlands. 2007. p.295-327.

ELGERT, K. D. **Immunology: understanding the immune system.** John Wiley and Sons. New Jersey. 2009. 726 f.

ESCAMILLA-GÓMEZ, V.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation **Biosens. Bioelectron.** v.24, p.3365–3371, 2009.

FÄHNRIK, K. A. **Development of disposable immunosensors for polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and Development of a novel immunosensor system based on electrogenerated chemiluminescence (ECL) detection.** 440 f. Dissertação (Doctor of Philosophy) - National University of Ireland Cork. Cork, Ireland. 2002.

FELIZARDO, K. R. Sistema de Coleta de Dados para Microbalanças de Quartzo. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas,** Londrina, v. 27, n. 2, p. 157-162, jul./dez. 2006

FERREIRA, A. A. P. **Desenvolvimento de imunossensor para doença de Chagas.** 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2002.

_____; FUGIVARA, C. S.; BARROZO, S.; SUEGAMA, P. H.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **J. Electroanal. Chem.** v. 634, p.111–122, 2009.

_____, YAMANAKA, H., BENEDETTI, A.V. Estudos voltamétricos sobre eletrodo de ouro com monocamada de cistamina e glutaraldeído para o desenvolvimento de sensores. **Ciência e Cultura.** v. 2, n.2, p.11-17, 2007.

FIALHO, A. C. V., ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; ALMEIDA, C. L.; FERREIRA, A. A. P.; SOUSA, C. P. **Biossegurança na área de saúde: uma abordagem interdisciplinar**. São Carlos-SP. EDUFSCar. 2011. 87 f.

FOSTER, T. J., HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**. v.6, n.12, p.484-488, 1998.

FREIRE, R. S., PESSOA, C. A., KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, v. 26, n.3, p. 381-389, 2003.

GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. 143 f. Tese (Doutor em Ciências, Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

GASPAR, C. H. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de nanopartículas metálicas com proteínas e suas aplicações em biossensores**. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Microeletrônica e Nanotecnologias) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

GIFFORD, E.L. **Sensitivity control of optical fiber biosensors utilizing turnaround point long period gratings with self-assembled polymer coatings**. 178 f. Dissertação (Doctor in Chemical and process Engineering) - Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Química. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2008.

GIROTTI, E. M., De PAOLI, M- A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. **Quim. Nova**, v.22, n.3, p.358-368, 1999.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. (Review). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p.1400-1458, 2008.

GUILBAULT, G. G., MONTALVO J. Urea specific enzyme electrode. **J Am. Chem. Soc.** v.91, p.2164. 1969

HAYAT, M. A. **Principles and techniques of electron microscopy: biological applications**. 4nd ed. USA. Cambridge University Press. 2000.

HAMBREUS, A. Transfer of *Staphylococcus aureus* via nurses' uniforms. **J. Hyg., Camb.** v. 71, p.799-814, 1973.

HERNÁNDEZ, F. J. **Design of biosensors exploiting conformational changes in biomolecules**. 123 f. Tese (Doctor of Philosophy in Physics) - Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 2008.

HLELI, S.; MARTELET, C.; ABDELGHANI, A.; BURAI, N.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.113, n.2, p.711- 717, 2006.

HIRATA, H. H.; MANCINI FILHO, J. **Manual de Biossegurança**. Ed. Manole. São Paulo. 2008.

HORÁČEK, J.; SKLÁDAL, P. Improved direct piezoelectric biosensors operating in liquid solution for the competitive label-free immunoassay of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. **Anal. Chim. Acta**, v. 347, n. 1-2, p. 43-50, 1997.

HULANICKI, A.; STANISLAW, G.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification – **Pure & Appl. Chern.**, v. 63, n.9, p. 1247-1250, 1991. Great Britain. IUPAC. Disponível em <<http://www.iupac.org/publications/pac/1991/pdf/6309x1247.pdf>>. Acesso em: 12 mai 2011.

JIANG, X.; LI, D.; XU, X.; YING, Y.; LI, Y.; YE, Z.; WANG, J. Review. Immunosensors for detection of pesticide residues. **Biosens. Bioelectron.** v. 23, p.1577–1587, 2008.

JOSHI, R. M. **Biosensors**. Isha Books. Índia. 2006.

KRAMER, M. **Protein engineering of pyruvate oxidase from lactobacillus plantarum for application in biosensor**. Tese (Doctor of Natural Science) - Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich. 2008.

LACERDA, R. A. **Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsias**. São Paulo. Atheneu Editora. 2003.

LIEDBERG, B., NYLANDER, C. and LUNSTROM, I. Surface Plasmon resonance for gas detection and biosensing. **Sensor and Actuators**. v. 4, p. 299-304, 1983.

LIM, D. V. Detection of Microorganisms and Toxins with Evanescent Wave Fiber-Optic Biosensors. **Proceedings of the IEEE**, v. 91, n.6, p.902-907, 2003.

LINDMARK, R.; MOVITZ, J.; SJÖQUIST, J. Extracellular Protein A from a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Biochem.** v.74, p.623-628, 1977.

LISDAT, F., SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Anal. Bioanal. Chem.** v.391, p.1555-1567, 2008.

LOWBURY, E. J. L., BABB, J. R., FORD, P. M. Protective isolation in a burns unit: the use of plastic isolators and air curtains. **J. Hyg. Camb.** v. 69, p.529-546, 1971.

MACIEL, C.C.S.; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção Hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências** - v. 3, n. 1, p.33-43, jan/jun 2010. Disponível em: <<http://veredas.favip.edu.br/index.php/veredas1/article/viewFile/112/118>>. Acesso em: 30 ago 2011.

MALACHOWA, N.; KOHLER, P. L.; SCHLIEVERT, P. M.; CHUANG, O. N.; DUNNY, G. N.; KOBAYASHI, S. D.; MIEDZOBRODZK, J.; BOHACH, G. A.; SEO, K. S. Characterization of a *Staphylococcus aureus* surface virulence factor that promotes resistance to oxidative killing and infectious endocarditis. **Infect. Immun.**, v. 79, n.1, p. 342–352, jan. 2011.

MALANDAIN, C., FAYOLLE, F., BEDOUELLE, H. Biosensors of the Environmental. Oil & Gas Science and Technology. **Rev. IFP**. v.60, n.6, p. 887-889. 2005.

MANDELIS, A e CHRISTOFIDES. C. **Physics, chemistry, and technology of solid state gas sensor devices**, vol.125. John Wiley & Sons. New York. 1993.p 179.

MANTOVANI, F. 60% dos pacientes tem infecções em UTIs da América Latina. **Folha Online. Equilíbrio e Saúde**. 11 dez. 2009. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/folha/equilibrio/noticias/ult263u665018.shtml> > Acesso em: 23 ago 2011.

MARQUES, P. R. B. O. YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

_____. **Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico da hepatite C baseado em monocamadas automontadas e detecção não marcada**.173 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2009.

MAYES, A. G. Principles of antigen-antibody recognition. In: GIZELA, E. e LOWE, C. R. **Biomol. Sensors**. Taylor & Francis. New York.2002. Cap.4, p. 49-86.

MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO. M. A.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 617-628. 2006.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2008.

MELO, E. D. I. **Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificados com aminofenóis para determinação de diclorvós em alimentos de origem vegetal**. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências, Química Analítica) - Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Química UFG-UFMS-UFU. Uberlândia. 2009.

MELVOLD, R. W.; STICCA, R. P. Basic and Tumor Immunology: A Review. **Surg Oncol Clin N Am**. v.16, p.711–735, 2007.

MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização de monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 108 f. Tese (Doutor em Ciências, Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas. 2006.

MÓDOLO, M. L. **Adsorção de ftalocianina de Fe (II) sobre 3-n-propilimidazol sílica-gel: caracterização e aplicações**. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava-PR. 2009.

MOHANTY, S. P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: A Tutorial Review. **IEEE Potentials**, v. 25, n.2, p. 35-40, 2006.

MORAIS, G. R.; SILVA, M. A.; CARVALHO, M. V.; SANTOS, J.G. S; DOLINGER, E. J. O.; BRITO, D. D. Qualidade do ar interno em uma instituição de ensino superior brasileira. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 305-310, mar./apr. 2010.

MOSER, M., LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**. v. 28, suplem.3, p.C2–C13. 2010

MOURI, M.; IKAWA, T.; NARITA, M.; HOSHINO, F.; WATANABE, O. Orientation control of photo-immobilized antibodies on the surface of azobenzene-containing polymers by the introduction of functional groups. **Macromolecular Bioscience**, v.10, p. 612-620, 2010.

NASCIMENTO, R. A. S. **Análise dos procedimentos de medida de dispositivos EGFET utilizando filmes de FTO**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2010.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “Silk-Screen”. **Quim. Nova**. v.21, n.5, p.614-629, 1998.

NATH, N.; HYUN, J.; MA, H.; CHILKOTI, A. Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. **Surface Science**. v. 570, p. 98–110, 2004.

NAYAK, M.; KOTIAN, A.; MARATHE, S.; CHAKRAVORTTI, D. Detection of microorganisms using biosensors - A smarter way towards detection techniques. **Biosens. Bioelectron**. v. 25, p. 661–667, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5nd ed. W.H.Freeman & CO LTD. 2008.1119 f.

NICHOLSON, R. S.; I. SHAIN. Theory of stationary electrode polarography single scan and cyclic methods applied a reversible, irreversible, and kinetic systems. **Anal. Chem**. v. 36, p. 706-723, 1964.

NISNEVITCH, M., FIRER, M. A. The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment. **J. Biochem. Biophys. Methods**. v.49, p.467–480, 2001.

NOGUEIRA, P.S. F.; MOURA, E. R. F.; COSTA, M. M. F.; MONTEIRO, W. M. S.; BRONDI, LI. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. **Rev. Enferm.UERJ**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.96-101, jan/mar 2009.

OSBORNE, S. Influences on compliance with standard precautions among operating room nurses. **A. J. Infec. Control**, v. 31(7), p.415-423, 2003.

PAGLIAI, R. L. **Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para detecção do catecol**. 61 f.Tese (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, Instituto de Física, São Carlos, 2009.

PALCHETTI, I., MASCINI, M. Biosensor technology: a brief history. In: MALCOVATI, P.; BASCHIROTTTO, A.; d’AMICO, A.; NATALE, C. **Sensors and Microsytems** – AISEM 2009 Proceedings. Springer. New York. 2010, v. 54, Part I, p.15-23.

PALIWAL, S. **Development of enzyme-based biosensors for the detection of organophosphate neurotoxins**. 183 f. Tese (Doctor of Philosophy) - Graduate Faculty of Auburn University,Alabama, 2008.

PARKINSON, G; PEJCIC, B. **Using biosensor to detect emerging infectious diseases.** Australian Biosecurity CRC, Austrália, jun 2005. 80 f.

PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas.** 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, jun 2007.

PATEL, P. N.; MISHRA, V.; MANDLOI, A. S. Optical biosensors: Fundamentals & Trends. **J. Eng. Res. Studies.** v.1, n.1, p.15-34, 2010.

PEREIRA, A. C., SANTOS, A. S., KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova.** v. 25, n.6, p.1012-1021, 2002.

PEREZ, L. **Estudo da reação de oxidação do metanol sobre fases intermetálicas ordenadas Pt-M com a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.** 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Bauru. 2010.

PINTO, R. A. A. **Electrochemical Behaviour of Magnesium Alloys. Study on the influence of Rare Earths as alloying elements.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

POHANKA, M., SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **J. Appl. Biomed.** v.6, p.57–64, 2008.

POPA, A. M.; WENGER, B.; SCOLAN, E.; VOIRIN, G.; HEINZELMANN, H.; PUGIN, R. Nanostructured waveguides for evanescent wave biosensors. **Applied Surface Science**, v.256S, p.S12–S17, 2009.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors - A review. **Electrochim. Acta**, 2009. doi:10.1016/j.electacta.2009.01.081.

QIAN, Z. **Ionic-Complementary Peptide Modified Electrode for Biosensing Application.** 96 f. Tese (Master of Applied Science in Chemical Engineering) - University of Waterloo, Canadá. 2009.

RAHAIE, M. & KAZEMI, S. S. Lectin-based Biosensors: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology.** v.9, n.4, p.428-443, 2010.

RICCARDI, C. S., COSTA, P. I., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quim. Nova**, v.25, n.2, p.316-320, 2002.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. **Informe de Vigilancia Tecnológica. Aplicaciones de biosensores en La industria agroalimentaria.** Etec Industria Gráfica, Madrid, 2005. 113f.

SAMUEL, S. O.; KAYODE, O. O.; MUSA, O. I.; NWIGWE, G. C.; ABODERIN, A. O.; SALAMI, T. A. T.; TAIWO, S.S. Nosocomial infections and the challenges of control in developing countries. **Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.** v.11, n.2, p.102-110, 2010.

SANTANA, R. A. C. **Otimização do processo de eletrodeposição das ligas Co-Mo e Ni-Co-Mo para mitigar o efeito da corrosão**. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2007.

SANTOS, L. F.; VIEIRA JÚNIOR, V. M.; SANTOS, A. F.; ALVAREZ, C. C. S.; PEREIRA, C. A. S.; LOPES, F. A.; CARVALHO, N. C. P.; OLIVEIRA, O. A. Fontes potenciais de agentes causadores de infecção hospitalar: esparadrapos, fitas adesivas e luvas de procedimento. **Rev. Panam. Infectol.** v. 12, n.3, p.8-12. 2010.

SIBBALD, M. J. J. B.; ZIEBANDT, A. K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M.; de JONG, A.; HARMSEN, H. J. A. M.; RAANGS, G. C.; STROKOOS, I.; ARENDS, J. P.; DUBOIS, J. Y. F.; van DIJL, J. M. Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 70, n.3, p.755-788, 2006.

SIDNEY, P. C. W.; NATHAN, O. K. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1955. v. 1

SILVA, J. J. B. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos**. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SILVA, Ruvani Fernandes da. A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.11,n.1,p.108-114, 2003.

SOUZA, N. C. C. **Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Escherichia coli em água**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SRIKANTH, P., SUDHARSANAM, S., STEINBERG, R. Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. **I. J. Medical Microbiol.** v.26, n.4, p.302-312. 2008.

STATHOPOULOU, O. I.; ASSIMAKOPOULOS, V. D.; FLOCAS, H. A.; HELMMIS, C. G. An experimental study of air quality inside large athletic halls. **Building and Environment**. v. 43, p.834–848, 2008.

STRYJAKOWSKA-SEKULSKA, M.; PIOTRASZEWSKA-PAJAŁ, A.; SZYSZKA, A.; NOWICKI, M.; FILIPIAK, M. Microbiological Quality of Indoor Air in University Rooms. **Polish J. Environ. Stud.** v.16, n. 4, p.623-632, 2007.

TEIXEIRA, P. & VALLE, S. **Biossegurança uma abordagem multidisciplinar**. Editora FIOCRUZ. 3ª Reimpressão. Rio de Janeiro. 2010.

UHLÉN, M.; GUSS, B.; NILSSON, B.; GATENBECK, S.; PHILIPSON, L.; LINDENBERG, M. Complete Sequence of the Staphylococcal Gene Encoding Protein A :a gene evolved through multiple duplications. **The Journal of biological chemistry**. v.259, n.3, p.1695-1702, 1984.

Van REGENMORTEL, M. H. V. e ALTSCHUH, D. Principles of antigen-antibody recognition. In: GIZELA, E. e LOWE, C. R. **Biomol. Sensors**. Taylor & Francis. New York, 2002. cap.1, p.3-18.

VERREAULT, D., MOINEAU, S., DUCHAINE, C. Methods for sampling of airborne viruses. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.72, n.3, p. 413–444, 2008.

VINCENT, J. L.; RELLO, J.; MARSHALL, J.; SILVA, E.; ANZUETO, A.; MARTIN, C. D.; MORENO, L.; LIPMAN, J.; GOMERSALL, C.; SAKR, Y.; REINHART, K.; EPIC II Group of Investigators. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v.302, n.21, p.2323-2329, dez. 2009.

YAMANAKA H. ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA A. A. P. **Biossensores eletroquímicos**. Letra Boreal. São Paulo. 2009. 99 f.

YOON, M., HWANG, H. J., KIM J. H. Immobilization of antibodies on the self-assembled monolayer by antigen-binding site protection and immobilization kinetic control. **J. Biom. Sc. Engin.** v. 4, p.242-247. 2011.

YU, C. W. F.; KIM, J. T. Building Pathology, Investigation of Sick Buildings – VOC Emissions. **Indoor Built Environ.** v.19, n.1, p.30–39, 2010.

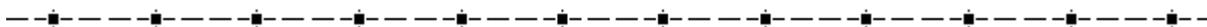
ANEXO



**BIOSSEGURANÇA NA ÁREA DE SAÚDE:
Uma abordagem interdisciplinar**

Ana Cristina Vasconcelos Fialho
Fernando Manuel Araújo-Moreira
Cristiane Leite de Almeida
Antonio Aparecido Pupim Ferreira
Cristina Paiva de Sousa

BIOSSEGURANÇA NA ÁREA DE SAÚDE: Uma abordagem interdisciplinar



Ana Cristina Vasconcelos Fialho
Fernando Manuel Araújo-Moreira
Cristiane Leite de Almeida
Antonio Aparecido Pupim Ferreira
Cristina Paiva de Sousa

São Carlos



2011

Sumário

INTRODUÇÃO.....	05
PARTE I	
NOÇÕES BÁSICAS DE BIOSSEGURANÇA	
Capítulo 1. Princípios Básicos de Biossegurança.....	10
Capítulo 2. Histórico da Biossegurança.....	12
Capítulo 3. Áreas de Abrangência da Biossegurança.....	15
PARTE II	
ATIVIDADES LABORAIS NAS ÁREAS DE SAÚDE E MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA	
Capítulo 4. Biossegurança nas Áreas da Saúde.....	19
Capítulo 5. Atividades dos Profissionais das Áreas de Saúde e sua Contextualização na Biossegurança.....	22
Capítulo 6. Infecção nos Ambientes de Saúde.....	40
Capítulo 7. Infecção Hospitalar.....	43
PARTE III	
CONTROLE DE INFECÇÕES NOS AMBIENTES DE SAÚDE	
Capítulo 8. Métodos de Controle e Prevenção das Infecções nos Serviços de Saúde.....	47
Capítulo 9. Precauções Padrão.....	48
9. 1. Higienização das Mãos.....	49
9. 2. Uso Adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPI).....	50
9.3. Cuidados com Equipamentos.....	51
9.4. Limpeza do Ambiente.....	51
9.5. Materiais Perfurocortantes.....	51
9.6. Manejo da Roupas Sujas/Contaminadas.....	51
Capítulo 10. Precauções Baseadas na Transmissão ou Precauções Adicionais.....	52
10.1. Precauções Aéreas ou Respiratórias (Aerossóis).....	52
10.2. Precauções Respiratórias para Gotículas.....	53

10.3. Precauções por Contato.....	53
-----------------------------------	----

PARTE IV

BIOSSEGURANÇA APLICADA AOS LOCAIS DE SAÚDE

Capítulo 11. Biossegurança nos Estabelecimentos de Saúde.....	56
11.1. Projetos Físicos de Estabelecimentos de Saúde.....	56
11.2. Renovação do Ar em Áreas Críticas.....	56
11.3. Processamento de Roupas Sujas/Contaminadas.....	57
11.4. Limpeza e Desinfecção das Superfícies.....	58
Capítulo 12. Biossegurança Hospitalar.....	59
Capítulo 13. Biossegurança em Clínicas e Consultórios.....	62

PARTE V

BIOSSEGURANÇA NOS AMBIENTES LABORATORIAIS

Capítulo 14. Laboratórios de Ensino/Pesquisa.....	64
14.1. Laboratório Nível de Segurança 1	65
14.2. Laboratório Nível de Segurança 2	65
14.3. Laboratório Nível de Segurança 3	66
14.4. Laboratório Nível de Segurança 4.....	66

PARTE VI

RESÍDUOS

Capítulo 15. Gerenciamento de Resíduos dos Serviços de Saúde	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

Introdução

As atividades desenvolvidas nas áreas de saúde possuem um grau de complexidade crescente, tendo em seu contexto o envolvimento de várias profissões e especialidades que atuam de forma interdisciplinar tendendo a uma transdisciplinaridade. Todo este processo objetiva propiciar uma atenção global à saúde do indivíduo. Estas atividades formam um complexo de procedimentos que abrangem desde a atenção primária ao paciente até procedimentos altamente complicados, adentrando nos meandros da engenharia genética, quando do desenvolvimento de estudos com DNA recombinante. Esta diversidade de campos de atuação das áreas de saúde e afins vem expor os indivíduos em seus locais de trabalho a uma gama de riscos, carecendo então de metodologias bem planejadas, normatizadas e executadas em consonância aos princípios que regem a biossegurança, a qual, caracterizada por sua multidisciplinaridade, vislumbra a prevenção, minimização ou mesmo remediação dos perigos inerentes a estas atividades.

Os princípios que norteiam a Biossegurança devem ser conhecidos e aplicados em todas as esferas das áreas de saúde, vindo a permitir um atendimento seguro, pautado na qualidade, propiciando a proteção dos seres vivos e preservação do meio ambiente. Afirma-se, em consonância com essa assertiva, que o profissional de saúde deve possuir conhecimentos técnico-científicos que assegure, no desempenho de suas atividades, isenção de prejuízos quer para si próprio como para os demais indivíduos envolvidos no contexto. Estes conhecimentos muitas vezes podem transcender sua área de atuação, mais são sumamente necessários, para que se possam gerir os serviços que estão sendo prestados com autonomia e domínio do saber fazer.

Os cuidados pertinentes ao escopo da Biossegurança abrangem: as instalações físicas, aplicações das precauções padrão (nesta, a higiene das mãos como manobra isolada de fundamental importância para o controle de infecção cruzada), a imunização do profissional, o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's), desinfecção superfícies e esterilização de instrumentos reutilizáveis, limpeza das caixas d'água, controle da qualidade do ar interno, o descarte dos resíduos entre outros. Além disso, nos locais de saúde, é necessária a existência de normas, setores e comissões competentes, responsáveis pela elaboração, formação, informação e monitoramento do cumprimento destas condutas de Biossegurança.

Os riscos aos quais os profissionais de saúde e demais pessoas estão expostas têm várias origens: físicos, químicos, biológicos, biotecnológicos, ergonômicos e acidentes. Estes riscos são caracterizados por: emissões de radiação, calor e frio extremo, liberação e/ou manipulação de substâncias químicas, estresse, contato com plantas, insetos e animais peçonhentos, presença de agentes microbianos infecciosos e/ou seus metabólitos, postura ergonomicamente incorreta, acidentes com materiais elétricos, dentre outros. Os riscos podem ser, em alguns casos, cumulativos, levando a transtornos da saúde de ordem e grau variados. Dentre eles os agentes biológicos constituem-se no risco ocupacional mais antigo e comum, antes mesmo dos riscos químicos e físicos, quando o trabalhador já experimentava exposição à grande número de agentes biológicos (MASTROENI, 2006). Atualmente, torna-se imprescindível conhecer e aplicar normas, protocolos e manobras diversas, específicas para cada caso, com intuito único, conter qualquer fator que leve a predisposição ou facilitação ao adoecimento do indivíduo.

Uma abordagem dos princípios básicos que regem a Biossegurança deve ser feita, contemplando as áreas de saúde, iniciando-se pelas condutas comuns a todas as profissões, estendendo-se pelas peculiaridades de algumas, para que sejam enfatizados e sedimentados os conhecimentos mínimos necessários aos profissionais no exercício de suas funções.

Todas as profissões da saúde: medicina, odontologia, farmácia, enfermagem, nutrição, fisioterapia, terapia ocupacional, educação física, fonoaudiologia e psicologia (Resolução nº 287/98, CNS) devem conter em seu cerne, desde a graduação, conhecimentos sobre Normas de Biossegurança para que na formação profissional fiquem sedimentados tais saberes.

Com relação ao ensino de ciências da saúde, as instituições de ensino superior, devem conter em sua grade curricular competências e habilidades referentes à Biossegurança, de forma inter e transdisciplinar, essencialmente nas atividades práticas ou qualquer outra atividade onde houver riscos de contaminação da comunidade acadêmica e outros atores. Ademais, todas as atividades clínicas e laboratoriais devem ser regidas por condutas criteriosas adequadas as suas peculiaridades e explicitamente conhecidas e registradas em manual disponível para todos aqueles que convivem no ambiente de ensino. Vale ressaltar que as pessoas que prestam serviços terceirizados, principalmente serviços de limpeza, devem

possuir treinamento ou serem treinados, neste campo de conhecimento, para o desempenho de suas atividades e inserção no contexto biosseguro.

Já no âmbito hospitalar ou clínico/ambulatorial existem leis que regem a obrigatoriedade do controle de infecção, além dos serviços, programas e comissões para gerir esta prestação de serviços, objetivando prevenir as tão indesejáveis infecções hospitalares. Estas se tornaram um problema de grande abrangência, tanto a nível nacional como internacional o que motivou a ação conjunta dos países para interceptar este epifenômeno, que se tornou um retrato da qualidade da assistência médico-hospitalar dos estados, municípios e países. Assim, o controle de infecção hospitalar tem se tornado um grande desafio para todos, tanto no âmbito dos países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos, na premissa de evitar danos aos pacientes e altos custos em tratamento. Sabe-se que os índices estatísticos da infecção hospitalar alcançam uma média mundial em torno de 5% entre os pacientes internados, já no Brasil esta ocorrência é de 15,5% (SILVA, 2003) dados bastante preocupantes por ocupar o terceiro lugar entre as maiores causas de morte, ficando atrás apenas de acidentes de trânsito e doenças vasculares. Após a divulgação destes índices, houve um incremento da vigilância epidemiológica no Brasil objetivando maior controle e melhoria das ações a saúde, foi então expedida a Portaria 2616, de 12 de maio de 1998, pelo MS, regendo o controle de infecção hospitalar onde as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) passam a ser consultores do Programa de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH) tendo como executores os membros do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH), objetivando a premente necessidade da ação conjunta de todos os indivíduos envolvidos no processo, pois as infecções hospitalares atingem não só o paciente, mais qualquer pessoa que esteja em contato com o hospital, inclusive a equipe de saúde.

No âmbito das demais áreas da saúde têm ocorrido grandes avanços, porém carecem de melhores ações delineadas para sedimentação técnico-educacional de normas vigentes levando em consideração que as doenças infecto-contagiosas têm-se destacado como as principais fontes de transmissão de microrganismos para pacientes e profissionais.

Em todas as áreas de atuação (medicina, odontologia, farmácia, enfermagem, nutrição, fisioterapia, terapia ocupacional, educação física, fonoaudiologia e psicologia) o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), independente de diagnóstico ou suspeita de infecção por parte do paciente, torna-se obrigatório durante o atendimento dos mesmos, além de outras condutas inseridas nas precauções padrão. No entanto, não se tem tornado rotina nas

atividades laborais de alguns destes profissionais. Deve haver também a preocupação com a contenção biológica dos microrganismos nas superfícies, no processamento dos materiais reutilizáveis e roupa aplicando adequadamente as técnicas de limpeza, desinfecção e/ou esterilização, de acordo com as indicações. Também o descarte de materiais, que foram utilizados, deve se dado através de um gerenciamento adequado até a disposição final dos resíduos. Todo profissional é responsável pelo resíduo gerado e isto é válido para os atendimentos domiciliares ou *home care*, tendo em vista o fato de não haver uma regulamentação oficial que os gerencie nestes locais (Fabricio et al.,2004).

Em todas as esferas do setor de saúde, pública, privada, institucional, beneficente etc., devem existir protocolos para notificações de acidentes pós-exposição a materiais biológicos. Nas instituições de ensino superior é de responsabilidade da coordenação ou diretoria do curso a disponibilização destes meios de condutas para prestar atendimento imediato ao aluno, docente ou paciente acidentado. Estes protocolos devem contemplar os acidentes envolvendo principalmente microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos por feridas com perfuração (picadas de agulha) ou lesões por objetos perfurocortantes. Tem sido dada ênfase aos riscos de contaminação ocupacional pelo vírus HIV, hepatites B e C, embora pelo menos uns 20 outros microrganismos estejam envolvidos nesta contaminação (SCHEIDT et al., 2006).

Esta publicação visa ser um instrumento formativo e/ou informativo para estudantes e profissionais das áreas de saúde e biológicas, contribuindo para nortear e arraigar conhecimentos imprescindíveis ao desempenho profissional seguro e de qualidade.

PARTE I -

NOÇÕES BÁSICAS DE BIOSSEGURANÇA

Capítulo 1: Princípios Básicos de Biossegurança

Capítulo 2: Breve Histórico da Biossegurança

Capítulo 3: Áreas de Abrangência da Biossegurança

Capítulo 1 – Princípios Básicos de Biossegurança

1. Conceitos de Biossegurança

O termo Biossegurança surgiu com a preocupação relativa aos riscos ocupacionais dos trabalhadores de laboratórios que manipulavam agentes biológicos. Atualmente, esta preocupação transpõe as áreas limítrofes dos organismos geneticamente modificados, transcendendo com a preocupação à saúde e ao meio ambiente.

Na busca pela etimologia da palavra encontra-se que o seu componente “*bio*” é de origem grega significando **vida** e “segurança”, de acordo com o dicionário do Aurélio, significa **qualidade ou condição de seguro**, depreende-se então que Biossegurança significa, no sentido estrito da palavra, **segurança da vida** ou **vida segura** (Costa, 2005).

Encontra-se na literatura vários conceitos com conotações pouco divergentes, algumas focadas nos organismos modificados geneticamente e outras tendo na sua essência o cuidado com os riscos das mais variadas etiologias. Algumas definições serão apresentadas a seguir, com o objetivo de análise e reflexão sobre o tema:

- Segundo Teixeira & Valle (2002):

A Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, riscos que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, das plantas e do ambiente ou qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

- Conceito sobre Biossegurança designado pela Portaria

131/2003, da Presidência da Fundação Oswaldo Cruz:

Conjunto de saberes direcionados, ações de prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes das às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, as quais possam comprometer a saúde do homem, dos animais, das plantas e do ambiente ou qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

Dentre os conceitos o mais preconizado na literatura é o citado por Teixeira & Valle (2003), onde a grande diferença no contexto encontra-se em uma como “conjunto de ações” e na outra “conjunto de saberes”, mas fica explícito a preocupação com a proteção no inter-relacionamento entre homem, animal e meio ambiente, onde a alteração em um destes fatores pode desencadear um desequilíbrio entre os mesmos.

- Conceito segundo as Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com material biológico do Ministério da Saúde (2006a): “... condição de segurança alcançada por meio de um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal, vegetal e o ambiente”.

- Mastroeni (2006) conceitua Biossegurança ou segurança biológica como: “... aplicação do conhecimento, técnicas e equipamentos com a finalidade de prevenir a exposição do trabalhador, laboratório e ambiente a agentes potencialmente infecciosos ou biorriscos.”

Observa-se que o foco central de todas as definições reside na abordagem técnico-científica de riscos, provenientes das mais variadas atividades realizadas, estes uma vez identificados pode-se fazer uma valoração para uma previsibilidade das conseqüências danosas que possam advir.

Ademais, não se deve relegar a provisoriedade dos conceitos científicos, que decorrem do próprio dinamismo da ciência (Pereira et al., 2009) o que leva-se a concluir que a Biossegurança é um processo dinâmico, operacional e funcional.

Capítulo 2– Breve Histórico da Biossegurança

No ano de 1970 o homem já possuía ferramentas poderosas para dar o arranque para era biotecnológica, pois os cientistas detinham a estrutura da molécula de DNA, descoberta em 1953 (Crick, 1974) e as enzimas de restrição, descobertas em 1970 (Roberts, 2005). Porém, no ano de 1971, com avanços dos experimentos, houve a possibilidade de realização de uma pesquisa, nos Estados Unidos, onde cientistas pretendiam fazer a transferência do DNA viral do vírus símio SV40 (vírus tumorais de DNA), que como muitos outros vírus, podem infectar células de mamíferos em cultura e em fase de crescimento transformando células normais em cancerosas (Oda, 1999). Assim, os cientistas se reuniram para discutir sobre os possíveis riscos da tecnologia do DNA recombinante, sendo que em junho de 1973, na Conferência de Gordon foi pedida a moratória das pesquisas com esta tecnologia para que fossem definidas regras ou normas claras de segurança para a manipulação genética.

O cerne da construção do termo Biossegurança teve seu início no ano de 1975, durante a reunião no Centro de Convenções de Asilomar, localizado em Pacific Grove, na Califórnia, quando então a comunidade científica debatia sobre os impactos da engenharia genética na sociedade e de onde surgiram as primeiras diretrizes de segurança (Neves et al., 2007). A moratória desta proposta levou a adoção de mecanismos de controle destas tecnologias sendo que, o controle regulatório ficaria a critério de cada país, de acordo com suas especificidades normativas. Esta reunião foi um marco na ética aplicada à pesquisa, sendo a primeira vez que se discutiram os aspectos da proteção aos pesquisadores e de mais profissionais envolvidos nas áreas (Oda, 1999).

Os primeiros produtos modificados geneticamente que deram início a comercialização foi na década de 80, sendo a insulina humana pioneira, logo em seguida apareceram outros produtos com o domínio do setor de saúde. Neste mesmo período a World Health Organization (WHO) definiu os chamados riscos periféricos para trabalhadores que manipulavam agentes patogênicos, assim como aos que estavam expostos aos riscos físicos, químicos e ergonômicos (Costa & Costa, 2002).

Uma das primeiras condutas e preocupações com a transmissão das doenças surgiu nos Estados Unidos, em 1877, através de um manual que recomendava o isolamento de pacientes hospitalizados portadores de doenças infecciosas em instalações separadas, surgindo assim os hospitais para tratamento de doenças infecciosas, porém a infecção nosocomial continuou a ocorrer devido a falhas na implementação do sistema. Com passar do tempo estas normas foram modificadas e adequadas aos avanços das doenças. (Garner, 1996)

Em 1970, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) americano, introduziu o sistema de **Precauções de Isolamento**, através de um manual intitulado “Técnicas de Isolamento para uso em Hospitais”, específico para doenças, uma política bem diferente e com instruções práticas para evitar a propagação de doenças dentro do âmbito hospitalar. A **Precaução por Barreiras** (lavagem das mãos e uso de luvas) no contexto destas normas foi muito utilizada. (Garner, 1996 & Tietjen et al., 2003)

Em 1985, devido ao surgimento do advento do vírus HIV/AIDS foram elaboradas orientações para proteção da saúde do trabalhador, principalmente os da área de saúde, com o objetivo de prevenir a infecção pelo HIV e outras doenças transmitidas pelo sangue, estas orientações ficaram conhecidas como **Precauções Universais** (C.D.C, 1985 apud C.D.C. 2003). Devido à natureza assintomática destas infecções, com ausência de sinais e sintomas em sua fase inicial, estas medidas tiveram que abranger todas as pessoas que procurassem atendimento de saúde, independente de estarem doentes ou não (Tietjen et al., 2003).

Logo após a implantação das Precauções Universais surgiu, em 1987, o que se chamou de **Isolamento das Substâncias do Corpo** (body substance isolation) – um novo sistema de precauções, com foco na proteção da saúde do trabalhador e do paciente relacionando cuidados não só com o sangue mais também todas as substâncias úmidas e potencialmente infectantes do corpo (secreções e excreções). Ela se baseou principalmente no uso das luvas antes de manipular membranas mucosas; pele com solução de continuidade e fluídos de várias naturezas (sangue, sêmen, secreções vaginais, drenagem de feridas, escarro, saliva, líquido amniótico) (Siegel et al, 2007).

Em 1996, novas diretrizes foram estabelecidas pelo C.D.C. (Centers for Disease Control and Prevention), desta vez havia uma abordagem em dois níveis: Precauções Padrão, estratégia primária para prevenção de infecções nosocomiais que devem ser aplicadas a todas as pessoas infectadas ou não, e as Precauções baseadas na Transmissão, aplicadas

somente a pacientes internados, esta abrange: transmissão pelo ar, gotículas e contato (Tietjen et al., 2003).

A primeira Lei de Biossegurança, surgida no Brasil, foi a Lei nº 8.794 de 05 de janeiro de 1995 que disciplinava a manipulação e uso dos organismos modificados geneticamente normatizando a pesquisa em contenção, experimentação em campo, transporte, importação, produção, armazenamento e comercialização. Tal lei proibia as pesquisas com embriões e criava a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) , para funcionar com um órgão de consulta dos Ministérios da Saúde, Meio Ambiente e Agricultura.

As demais leis em vigor, que contemplam a área de saúde, serão apresentadas concomitantemente com os temas relacionados.

Capítulo 3 – Áreas de Abrangências da Biossegurança

O conceito de Biossegurança foi construído com a preocupação de proteger os trabalhadores em pesquisas que envolvessem manipulação genética. A Figura 1 justifica a concomitância da Biossegurança com a biotecnologia. Esta é caracterizada pela sua multidisciplinaridade e, por possuir ampla abrangência sem limitações bem estabelecidas. Sabe-se da sua importância e aplicação em várias áreas de conhecimento, não havendo uma enumeração precisa destas áreas.



Fig.01 – Algumas áreas de abrangência da Biossegurança, com ênfase inicial na biotecnologia

A evolução da engenharia genética e das técnicas de produção alimentar, prática freqüente em nossa sociedade, dos organismos geneticamente modificados (OGMs), elaborados em laboratório com técnicas avançadas que permite alterar sua estrutura genética, fez com que as atividades e projetos que os envolvam tivessem suas ações regulamentadas objetivando a proteção e a preservação da biosfera assim como do mercado consumidor. É o caso da Lei de Biossegurança (Lei n.º 11.105/05, que revogou a anterior Lei n.º 8.974/95), da Lei de Proteção de Cultivares (Lei n.º 9.456/97), do Tratado de Cartagena e da aplicação do

Princípio 21 da Convenção das Nações Unidas Sobre a Biodiversidade, conhecida como Rio-92 ou Eco-92.

Atualmente, as tecnologias de produção de alimentos geneticamente modificados mais desenvolvidas utilizam o método da transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ou método biológico e método de bombardeamento com microprojéteis. No primeiro, induz-se o gene com a característica desejada na agrobactéria, que por sua vez será transferido para o vegetal escolhido; no segundo método, encobrem-se partículas microscópicas do metal tungstênio ou ouro com os genes desejados e, através da aceleração partículas, atiram-se os mesmos contra as paredes das células vegetais, as quais atravessam a parede e membranas celulares e nucleares liberando no núcleo fragmentos de DNA, onde o DNA exógeno se integra ao DNA cromossômico. Em ambos os casos, as células receptoras são colocadas em placas de vidro, onde germinarão antes de serem transferidas para o solo (Homrich, 2008). No Brasil, todas estas práticas são gerenciadas por Leis de Biossegurança tendo como órgão fiscalizador e regulador é a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança).

No âmbito do direito temos como um de seus ramos o biodireito que pode se caracterizar por abranger um conjunto de medidas ou leis jurídicas visando fazer cumprir a obrigatoriedade das condutas e ações éticas que permeiam os procedimentos clínicos e/ou científicos. O biodireito então regula as atividades e relações desenvolvidas pelas biociências e biotecnologias, com o fim de manter a integridade e dignidade humana frente ao progresso.

A arquitetura tem seu papel preponderante de grande relevância, com relação aos projetos arquitetônicos dos estabelecimentos de saúde, os quais devem ser projetados com base na funcionalidade e segurança dos mesmos baseando-se nos graus de riscos e níveis de Biossegurança que são executados nestes ambientes. O projeto arquitetônico destes locais deve ser pautado no levantamento das condições de segurança estabelecendo uma relação entre espaço e atividades em termos de requisitos funcionais e ambientais (Simas & Cardoso 2008).

O jornalismo, com similaridade as demais áreas, vislumbra a análise, divulgação e interpretação dos fatos geralmente voltados, quando da divulgação de temas científicos, para histórico do problema ou mais resumidamente para a conclusão dos fatos caracterizando o jornalismo científico ou mesmo o jornalismo ambiental. Em Biossegurança

requer conhecimentos amplos para que todos os eventos sejam informados com precisão e clareza, cuja matéria terá papel formativo e informativo para os leitores.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) divide com os estados e municípios a responsabilidade pelo controle de qualidade dos medicamentos e inspeção dos fabricantes através da vigilância pós-comercialização, das ações de farmacovigilância e da regulação da promoção de medicamentos. Assim, a Resolução RDC 17/2010 que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos contem instruções que normatizam a fabricação dos medicamentos objetivando a Garantia de Qualidade a qual incorpora as BPF (Boas Práticas de Fabricação) e outros fatores, incluindo o projeto e o desenvolvimento de um produto.

PARTE II-
ATIVIDADES LABORAIS NAS ÁREAS DE SAÚDE E
MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA

Capítulo 4: Biossegurança nas Áreas de Saúde

Capítulo 5: Atividades Profissionais das Áreas de Saúde e sua
Contextualização na Biossegurança

Capítulo 6: Infecção nos Ambientes de Saúde

Capítulo 7: Infecção Hospitalar

Capítulo 4 – Biossegurança nas Áreas de Saúde

De acordo com a Resolução 287/98 de 08 de outubro de 1998, do Conselho Nacional de Saúde, as seguintes áreas são consideradas de saúde:

1. Assistentes Sociais;
2. Biólogos;
3. Biomédicos;
4. Profissionais de Educação Física;
5. Enfermeiros;
6. Farmacêuticos;
7. Fisioterapeutas;
8. Fonoaudiólogos;
9. Médicos;
10. Médicos Veterinários;
11. Nutricionistas;
12. Odontólogos;
13. Psicólogos; e
14. Terapeutas Ocupacionais.

A Resolução 287/98, no seu parágrafo II esclarece que, com referência aos itens 1, 2, 3 e 10, a caracterização como profissional de saúde deve ater-se a dispositivos legais e aos Conselhos de Classe dessas categorias (CNS, 1998).

Para estes profissionais a aplicação das normas de Biossegurança nos ambientes de trabalho, principalmente, hospitais, clínicas, consultórios, Instituições de Ensino Superior, laboratórios de saúde pública (LACENs), hemocentros, laboratórios de análises clínicas, atendimento domiciliar, clínicas veterinárias, entre outros, ocorre de forma peculiar e diferenciada, pautada nas atividades que são desenvolvidas e regidas pelas políticas de vigilância em saúde.

Os serviços de saúde têm muitas áreas insalubres, de graduação variável, dependente do grau de complexidade dos serviços, do tipo de atendimento prestado e da função do profissional. Atualmente, as ações de Biossegurança nas áreas de saúde são resultantes da preocupação, tanto por parte da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) quanto pelos Serviços de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH). A CCIH tem por objetivo manter os índices de infecções nos valores considerados aceitos pelo Ministério da Saúde, seguindo normas e portarias específicas, além de promover ações que previnam as infecções causadas pela quebra de rotinas e falta de compromisso dos profissionais. A utilização de precauções básicas auxilia os profissionais nas condutas técnicas adequadas à prestação dos serviços, através do uso correto de Equipamento de Proteção Individual (EPI), de acordo com a Norma Regulamentadora nº 6 (NR-6), aprovada pela Portaria nº21/2001. As Precauções juntamente com as Boas Práticas de Laboratórios e outras normatizações internacionais, federais, estaduais e municipais, foram desenvolvidas para serem aplicadas de acordo com as especificidades das atividades de cada local.

As medidas de Precauções podem ser classificadas em:

- **Precauções Padrão**
- **Precauções Baseadas na Transmissão**, sendo esta dividida em *precaução de contato*, *precaução aérea* e *precaução por gotículas* (Siegel, 2007).

As **Precauções Padrão** devem ser aplicadas a todos os pacientes independentes de diagnóstico de seu estado infeccioso ou não; em todas as situações quando houver a possibilidade de exposição a fluídos corporais, secreções, excreções (exceto suor), pele descontínua e membranas mucosas. Portanto, todos os profissionais da área de saúde devem segui-las não importando o estado de saúde do paciente.

Precauções Baseadas na Transmissão devem ser aplicadas somente para pacientes com suspeita ou confirmação de infecções epidemiologicamente importantes, ocasionadas por patógenos de transmissão aérea ou por contato, este contato pode ser direto (pessoa – pessoa) ou indireto (através de objetos intermediários). Nas **Precauções por Contato** há uma ênfase com os cuidados de higienização das mãos e uso de luvas, com trocas entre o atendimento de um paciente e outro e, cuidados com objetos e equipamentos. Na **Precaução Aérea** preocupa-se em reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos veiculados pelo ar (partículas <5µm) no caso **aerossóis**. Ocorre quando o núcleo da gotícula contendo o microrganismo ou poeira permanece longo tempo no ar. Na **Precaução por Gotículas** a indicação é para reduzir a transmissão por agentes infecciosos veiculados pelo ar,

mais através de partículas com $>5\mu\text{m}$ que podem alcançar distância de 1m da fonte de infecção, estas podem ser geradas por tosse, espirro, fala ou realização de alguns procedimentos (Figueiredo & Leite, 2006).

Mesmo com todos os cuidados preconizados por diversas leis, portarias, resoluções e normas técnicas do Ministério da Saúde, Ministério do Trabalho e Secretarias Estaduais e Municipais, todos os quesitos relacionados à Biossegurança, em geral, não são suficientemente seguidos pelos profissionais da área da saúde predispondo a contaminação cruzada que pode se instalar quando da atenção e cuidado ao paciente.

Capítulo 5 – Atividades Profissionais das Áreas de Saúde e sua Contextualização na Biossegurança

As atividades laborais específicas de cada especialidade da área de saúde devem ser regidas pelas Precauções Padrão e Precauções baseadas na Transmissão, adicionalmente, dependendo de cada procedimento, outras condutas devem ser incorporadas. Elaboração de protocolos, em forma de manual, para cada setor de trabalho deve ser efetivada, ficando sob responsabilidade da administração gerir as comissões que executam estas atividades e, estas comissões, tem como um de seus objetivos a aplicabilidade dos protocolos pelos trabalhadores.

A seguir discorre-se sobre algumas áreas de saúde e suas atividades específicas para possibilitar a inter-relação do trabalho de cada profissional com a adoção das Precauções ou similares. A omissão das áreas de Serviço Social, Biologia, Biomedicina e Medicina Veterinária devem-se ao que estipula a Resolução 287/98 CNS que vincula sua caracterização, como da área de saúde, a dispositivos legais e ao conselho de classe.

5.1. Educação Física

De acordo com a Resolução CONFEF nº 046/2002 no seu Art 1º é determinado o campo de atuação do profissional de educação física sendo que o profissional de Educação Física é especialista em atividades físicas, nas suas diversas manifestações – ginásticas, exercícios físicos, desportos, jogos, lutas, capoeira, artes marciais, danças, atividades rítmicas, expressivas e acrobáticas, musculação, lazer, recreação, reabilitação, ergonomia, relaxamento corporal, ioga, exercícios compensatórios à atividade laboral e do cotidiano e outras práticas corporais.

Depreende-se que, os profissionais de educação física, assim como os demais da área de saúde, desempenham atividades tendo como objeto principal a saúde humana. As aplicações dos protocolos de Biossegurança vão condizer com os locais que estes profissionais estejam desempenhando suas funções e a modalidade de atividade.

Os locais onde estes profissionais desenvolvem suas atividades geralmente são: instituições de educação, empresas, instituições de administração e prática desportiva,

empresas, centros e laboratórios de pesquisa, academias, clubes, associações esportivas e/ou recreativas, hotéis, centros de recreação, centros de lazer, centros de estética, clínicas, instituições e órgãos de saúde, hospitais, centro de saúde, asilos, centro de treinamento de artes marciais, logradouros públicos e todos os locais onde estiverem sendo aplicadas atividades físicas e/ou desportivas.

Embora a diversidade de ambientes seja bastante ampla todas as ações destes profissionais devem ser gerenciadas pelas Precauções Padrão e Precauções baseadas em Transmissão, quando em contato com seu cliente ou paciente, com fins de prevenir e evitar a transmissão da infecção.

É de fundamental importância a limpeza, descontaminação e desinfecção de todos os equipamentos que tiverem contato com seus pacientes ou clientes, independente do local, nos seguintes momentos:

- Antes do uso pelo cliente;
- Durante a sessão de atendimento ao paciente, se houver alguma contaminação gerada por secreções e excreções;
- Entre cada cliente;
- Ao término de cada turno de trabalho.

Adicionais a estas condutas enfatiza-se a importância da lavagem das mãos tanto pelo cliente quanto pelos profissionais e sua equipe. (Faculdade Católica do Ceará/Curso Educação Física, 2009)

Quando se trata de exercícios físicos em piscinas alguns cuidados também devem ser observados levando em conta os diversos tipos de piscinas que existem tais como: piscinas particulares, coletivas, públicas, terapêuticas. O controle de qualidade da água deve ser rigoroso e se dar, mediante a supervisão formal, com assinatura e carimbo, do responsável técnico, em livro próprio e exclusivo, incluindo medições de cloro, pH e temperatura com periodicidade mínima de 12 horas. Sendo obrigatória a presença permanente do profissional de educação física nas aulas de natação, hidroginástica, recreação e outras atividades de sua responsabilidade. Os usuários devem se submeter a exames médicos, obrigatoriamente, no máximo a cada 12 meses (ANVISA, 2009). No art. 29 §1º do manual da ANVISA expõe que “a limpeza e desinfecção dos colchonetes, assentos dos equipamentos e/ou das áreas em que exista o contato corporal, deverá ser constante, com álcool a 70% e toalha de papel descartável.”

5.2 Enfermagem

A enfermagem tem seu exercício regulamentado, no artigo 11, da Lei nº 8.967, de 28 de dezembro de 1994, que altera o art. 23 da Lei 7.498/86, e determina que os enfermeiros possam exercer cargos de direção do órgão de enfermagem em instituição de saúde, pública e privada, além de chefia de serviços e de unidade de enfermagem; o enfermeiro pode ainda organizar e dirigir os serviços de enfermagem e de suas atividades técnicas e auxiliares nas empresas prestadoras desses serviços; pode ainda prestar consultoria, auditoria e emissão de parecer sobre matéria de enfermagem; consulta de enfermagem; é função do enfermeiro a prescrição da assistência de enfermagem; os cuidados diretos de enfermagem a pacientes graves com risco de vida e cuidados de maior complexidade técnica e que exijam conhecimentos de base científica e capacidade de tomar decisões imediatas.

As diversas especialidades da enfermagem estão contempladas na Resolução COFEN - 290/2004, onde se encontram nominadas 42 especialidades de competência do enfermeiro. Dentre os locais assistenciais da enfermagem temos: centros de saúde, hospitais centrais e distritais, designadamente hospitais gerais, pediátricos, psiquiátricos e maternidades. Nos hospitais podem estar ligados a determinado serviço ou departamento: medicina, cirurgia, pediatria, ginecologia/obstetrícia, ortopedia, psiquiatria/neurologia, unidade de cuidados intensivos, urgências, dentre outros. No setor privado, podem trabalhar em hospitais privados, clínicas, policlínicas, centros de enfermagem, lares de idosos, creches, instituições de solidariedade social, empresas prestadoras de cuidados de saúde ao domicílio, empresas em geral (como enfermeiros do trabalho) e estabelecimentos de ensino (como docentes). Os enfermeiros atuam ainda junto a comunidade com ações de coordenação e auditoria serviços de enfermagem e implementam ações para a promoção da saúde dentre outros.

Melo et al. (2006) realizaram estudo sobre a compreensão das Precauções Padrão pelos enfermeiros de um hospital público de Goiânia e constataram que, dos entrevistados, 75,6% compreenderam as precauções padrão como medidas de proteção, somente 1,2% não conseguiu expressar sua compreensão com clareza. Esta compreensão aponta para uma adequação cognitiva favorável a implementação das precauções padrão no cotidiano.

Mafrá et al.(2008) relatam em seu trabalho sobre “a importância para os enfermeiros do uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) no atendimento de suporte avançado em um serviço móvel de urgência” que os enfermeiros tem consciência da importância do uso de EPI, porém não fazem uso devido com frequência adequada,

comprovado pelo que foi evidenciado nas amostras – 100% usavam luvas, botas e macacão; 41,6% utilizavam máscaras e somente 16,6% utilizavam óculos de proteção em todos os atendimentos, ficando evidente que é necessário que se adote mudanças para evitar exposições ocupacionais no atendimento pré-hospitalar.

Todas as profissões de saúde vivenciam suas atividades em estabelecimentos de saúde, que podem ser comuns a algumas especialidades, assim sendo, há a importância de se discorrer sobre as práticas da Biossegurança em alguns estabelecimentos de saúde. As atividades desenvolvidas no hospital, em especial aquelas realizadas em setores fechados como a UTI, são consideradas de risco à saúde. Isto se dá porque o atendimento proporcionado ao cliente é diferenciado, demandando agilidade e habilidade da equipe de enfermagem, que lida não só com situações emergenciais nas quais o cliente pode estar em risco de vida, mas também com tecnologias avançadas, exigindo uma permanente atualização de conhecimentos técnicos e científicos.

5.3. Farmácia

Os farmacêuticos têm o exercício de sua profissão regulamentado pelo Decreto 85.878 de 01/04/1981 que no seu Art. 1º determina que sejam atribuições privativas dos farmacêuticos o desempenho de funções de dispensação ou manipulação de fórmulas magistrais e farmacopéicas, quando a serviço do público em geral ou mesmo de natureza privada; a eles também é permitido o assessoramento e responsabilidade técnica nas atividades exercidas em estabelecimentos industriais farmacêuticos em que se fabriquem produtos que tenham indicações e/ou ações terapêuticas, anestésicos ou auxiliares de diagnóstico, ou capazes de criar dependência física ou psíquica. Assessorar ou ser responsável por órgãos, laboratórios, setores ou estabelecimentos farmacêuticos em que se executem controle e/ou inspeção de qualidade, análise prévia, análise de controle e fiscal de produtos que tenham destinação terapêutica, anestésica ou auxiliar de diagnósticos ou capazes de determinar dependência física ou psíquica. Estes também devem ser os responsáveis em laboratórios, setores ou estabelecimentos farmacêuticos em que se pratique extração, purificação, controle de qualidade, inspeção de qualidade, análise prévia, análise de controle e análise fiscal de insumos farmacêuticos de origem vegetal, animal e mineral.

As atividades dos farmacêuticos podem ser desenvolvidas em vários locais como: drogarias e farmácias de manipulação, homeopáticas e antroposóficas, hospitais,

clínicas, seguradoras de saúde e outras instituições. Além das indústrias de medicamentos, alimentos, cosméticos, fitoterápicos, correlatos, kits reagentes, dentre outras. Na saúde coletiva e legislação. Na pesquisa e educação e em outras oportunidades como empresas de biotecnologia, nanotecnologia, gases medicinais, entre outras.

Segundo Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 214 de 12 de dezembro de 2006 (ANVISA), em seu Anexo I, o qual estabelece requisitos mínimos de Boas Práticas de Manipulação em Farmácias (BPMF) a serem observados durante a manipulação, conservação e dispensação de preparações magistrais, oficinais e de outros produtos de interesse da saúde bem como para aquisição de matérias-primas e materiais de embalagens. As diretrizes englobam as exigências mínimas para as instalações físicas de uma farmácia que deve possuir: áreas ou salas para as atividades administrativas; área ou sala de armazenamento; área ou sala de controle de qualidade; sala ou local de pesagem de matérias-primas; sala de manipulação; área de dispensação; vestiário; sala de paramentação sanitários; área ou local para lavagem de utensílios e materiais de embalagem; depósito de material de limpeza.

O Manual de Biossegurança (Universidade Federal da Bahia, 2001) também aborda sobre as Normas de Biossegurança nos ambientes farmacêuticos e enfatiza sua grande relevância, os mesmos devem ser seguidos de acordo com a especificidade dos procedimentos:

- **Farmácias de Dispensação**

- A utilização de Equipamentos de Proteção Individual deve ser respeitada dentro dos mesmos padrões preconizados pelas Precauções Padrão.
- A lavagem das mãos é imprescindível.
- O cuidado com os medicamentos devem obedecer às recomendações da Vigilância Sanitária.
- A comercialização dos perfuro cortantes deve ser observada com cuidado.
- O descarte de medicamentos vencidos ou com embalagens violadas devem ser estruturados e programados com antecedência sob o auxílio da Vigilância Sanitária e das instituições de descarte de resíduos tóxicos. Deve cumprir o que normatiza a Portaria de nº802 de 08 de outubro de 1998 (ANVISA) que institui Sistema de Controle e Fiscalização em toda a cadeia dos produtos farmacêuticos no seu inciso VIII do art. 13: “identificar e devolver, ao titular do registro, os produtos com prazo de validade vencido, mediante operação com nota fiscal, ou, na impossibilidade desta devolução, solicitar orientação à autoridade sanitária competente de sua região.”

- **Farmácias de Manipulação**

A manipulação deve ser cuidadosa e com precaução conforme aconselhamento e indicação para manipulação de drogas tóxicas. As recomendações da utilização de EPI e também equipamentos de Proteção Coletiva devem ser seguidos, incluindo cabine ou capelas para manipulação dos produtos químicos. O armazenamento das drogas deve cumprir o que recomenda o fornecedor ou fabricante.

As Boas Práticas de Manipulação devem cumprir rigorosamente o que estipula a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 214 de 12 e dezembro de 2006(ANVISA), no Anexo I, item 3.3 - sobre Saúde, Higiene, Vestuário e Conduta, preconiza:

- O funcionário deve ser afastado temporária ou definitivamente de suas atividades quando for portador de solução de continuidade com lesão exposta (cortes ou feridas) em obediência à legislação específica.
- Não será permitido o uso de cosméticos, jóias ou quaisquer objetos de adorno de uso pessoal em áreas de pesagem e manipulação.
- Todas as condições de risco relacionadas aos produtos que estão sendo manipulados, ao ambiente, aos equipamentos ou as pessoas devem ser informadas aos superiores imediatos.
- Os equipamentos de proteção Individual (EPI) devem ser fornecidos, gratuitamente, em quantidade suficiente e reposição periódica pelas farmácias, além da orientação quanto ao uso, manutenção, conservação e descarte.
- Os manipuladores de produtos estéreis devem atender a um alto nível de higiene e serem instruídos quanto à lavagem correta das mãos e antebraços, com escovação das unhas, utilizando antisséptico padronizado, que deve ser realizada na sala de paramentação onde também deve ser feita a paramentação do manipulador.
- A exigência de higiene pessoal e paramentação devem ser extensivas a todas as pessoas que tiverem acesso a sala de manipulação.
- A farmácia deve dispor de vestiário para a guarda dos pertences dos funcionários e colocação de uniformes.
- Os funcionários envolvidos na manipulação de preparações estéreis devem estar uniformizados para proteção da preparação contra a contaminação e, estes uniformes devem ser trocados a cada sessão de manipulação para assegurar uma higiene apropriada.
- O tecido dos uniformes não deve liberar partículas ou fibras e deve proteger quanto a liberação de partículas naturais do corpo.

- Os uniformes, luvas e máscaras devem ser estéreis e trocados a cada sessão de manipulação. As luvas estéreis devem ser trocadas a cada duas horas de trabalho de manipulação e sempre que sua integridade estiver comprometida.
- As superfícies de trabalho, inclusive as internas da capela de fluxo laminar devem ser limpas e desinfetadas antes e depois de cada sessão de manipulação efetuando os respectivos registros.

- **Farmácia de Unidade Hospitalar**

Segundo Resolução CFF nº300 de 30 de janeiro de 1997, no seu art. 1º conceitua Farmácia de Unidade Hospitalar como: “unidade clínica de assistência técnica e administrativa, dirigida por farmacêutico, integrada funcional e hierarquicamente às atividades hospitalares.”

A farmácia hospitalar deve primar, em suas atividades, pela ausência de erros que possam colocar em risco a terapêutica e conseqüentemente a saúde do paciente.

A farmácia hospitalar tem suas funções reguladas pela Resolução CFF nº300 de 30 de janeiro de 1997, que em seu Art. 2º determina que a mesma tem que garantir a qualidade de assistência prestada ao paciente através do uso seguro e racional de medicamentos e seus correlatos e que estes sejam adequados a saúde individual e coletiva no âmbito assistencial, preventivo, docente e de investigação, devendo possuir um número suficiente de farmacêuticos para o bom desempenho da assistência farmacêutica.

As ações de Biossegurança devem obedecer as mesmas normas preconizadas pela Instituição, conforme seu Art 4º item I - “cumprir e fazer cumprir a legislação atinente as atividades hospitalares e relativas a assistência farmacêutica.”

5.4 . Fisioterapia e Terapia Ocupacional

As profissões de Fisioterapia e Terapia Ocupacional são regulamentadas pelo Decreto lei nº 938 de 13 de outubro de 1969 e Resolução nº 8 do COFFITO de 31 de agosto de 2007, que provera no seu Art. 3º: “constituem atos privativos do **Fisioterapeuta**: prescrever, ministrar e supervisionar terapia física, que objetive preservar, manter, desenvolver ou restaurar a integridade de órgão, sistema ou função do corpo humano.”

As especialidades da fisioterapia encontram-se distribuídas em várias Resoluções do COFFITO sob os n.ºs 188, 189, 219, 260, 337, 351, 362, 363, 364 e 365, sendo as quatro últimas são mais recentes, de 20 de maio de 2009.

Os fisioterapeutas podem atuar em diversos estabelecimentos como: hospitais (enfermarias clínicas e cirúrgicas, unidades de terapia intensiva, ambulatórios), consultórios, centros de reabilitação, na promoção de saúde coletiva (programas institucionais, ações básicas de saúde, fisioterapia do trabalho, vigilância sanitária), na educação (docência, atividades de extensão, pesquisa, supervisão técnica e administrativa, direção e coordenação de cursos), além de indústrias (produção de equipamentos de uso da fisioterapia ou na prevenção de doenças ocupacionais) e forte atuação no esporte (clubes e academias na prevenção / tratamento de lesões esportivas) e estética.

De acordo com o Protocolo das Ações de Vigilância Sanitária – ANVISA (2007) para clínicas ou consultório de fisioterapia as ações de vigilância consistem em: condições adequadas de acondicionamento e funcionamento dos equipamentos, aparelhos, materiais e mobiliários; observar os procedimentos de manutenção sistemática - preventiva e corretiva dos equipamentos; verificar as técnicas e rotinas de descontaminação e limpeza de superfícies e ambientes, de assepsia e desinfecção dos equipamentos, bem como, da obrigatoriedade de uso de lençóis/campos descartáveis ou de utilização individual/pessoal; observar a identificação, e a concentração dos produtos usados na limpeza e desinfecção.

Os fisioterapeutas possuem uma clientela que variam desde atletas a indivíduos imunodeprimidos, e devido a isso, os planos para implementação de normas e procedimentos de controle de infecção devem adequar-se a esta variedade de pacientes e a possibilidade de disseminação de doenças contagiosas para esses pacientes.

Ainda no Decreto lei nº 938 de 13 de outubro de 1969 e resolução também fica estipulado as funções dos Terapeutas Ocupacionais no Art. 4º. “constituem atos privativos do **Terapeuta Ocupacional:** prescrever, ministrar e supervisionar terapia ocupacional, objetivando preservar, manter, desenvolver ou restaurar a capacidade funcional do cliente a fim de habilitá-lo ao melhor desempenho físico e mental possível, no lar, na escola, no trabalho e na comunidade”.

As diversas especialidades da terapia ocupacional estão contempladas na Resolução COFFITO n.º 371 de 06 de novembro de 2009, onde se encontram nominadas sete especialidades de competência do terapeuta ocupacional.

Os locais de atuação profissional do terapeuta ocupacional também são abrangentes, tais como: hospitais, clínicas, centros de reabilitação e/ou de atenção psicossocial, unidades básicas de saúde, unidades de convivência e escolas que atendem crianças e adolescentes portadores de necessidades especiais são alguns dos locais em que esses profissionais atuam. A população atendida pelo profissional é numericamente significativa e a política de saúde, de educação e outros programas sociais podem favorecer ou não o campo de atuação do terapeuta ocupacional.

O terapeuta ocupacional, assim como todos os profissionais de reabilitação, depende de sua habilidade técnica e da resposta do paciente para alcançar seu objetivo terapêutico. Assim, estes profissionais são impulsionados a buscar o aprofundamento de seus princípios e procedimentos devendo aprender a prevenir, preparar e promover o desenvolvimento humano, reconhecendo que o envolvimento terapêutico e a motivação são fundamentais para a reabilitação. Este envolvimento clínico/terapêutico como paciente exige que estes profissionais conheçam e apliquem medidas de Biossegurança em todas as suas tarefas laborais.

Assim as normas de Biossegurança a serem aplicadas por estes profissionais também variam de acordo com o ambiente de trabalho e condição de saúde do paciente, sendo as mesmas aplicadas nas outras áreas de saúde.

5.5. Fonoaudiologia

O exercício da profissão do fonoaudiólogo está regido pela Lei 6.965 de 9 de dezembro de 1981 e regulamentada pelo Decreto nº 87.218 de 31 de maio de 1982 que normatiza para estes profissionais o desenvolvimento do trabalho de prevenção no que se refere à área de comunicação escrita e oral, voz e audição; que participem de equipes de diagnóstico, realizando a avaliação da comunicação oral e escrita, voz e audição; realizem terapia fonoaudiológica dos problemas de comunicação oral e escrita, voz e audição; realizem o aperfeiçoamento dos padrões da voz e fala; colaborem em assuntos fonoaudiológicos ligados a outras ciências; além de projetar, dirigir ou efetuar pesquisas fonoaudiológicas promovidas

por entidades públicas, privadas, autárquicas e mistas; lecionar teoria e prática fonoaudiológicas; dirigir serviços de fonoaudiologia em estabelecimentos públicos, privados, autárquicos e mistos; supervisionar profissionais e alunos em trabalhos teóricos e práticos de Fonoaudiologia.

A prática na fonoaudiologia extrapola o ambiente de consultórios e clínicas multiprofissionais, atingindo também instituições hospitalares, maternidades, escolas, postos de saúde, creches e asilos, clínicas-escola, além do atendimento em domicílio e *home-care*. Desta maneira, com o relacionamento entre as diversas áreas da saúde, o fonoaudiólogo depara-se com a necessidade de execução de procedimentos e rotinas de áreas afins que determinam a necessidade de seguir cuidados específicos durante a fonoterapia e adotar medidas de controle de infecções. Assim como todo profissional da área da saúde, o fonoaudiólogo, independente do seu ambiente de trabalho, deve desenvolver um sentido de responsabilidade com relação à sua própria segurança e de seus pacientes. Para tal, é necessária a aquisição de conhecimentos acerca de como os danos podem ser provocados e de que maneira se pode evitá-los, a fim de incorporar práticas seguras às rotinas diárias (CFFa, 2007).

Nesta área as medidas de precaução devem ser conhecidas e adotadas em todos os casos de contato físico com o paciente, estas condutas devem ser similares as das outras áreas do setor de saúde.

5.6. Medicina

De acordo com Art. 4º, do Projeto de lei nº 268 de dezembro de 2002, que dispõe sobre o exercício da medicina fica decretado quanto às atividades privativas do médico a formulação do diagnóstico nosológico; prescrição terapêutica medicamentosa; a intervenção cirúrgica; a indicação e a execução de procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos; a determinação do prognóstico.

Segundo pesquisa realizada por Machado (1996), a maioria dos médicos indicou exercer a Medicina no consultório (74,7%) e no setor público (69,7%); uma menor porcentagem o fez com referência ao setor privado (59,3%). Comparativamente, na presente pesquisa se observou uma redução do número de médicos que atuam no consultório (67%) e no setor privado (53,8%); porém, segue inalterada a porcentagem dos que exercem sua profissão no setor público (69,7%). Considerou-se também o exercício da Medicina no setor

filantrópico (20,3%) e como docente (18,9%), o que sugere a diversidade de campos de atuação do médico. A este respeito, criou-se um índice do número de atividades exercidas pelo médico, o que também foi feito na pesquisa prévia.

O trabalho no setor público tem sido realizado principalmente nos hospitais públicos (56,6%), assim como na pesquisa anterior (55,1%). Entretanto, os postos e unidades básicas de saúde, onde antes trabalhavam 1,3% dos médicos, atualmente são ocupados por 14,3%. Já no setor privado a maioria atua em instituições que têm convênios exclusivos com planos privados de saúde (48,2%) e em unidades que atendem, ao mesmo tempo, planos e SUS (28,7%).

Os hospitais são considerados ambientes que podem predispor, aqueles que nele trabalhem ou circulem à fatores de riscos de graus e tipos variáveis, principalmente com relação as doenças infectocontagiosas e aquelas contraídas em contato direto com pacientes e/ou com artigos e equipamentos contaminados com material orgânico. A grande variedade de serviços existentes a nível hospitalar tais como: administrativos, ambulatoriais, atendimentos clínicos/cirúrgicos, lavanderia, refeitório, manutenção, caldeiras, almoxarifado, laboratório, centro cirúrgico, raios-X, isolamento, Unidade de Terapia Intensiva, tende a predispor as pessoas as contrair doenças ou se expor a acidentes.

No Brasil, a Lei nº 9.431 de 6 de janeiro de 1997 dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país de um programa de controle de infecções hospitalares e a Portaria nº 2.616/MS/GM de 12 de maio de 1998 que norteia a sua operacionalização por meio da organização de uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e Serviço de Controle de infecção Hospitalar (SCIH). Assim, embora haja uma política que gerencie as ações de CIH nos hospitais os serviços oferecidos são variados não se obtendo uma operacionalização completa em do processo de trabalho recomendado.

Nas clínicas, muitas vezes os indivíduos infectados não podem ser identificados quanto à sua saúde geral. Dessa forma, recomenda-se que medidas e protocolos de controle de infecção dependam do procedimento a ser realizado e não do paciente a serem atendidos para cumprimento das Precauções Padrão.

5.7. Nutrição

Segundo a Lei nº8.234 de 17 de setembro de 1991 os nutricionistas podem exercer atividades de direção, coordenação, supervisão e docência nos cursos de graduação

em nutrição e áreas afins, assim como também nos serviços de alimentação, nutrição e estudos de dietéticos, através de planejamento, organização, direção, supervisão e avaliação destes. Podem também exercer cargos de auditoria, consultoria e assessoria em nutrição e dietética; prestarem assistência e educação nutricional a coletividades ou indivíduos, sadios ou enfermos tanto em instituições públicas e privadas como em consultórios de nutrição e dietética. A assistência dietoterápica a nível hospitalar, ambulatorial e em consultórios prescrevendo, planejando, analisando, supervisionando e avaliando dietas para enfermos.

Na Resolução CFN nº380 de 12 de dezembro de 2005, o Conselho Federal especifica as áreas de atuação do nutricionista:

- Alimentação Coletiva
- Nutrição Clínica
- Saúde Coletiva
- Docência
- Indústria de Alimentos
- Nutrição em Esportes
- Marketing na Área de alimentação e Nutrição

Considera-se normatizações de Biossegurança com relação a Nutrição o que reza os subitens relativos ao Item I, no Anexo II, desta mesma Resolução “coordenar e supervisionar métodos de controle das qualidades organolépticas das refeições e/ou preparações, por meio de testes de análise sensorial de alimentos; elaborar e implantar o Manual de Boas Práticas, avaliando e atualizando os procedimentos operacionais padronizados (POP) sempre que necessário; planejar, implantar, coordenar e supervisionar as atividades de higienização de ambientes, veículos de transporte de alimentos, equipamentos e utensílios; planejar, coordenar, supervisionar e/ou executar programas de treinamento, atualização e aperfeiçoamento de colaboradores...”

É imprescindível a elaboração de Manual de Boas Práticas para Manipulação de Alimentos (MBPMA), juntamente com a implantação dos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP), regulamentados através da Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, e o sistema de Análise de Perigos de Pontos Críticos de Controle (APPCC) para constituírem os programas de segurança alimentar.

A RDC nº 216/04 – ANVISA preconiza todos os cuidados atinentes as áreas laborais e pessoal envolvido no preparo de alimentos como: área de preparação do alimento deve ser

higienizada quantas vezes forem necessárias e imediatamente após o término do trabalho. Substâncias odorizantes e ou desodorantes em quaisquer das suas formas não devem ser utilizadas nas áreas de preparação e armazenamento dos alimentos. Os funcionários responsáveis pela atividade de higienização das instalações sanitárias devem utilizar uniformes apropriados e diferenciados daqueles utilizados na manipulação de alimentos. Os manipuladores devem ter asseio pessoal, apresentando-se com uniformes compatíveis à atividade, conservados e limpos. Os uniformes devem ser trocados, no mínimo, diariamente e usados exclusivamente nas dependências internas do estabelecimento. As roupas e os objetos pessoais devem ser guardados em local específico e reservados para esse fim. Os manipuladores devem lavar cuidadosamente as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após manipular alimentos, após qualquer interrupção do serviço, após tocar materiais contaminados, após usar os sanitários e sempre que se fizer necessário. Durante a preparação dos alimentos, devem ser adotadas medidas a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada. Deve-se evitar o contato direto ou indireto entre alimentos crus, semi-preparados e prontos para o consumo.

Com relação aos Procedimentos Operacionais Padronizados – POPs devem ser desenvolvidos, implementados e mantidos pelos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos com relação aos itens abaixo:

- a) Higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios.
- b) Controle da potabilidade da água.
- c) Higiene e saúde dos manipuladores.
- d) Manejo dos resíduos.
- e) Manutenção preventiva e calibração de equipamentos.
- f) Controle integrado de vetores e pragas urbanas.
- g) Seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens.
- h) Programa de recolhimento de alimentos.

5.8. Odontologia

O exercício da odontologia é regulamentado pela Lei de nº5.081 de 24 de agosto de 1966, na qual no seu Art. 6º decreta compete ao cirurgião-dentista: prescrever e

aplicar as especialidades farmacêuticas de indicação em odontologia (uso interno e externo); realizar todos os atos pertinentes aos conhecimentos adquiridos em odontologia tanto na graduação como em curso de pós-graduação; emitir atestados relativos a estados mórbidos e outros, para justificar faltas ao emprego ou similares; realizar procedimentos relativos à perícia odontológica em foro civil, criminal, trabalhista e em sede administrativa; empregar anestésias locais e por bloqueio de nervos do terço médio da face; utilizar a analgesia e hipnose, quando for comprovadamente habilitado e estes meios forem eficazes para o tratamento; possuir instalações adequadas para pesquisas e análises clínicas relacionadas com a especialidade, laboratório de prótese, aparelho de Raios X (para diagnóstico) e aparelhagem de fisioterapia; estar apto para prescrever e aplicar medicação de urgência no caso de acidentes graves que comprometam a saúde ou vida do paciente; nos casos de exercer a função de perito-odontólogo utilizar as vias de acesso de cabeça e do pescoço para necropsias.

As especialidades exercidas pelos cirurgiões dentistas encontram-se nominadas no Art 4º da Portaria CFO nº 22/2001 de 27 de dezembro de 2001 que designa as 19 especialidades da Odontologia, adicionalmente a esta resolução, a Resolução de nº25/2002 de 16 de maio de 2002 estipula as áreas de competência de mais cinco especialidades totalizando vinte e quatro especialidades na odontologia.

Os dentistas, assim como as demais especialidades exercem sua profissão nos mais variados estabelecimentos de saúde, na docência, em serviços públicos, privados, filantrópicos dentre outros.

As Normas de Biossegurança para odontologia podem ser encontradas em vários manuais, dentre eles, Manual de Biossegurança (CFO, 1999) e Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos (ANVISA, 2006). As medidas básicas de prevenção do controle de infecção são similares as das demais áreas, mais existem muitas especificidades com relação a manipulação e processamento dos instrumentos e equipamentos utilizados pelos dentistas, devido a sua grande proximidade da cavidade bucal e manipulação de fluidos orgânicos (sangue, saliva, pus, entre outros).

Com relação à aplicabilidade das Precauções Padrão pelo menos quatro princípios preconizados devem ser seguidos:

Princípio 1 – Adotar medidas para proteger a saúde da equipe, tais como:

- Anamnese do paciente – história médica atual e pregressa; medicamentos em uso; transfusões de sangue; se são portadores de doenças sistêmicas e infecciosas etc.

- Imunização da equipe de trabalho – hepatite B, influenza, tríplice viral e dupla tipo adulto, BCG – ID para os profissionais não reagentes ao teste tuberculínico e as específicas as doenças regionais e população.
- Lavagem das mãos – medida importante para a prevenção e controle de infecção. Alguns dados devem ser observados como o conhecimento do tipo de flora microbiana da pele, que pode ser: residente onde os microrganismos vivem e se multiplicam possuindo patogenicidade variável, sendo que esta flora é constituída em sua maioria por bactérias Gram positivas e não são removidas facilmente, porém alguns antissépticos conseguem inativá-las. Na flora transitória os microrganismos encontram-se mais na superfície da pele sendo esta população bastante variável e removível com a lavagem das mãos.

Outro fator relevante com relação à lavagem das mãos e demais proteção é o tipo de procedimento que será realizado no paciente se crítico (com penetração no sistema vascular, isto é contato com sangue); semi-crítico (com contato com as secreções orgânicas do paciente) ou não-crítico (não há contato com nenhuma secreção ou excreção do paciente).

- Antissepsia intra ou extrabucal, para redução da carga microbiana nestas áreas.

Princípio 2 – Evitar contato direto com matéria orgânica; através:

- Uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) – gorro, máscara, óculos de proteção, avental ou jaleco e luvas.

Princípio 3 – Limitar a propagação de microrganismos, diminuindo a quantidade de aerossóis gerados durante o atendimento através do uso de: sugadores potentes com bomba a vácuo; sistemas de filtragem de ar e uso de antissépticos bucais para o paciente.

Princípio 4 – Tornar seguro o uso de artigos, peças anatômicas e superfícies.

- Cuidados com a reutilização de instrumentais (Figura 2): “todo instrumental reutilizável empregado em serviços de saúde deve ser rigorosamente limpo, desinfetado ou esterilizado.” Devendo ser considerado o tipo de instrumental que deverá ser reprocessado se, crítico (geralmente descartável ou obrigatoriamente esterilizado), semi-crítico (esterilizado ou desinfetado) ou não-crítico (limpo e desinfetado) (CFO, 1999).

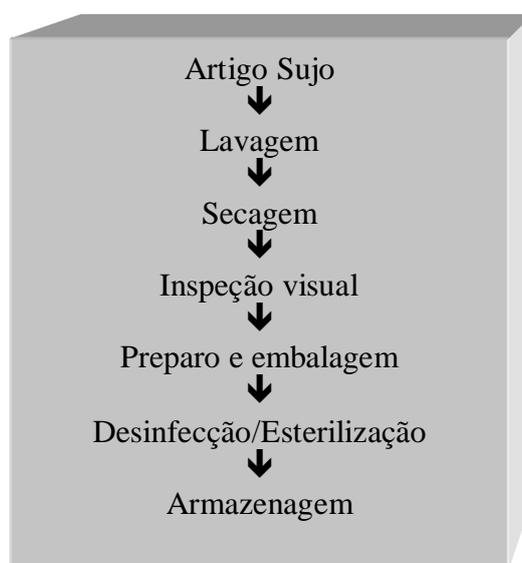


Fig. 02 – Sequência do processamento de artigos – adaptado ANVISA (2006)

- Processamento de superfícies e equipamentos odontológicos – limpar e desinfetar. Os pisos devem ser desinfetados com desinfetantes compatíveis com a área a ser processada se crítica, semi-crítica ou não crítica, geralmente com hipoclorito de sódio ou fenol sintético, atentando para o tipo de material do piso. Estes devem ser limpos e desinfetados a cada turno ou quando contaminados durante um procedimento. Os equipamentos e periféricos devem ser limpos com água e sabão neutro e desinfetados com álcool 70%. O recobrimento de superfícies dos equipamentos com barreiras impermeáveis é importante como barreira aos contaminantes.

Outros cuidados importantes:

- Manipular cuidadosamente o material perfurocortante.
- Não reencapar, entortar, quebrar ou retirar as agulhas das seringas. Se o paciente precisar de complementação anestésica de uma única seringa, a agulha pode ser reencapada pela técnica de deslizar a agulha para dentro da tampa deixada sobre uma superfície (bandeja do instrumental ou mesa auxiliar). Quando utilizamos seringas carpules reutilizáveis (embora existam descartáveis) após o atendimento do paciente remover a agulha com um porta agulhas ou similares. Outra opção é realizar a remoção no próprio coletor de perfuroscortantes que possui orifício para adaptação da agulha.

- Transferir os materiais e artigos, durante o trabalho a quatro mãos, com toda a atenção e, sempre que possível, utilizando-se uma bandeja.
- Manter as caixas de descarte dispostas em locais visíveis e de fácil acesso e não preenchê-las acima do limite de 2/3 de sua capacidade total.
- Efetuar o transporte dos resíduos com cautela para evitar acidentes.
- Não tocar os olhos, nariz, boca, máscara ou cabelo durante a realização dos procedimentos ou manipulação de materiais orgânicos, assim como não se alimentar, beber ou fumar no consultório.
- Durante os procedimentos (com luvas), não atender telefones, abrir portas usando a maçaneta nem tocar com as mãos em locais passíveis de contaminação.

5.9. Psicologia

A regulamentação do exercício da Psicologia esta inserida na Lei nº4.119/62 e Decreto nº 53.464/64 de 21 de janeiro de 1964 que dispõem no seu Art. 4º- sobre as funções do psicólogo “utilizar métodos e técnicas psicológicas com o objetivo de: diagnóstico psicológico; orientação e seleção profissional; orientação psicopedagógica; solução de problemas de ajustamento...”

A Resolução 014/00, do Conselho Federal de Psicologia, instituiu o título profissional de Especialista em Psicologia, dispondo sobre as normas e os procedimentos para o respectivo registro do título, tendo sido aprovada dez especialidades.

Os psicólogos atuam em locais similares aos das outras áreas da saúde como: serviços de psicologia em órgãos e estabelecimentos públicos, autárquicos, paraestatais, de economia mista e particular.

As normas de Biossegurança devem ser preconizadas similarmente com base nos princípios das precauções.

Capítulo 6 – Infecção nos Ambientes de Saúde

Todos os setores de saúde objetivam garantir a qualidade e segurança dos serviços oferecidos através do controle de níveis de infecção, com adoção de estratégias efetivas baseadas na prevenção da transmissão entre os trabalhadores da saúde, pacientes e visitantes.

Para que se instale uma infecção é necessária que haja desequilíbrio na cadeia de interação entre hospedeiro, microrganismo e meio ambiente, conforme visualizado na Figura 3.

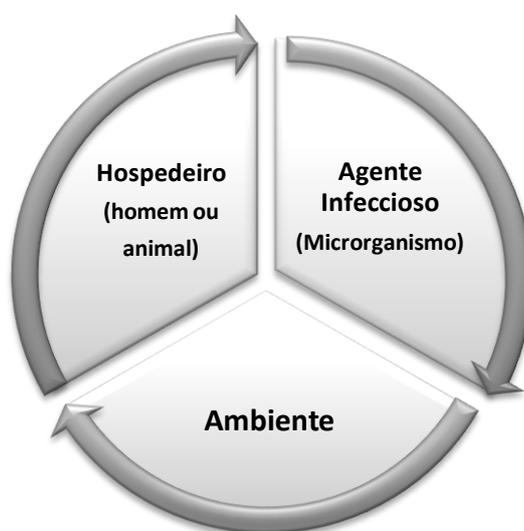


Fig. 03. Fatores que interferem na cadeia da infecção

A cadeia epidemiológica da infecção hospitalar apresenta “seis elos”: o agente infectante; reservatórios ou fonte; vias de eliminação; transmissão; penetração e hospedeiro suscetível.

O comportamento do patógeno, que pode ser bactéria, vírus, fungos, parasitas ou príons, na população está fortemente influenciado pela relação harmônica entre estes três fatores, mudanças em qualquer um deles, podem causar um desequilíbrio nesta relação estreita, aumentando a probabilidade de ocorrer transmissão e doença (Bannister et al., 2000).

Dentre as mudanças ou situações que podem expor o **hospedeiro** – último elo da cadeia epidemiológica, podendo ser o paciente ou profissional que recebe a carga microbiana e que esteja suscetível a adquirir uma infecção – destaca-se: má higiene, tipo de trabalho, viagens, comportamento sexual, aglomeração, imunidade, estado nutricional e doenças atuais ou pregressas. Nestas condições, deve-se levar em consideração também os fatores de virulência do **agente patogênico** como sua infecciosidade, patogenicidade e capacidade para sobreviver no hospedeiro sob diferentes condições ambientais. Ademais, há outros fatores de relevância relacionados com os microrganismos, como sua habilidade de resistir às respostas imunes do hospedeiro (vacinas), utilização pelo indivíduo de drogas, imunossupressores e radiação que vem surtir importante efeito na instalação das doenças. Fatores relacionados ao **meio ambiente** como temperatura, poeira, umidade, uso de produtos como antibióticos, antissépticos ou antimicrobianos, podem atuar na sobrevivência de agentes patogênicos fora do hospedeiro (Bannister et al., 2000 & Ijaz 2009).

Outro fator preponderante na exposição dos serviços de saúde são as **fontes** – objetos inanimados ou animados que transportam o agente infeccioso do reservatório para o hospedeiro suscetível. Estas fontes podem ser de origem **endógena**, (agentes infecciosos que colonizam previamente o paciente, decorrentes de sua própria microbiota), ou **exógena** quando os agentes são de origem externa ao paciente como instrumentos contaminados ou inoculados através de cateteres, pelas mãos do profissional, medicamentos ou soros contaminados (Garner, 1996). Os principais fatores de risco para que ocorra uma contaminação endógena podem ser a idade avançada, tempo de internação prolongado, doenças de base com diabetes e obesidade, procedimentos invasivos, cateteres, ventilação mecânica, cirurgias, imunossupressores como quimioprofilaxia, transplantes de órgãos ou tecidos, uso de antimicrobianos, dentre outros. A determinação das características dos microrganismos é importante para identificar-se a origem da infecção.

Os **reservatórios** – habitat dos agentes infecciosos devem ser considerados também pelos profissionais da saúde, sendo os mais comuns o homem, animal ou meio ambiente, nos quais os patógenos existem e de onde são transmitidos. De acordo com Bannister et al, (2000), esta transmissão pode ocorrer de pessoa para pessoa, por contaminação horizontal, entre indivíduos da mesma população e contaminação vertical, da mãe para o feto.

Ressalta-se ainda, que os meios de transmissão dentro do ambiente de saúde podem ser variados como: i) **contato direto**, isto é, pelo contato que ocorre entre as pessoas; ii) **contato indireto**, através de fômites ou mãos dos profissionais de saúde, que portam microrganismos adquiridos e um paciente para outro; iii) **fonte comum**, quando há um objeto, produto ou medicamento contaminado que é utilizado por um ou mais pacientes; iv) **gotículas**, produzidas por um paciente e atingindo outro, com distância de até um metro; v) **aerossóis**, gotículas expelidas que, após o ressecamento se transformam em núcleos de gotículas com dimensão menor que 5µm podendo ficar por um longo período em suspensão e atingirem longas distâncias (tipo de transmissão da tuberculose, sarampo e varicela); e vi) **vetores**, com atuação de vários elementos, como insetos (Mandall et al., 2004 & HPS, 2009). Assim, o conhecimento destas rotas é de grande relevância para que o profissional neste entendimento procure evitar ou interceptar as transmissões de doenças.

A **infecção** é a consequência de danos que decorrem da invasão, multiplicação, elaboração de toxinas e/ou outros metabólitos microbianas no hospedeiro. Pode haver manifestação imunológica e aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam a doença ou síndrome. Entende-se por **doença infecciosa** manifestação com sinais e sintomas clínicos relacionados ao agente etiológico, sendo que este geralmente não pertence a microbiota humana normal, tendo sua origem exógena. Na **síndrome infecciosa** os sinais e sintomas não estão relacionados com o agente etiológico e estes geralmente pertencem a microbiota humana normal.

Capítulo 7 – Infecção Hospitalar

As atividades em estabelecimentos de saúde requerem um esforço conjunto para que se apliquem as práticas de controle de infecção envolvendo não só os trabalhadores mais essencialmente as políticas públicas sociais. No ambiente hospitalar, a responsabilidade da conscientização e atuação efetiva, deve ser voltada para a prevenção e controle da infecção hospitalar (CIH), embora se saiba que nem toda IH possa ser prevenida – devido a microbiota endógena do paciente ser a principal fonte de IH. Porém há estimativas de que 20% a 30% das infecções adquiridas nos hospitais são passíveis de prevenção (Pereira et al., 2005). A infecção hospitalar é oriunda de situações em que o paciente sofre alterações em suas condições orgânicas e imunológicas – doença de base, estado nutricional, idade, dentre outros fatores, deixando-o mais suscetível a adquirir infecções

No Brasil, as práticas de controle de infecção hospitalar são regidas pela lei nº 9.341/97 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares (PCIH) pelos hospitais do país e pela Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998, que expedem diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. No Anexo II desta portaria, conceituam-se as infecções nosocomiais: “Infecção Hospitalar é aquela adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares”. A “Infecção Comunitária é a infecção constatada ou em incubação no ato da admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital”. Ademais, a ANVISA, através da Resolução - RDC nº 48, de 2 de junho de 2000, edita um Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar, onde esta contido uma sistemática para avaliação do cumprimento das ações do Programa de Controle de Infecção Hospitalar. Desde a publicação das orientações dos “Centers for Diseases Control” (CDCs), em 1983, e outros estudos, pesquisas nacionais e internacionais, substanciais alterações ocorreram nos conceitos de transmissão, prevenção e controle de infecção hospitalar. (MS, 1998)

As infecções hospitalares são as mais frequentes e importantes complicações ocorridas em pacientes hospitalizados, enquanto as estatísticas apresentavam taxas de incidência de IH que variavam e 3,5% a 15,5% nos EUA e prevalência de 9,2% no Reino Unido. Nos países latino-americanos avaliavam-se taxas de prevalência variando de 5% a

70%. No Brasil, estima-se que 5% a 15% dos pacientes internados contraem alguma infecção hospitalar (Lacerda, 2003). Uma infecção hospitalar cresce, em média, 5 a 10 dias ao período de internação do paciente. Além disso, os gastos relacionados a procedimentos diagnósticos e terapêuticos da infecção hospitalar fazem com que o custo seja elevado, sem se cogitar nos danos relacionados ao paciente.

Dentre as síndromes mais importantes envolvendo infecções de origem hospitalar, não só pela sua frequência como também pela gravidade e sua morbi-mortalidade, destacam-se: infecções do trato urinário; infecções das vias respiratórias; infecções da corrente sanguínea; infecções do sítio cirúrgico; outras localizações de infecções hospitalares. Vale ressaltar que a infecção hospitalar não é uma doença infecciosa simples. Esta condição provém das práticas de assistência a saúde principalmente aquelas consideradas invasivas. Assim sendo, a infecção hospitalar deve ser analisada no âmbito da assistência a saúde como forma de implementação de uma política preventiva (Lacerda, 2003).

Segundo Pereira (2005), os microrganismos que predominam nas IH raramente causam infecções em outras situações, por apresentarem baixa virulência, mas em decorrência do elevado inóculo e da queda de resistência do hospedeiro, o processo infeccioso pode se desenvolver. Aproximadamente dois terços das IH são de origem autógena, significando o desenvolvimento da infecção a partir da microbiota do paciente, que pode ter origem comunitária ou intra-hospitalar. Em ambas as situações, a colonização precede a infecção, sendo difícil determinar se o paciente trouxe o microrganismo da comunidade ou adquiriu de fonte exógena durante a internação.

Diferentes microrganismos como bactérias, fungos, e vírus podem causar infecções hospitalares. O grupo de patógenos, no entanto, que se destaca é o das bactérias que constituem a microbiota humana e que normalmente não trazem risco a indivíduos saudáveis, mas podem causar infecção em indivíduos com estado clínico comprometido – sendo denominadas bactérias oportunistas. Muitos organismos bacterianos podem causar IH, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* dentre outros. O segundo grupo de importância médica nas infecções hospitalares são os fungos, sendo a *Candida albicans* e *Aspergillus* os patógenos mais frequentes. Os fungos são responsáveis por aproximadamente 8% das infecções hospitalares. As viroses representam por volta de 5% das infecções, e os vírus entéricos e com habilidade

de transmissão aérea são os mais importantes no ambiente nosocomial (David 1998 & Ijaz et al., 2008).

PARTE III-

CONTROLE DE INFECÇÃO NOS AMBIENTES DE SAÚDE

Capítulo 8: Métodos de Controle e Prevenção das Infecções nos
Serviços de Saúde

Capítulo 9: Precauções Padrão:

9.1- Higienização das Mãos;

9.2 - Uso Adequado de Equipamentos de Proteção
Individual;

9.3 - Cuidados com Instrumentos e Equipamentos;

9.4- Limpeza do Ambiente;

9.5- Materiais Perfurocortantes;

9.6- Manejo da Roupas Sujas/Contaminadas.

Capítulo 10: Precauções Baseadas na Transmissão

10.1- Precauções Aéreas ou Respiratórias (Aerossóis)

10.2- Precauções Respiratórias para Gotículas

10.3- Precauções por Contato

Capítulo 8 – Métodos de Controle de Infecção nos Serviços de Saúde

Segundo a Norma Regulamentadora nº 32 “entende-se por serviços de saúde qualquer edificação destinada à prestação de assistência à saúde da população, e todas as ações de promoção, recuperação, assistência, pesquisa e ensino em saúde em qualquer nível de complexidade” (MTE, 2005).

Nestes locais os profissionais estão expostos a riscos de várias origens: físicos, químicos, biológicos entre outros, sendo que através da NR nº 9 fica estabelecido que estes riscos são denominados de riscos ambientais assim conceituados: “consideram-se riscos ambientais os agentes físicos, químicos e biológicos existentes nos ambientes de trabalho que, em função de sua natureza, concentração ou intensidade e tempo de exposição, são capazes de causar danos à saúde do trabalhador”. Esta mesma norma estipula a obrigatoriedade da elaboração e implementação do Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA) por parte dos empregadores e instituições que admitam trabalhadores como empregados com o objetivo de preservar a saúde e integridade dos trabalhadores.

Com ênfase aos agentes biológicos, a NR nº 32 conceitua: “consideram-se Agentes Biológicos os microrganismos, geneticamente modificados ou não; as culturas de células; os parasitas; as toxinas e os príons” e estipula as medidas de proteção (MTE , 2005).

Capítulo 9 – Precauções Padrão

As novas diretrizes estabelecidas pela Centers for Disease Control and Prevention (CDC) em 1996, abrangem as Precauções Padrão e as Precauções baseadas por Transmissão.

As precauções padrão são consideradas as estratégias mais importantes para o sucesso no controle de infecção nos serviços de saúde. Elas são utilizadas para todos os pacientes independentes de diagnóstico ou percepção de um estado de infecção. A sua aplicação destina-se a reduzir o risco de transmissão de microrganismos a partir de fontes conhecidas ou desconhecidas dentro do sistema de saúde. (Osborne, 2003)

Segundo Rosdahl & Kowalski (2007), colocar uma barreira física, mecânica ou química entre o microrganismo e o indivíduo são meios altamente efetivos para prevenir a propagação de infecções. Além disso, existem algumas ações que criam barreiras de proteção para prevenir as infecções entre pacientes, profissionais, acompanhantes ou visitantes, dentre elas:

- Considerar cada pessoa como potencialmente infectada ou suscetível a infecção;
- Lavar as mãos, o mais importante procedimento para controle da infecção cruzada;
- Usar luvas, antes da manipulação de substâncias úmidas do organismo – pele com solução de continuidade, membranas mucosas, sangue e outros fluídos corporais, instrumentais, materiais e resíduos contaminados, ou antes, de procedimentos invasivos.
- Uso de barreiras físicas, óculos de proteção, máscara e aventais sempre que houver possibilidade de derramamento ou respingo de qualquer fluído.
- Uso de agentes antissépticos, para limpeza de pele e membranas mucosas – antes de cirurgias, curativos e para lavagem das mãos.
- Uso de práticas seguras de trabalho, não reencapar ou dobrar agulhas, segurança na passagem de instrumentos cortantes e suturas.

- Descartar de forma segura os resíduos infecciosos.
- Processar adequadamente instrumentos reutilizáveis e outros itens.

Além destas condutas é fortemente recomendável a vacinação preventiva de todos os profissionais da área de saúde.

As Precauções Padrão, que deve ser adotada por todos os profissionais de saúde, tem como componentes essenciais, segundo Tietjen et al., (2003), os seguintes princípios:

9.1. Higienização das Mãos – é um processo de remoção mecânica dos microrganismos potencialmente patogênicos que fazem parte da microbiota transitória das mãos além de sujidade, oleosidade, pelos e células descamativas. Este termo abrange a higienização simples, higienização antisséptica, fricção antisséptica e antisepsia cirúrgica das mãos. As mãos devem ser lavadas rotineiramente – antes e após contato com o paciente; quando forem contaminadas com sangue ou outros fluidos; após a retirada das luvas e antes e após cada procedimento relativo aos cuidados com o paciente (ANVISA, 2007).

A higienização das mãos deve ser conduzida em uma ordem sequencial, conforme figura abaixo:



Fig. 03- Sequência da lavagem das mãos.

Fonte : <http://www.sissaude.com.br/sissaude/userfiles/maos.jpg>

As técnicas para higienizar as mãos são eleitas de acordo com os procedimentos que forem realizados: **higienização simples** – com duração média de 10-15 segundos; **fricção antisséptica**, duração média de 1 minuto e a **antisepsia cirúrgica**,

primeira lavagem 5 minutos e as subsequentes 3 minutos. (ANCA & NHMRC, 2004). A higienização simples (com água e sabão) está indicada quando as mãos estiverem visivelmente sujas ou contaminadas com sangue e outros fluidos corporais, ao iniciar o turno de trabalho, após ir ao banheiro, antes e depois das refeições, antes de preparo e manipulação de alimentos e medicamentos. A higienização com preparação alcoólica tem sua indicação quando o profissional for ter contato com o paciente, após contato com o paciente, antes da realização de procedimentos assistenciais e manipulação de dispositivos invasivos, antes de calçar luvas para inserção de dispositivos invasivos que não requeiram preparo cirúrgico, após exposição a fluidos corporais, ao mudar de um sitio corporal contaminado para outro limpo, após contato com objetos inanimados e superfícies próximas ao paciente, antes e após a remoção de luvas. A higienização antisséptica é recomendada nos casos de precaução de contato nos casos de pacientes portadores de microrganismos multirresistentes e em casos de surtos. A degermação da pele está indicada no pré-operatório, antes de qualquer procedimento cirúrgico e antes da realização de procedimentos invasivos (ANVISA, 2007).

9.2 Uso Adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPI)

i) Luvas

- a) Esterilizadas** – usadas para procedimentos cirúrgicos e invasivos.
- b) Borracha/Látex** – usadas para manipulação de sangue, fluidos corpóreos, secreções, pele rompida, membranas mucosas e itens contaminados.
- c) As luvas devem ser removidas após manipulação destes materiais.
- d) Trocar as luvas entre procedimentos e entre contato com pacientes.
- e) As luvas devem ser descartadas após cada procedimento.
- f) Lavar as mãos imediatamente após a remoção das luvas.

ii) Máscaras, Óculos e Protetores Faciais.

Estes devem ser utilizados para proteção das membranas mucosas dos olhos, nariz e boca na execução de procedimentos assistenciais que possam gerar respingos de sangue, fluidos corporais, secreções e excreções. Um exemplo peculiar são os ocorridos nos atendimentos odontológicos quando da utilização da caneta de alta rotação.

iii) Aventais ou Jalecos

O ideal é a utilização de aventais descartáveis a cada paciente evitando assim contaminar a roupa com respingos provenientes do paciente.

Protege a pele e a roupa de respingos de sangue, fluídos corporais, secreções e excreções.

Estudo realizado por Carvalho et al., (2009), sobre o uso do jaleco mostrou que os mesmos são veículos potenciais para a transmissão de microrganismos, quando utilizados indevidamente, podendo vir atuar como fonte de infecção associada aos profissionais de saúde.

iv) Botas de Borracha ou Protetor de Borracha Descartável

Deve ser usado em grandes áreas com piso contaminado por derramamento.

9.3 Cuidados com os Equipamentos

Manipular equipamentos sujos de forma a evitar o contato com a pele ou membranas mucosas e para evitar a contaminação de roupa ou ambiente. Limpar os equipamentos reutilizáveis antes do próximo uso.

9.4 Limpeza do Ambiente

Deve haver cuidados rotineiros de limpeza e desinfecção dos equipamentos e mobiliários nas áreas de assistência ao paciente.

9.5 Materiais Perfurocortantes

Evite reencapar agulhas usadas. Evite retirar agulhas usadas das seringas descartáveis. Evite dobrar, quebrar ou manipular agulhas utilizando as mãos. Coloque os resíduos ou materiais utilizados em recipientes coletores apropriados.

9.6 Manejo de Roupa Suja/Roupa Contaminada

Deve existir um protocolo específico para o gerenciamento da roupa suja hospitalar. Os funcionários devem fazer uso de luvas e máscaras durante todo o tempo de manipulação, este manuseio da roupa deve ser em horário apropriado. As roupas sujas devem ser coletadas em sacos apropriados e as contaminadas por sangue coletadas em sacos para roupa com o rótulo risco biológico.

Capítulo 10- Precauções Baseadas na Transmissão ou Precauções Adicionais

São utilizadas quando o paciente é reconhecidamente infectado ou suspeito de infecção por patógenos que são transmitidos pelo ar, gotículas, aerossol ou através de uma combinação de rotas de transmissão. Estas precauções são utilizadas quando as Precauções Padrão não são suficientes para interromper a infecção e incluem as Precauções Aéreas, as Precauções por Gotículas e as Precauções por Contato (Australian Government-ANCA, 2004).

10.1 Precauções Aéreas ou Respiratórias (Aerossóis)

Cassettari et al., (2009) enfatiza que os agentes biológicos dispersos por via aérea podem se disseminar no ambiente quando o doente ou portador fala, tosse ou espirra, contaminando e expondo aqueles que ali circulem. Outra situação importante refere-se ao Trabalhador de Saúde que realiza procedimentos em pacientes com doenças ou condições clínicas que gerem gotículas ou aerossóis que contenham patógenos.

O CDC (2003), discorre quanto às infecções respiratórias que podem ser adquiridas pela exposição ao patógeno contido na gotícula ou no núcleo da gotícula (aerossóis). A propagação de doenças infecciosas através do ar por núcleo de gotículas é uma forma de transmissão indireta. Os núcleos de gotículas são resíduos de gotículas que, quando em suspensão no ar, secam e produzem partículas que alcançam o tamanho de 1 a 5 µm. Características das partículas: conter microrganismos potencialmente viáveis; estar protegida por uma camada de proteção seca; ficar indefinidamente suspensas no ar e ser transportadas a longas distâncias. Os microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos através de núcleo de gotículas incluem o *Mycobacterium tuberculosis*, vírus do sarampo, vírus da varíola e o vírus da varicela zoster vírus (VZV).

WHO (2004) e CDC (2003) recomendam as seguintes medidas de Precaução Respiratória para os aerossóis ou núcleo de gotículas:

- Implementação das Precauções Padrão;
- Colocar o paciente em quarto privativo que tenha preferencialmente fluxo de ar com pressão negativa;
- Manter as portas fechadas;

- Qualquer pessoa que entrar no quarto deve utilizar uma máscara respiradora de alta filtração (ex. N95)
- Limitar a circulação e transporte do paciente. Se o transporte for necessário, limitar a dispersão de núcleos de gotículas, pela utilização de máscara no paciente.

10.2- Precauções Respiratórias para Gotículas

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a exposição aos microrganismos das gotículas (através da aerolisação das secreções orais e nasais de pacientes infectados) constitui uma forma de transmissão por contato direto. Quando as gotículas são produzidas através do espirro ou da tosse, uma nuvem de partículas infecciosas $> 5 \mu\text{m}$ é expelida, resultando em uma exposição potencial de pessoas suscetíveis dentro de uma área de menos de 1 metro da fonte, exemplos de patógenos transmitidos por estas vias são: vírus influenza, rinovirus, adenovirus e vírus sincicial respiratório (RSV).

WHO (2004) recomenda as seguintes medidas de Precaução Respiratória para as gotículas:

- Implementação das Precauções Padrão;
- Colocar o paciente em quarto privativo (ou em quarto com outro paciente infectado com o mesmo patógeno)
- Usar máscaras cirúrgicas quando estiver trabalhando 1 a 2 metros do paciente;
- Colocar máscara cirúrgica no paciente se houver necessidade de deslocá-lo. Comunicar o diagnóstico do paciente a área onde for transportado.

10.3- Precauções por Contato

Devem ser utilizadas para os pacientes com diagnóstico ou suspeita de doenças graves oriundas de patógenos facilmente transmitido pelo contato direto com o paciente ou por contato indireto com outros itens do ambiente hospitalar. Exemplos de doenças que necessitam de infecções por contato: bactérias multirresistentes; *Clostridium difficile*, difteria cutânea; enterovirus; hepatite A; herpes simplex, herpes zoster, impétigo, abscessos, celulite ou úlceras de decúbito, ou outras infecções por *Staphylococcus aureus*; parainfluenza, VSR, rotavirus entre outros.

Recomendações para Precauções por Contato, segundo WHO (2004) e CDC (2003):

- Implementação das Precauções Padrão;
- Colocar o paciente em quarto privativo (ou em quarto com outro paciente infectado com o mesmo patógeno);
- Usar luvas limpas, não estéreis quando entrar no quarto;
- Usar avental, limpo, não estéril sempre que houver possibilidade de contato com o paciente, superfícies ou outros itens do quarto;
- Limitar a circulação e transporte do paciente do quarto, a transferência do mesmo deve se restringir a fins essenciais. Se o transporte for necessário, use todas as medidas de Precauções para minimizar o risco de transmissão.

PARTE IV-

BIOSSEGURANÇA APLICADA AOS LOCAIS DE SAÚDE

Capítulo 11: Biossegurança nos Estabelecimentos de Saúde:

11.1- Projetos Físicos dos Estabelecimentos de Saúde

11.2- Renovação de Ar nas Áreas Críticas

11.3-Processamento de Roupas Sujas/Contaminadas

11.4- Limpeza e Desinfecção das Superfícies

Capítulo 12: Biossegurança Hospitalar

Capítulo 13: Biossegurança nas Clínicas e Consultórios

Capítulo 11 – Biossegurança nos Estabelecimentos de Saúde

Os estabelecimentos de saúde são locais que podem funcionar como nichos para microrganismos, contribuindo sobremaneira para disseminação dos mesmos e contaminando os que ali circulem.

11.1 Projetos Físicos de Estabelecimentos de Saúde

Para o funcionamento adequado os estabelecimentos de saúde estes devem cumprir as normas legais como instrumento de ação sanitária como as estabelecidas pela Resolução (ANVISA) – RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002 que substitui a Portaria MS nº 1884/94, a qual dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde:

“Art 1º - Aprovar o Regulamento Técnico destinado ao planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde, em anexo a esta Resolução a ser observado em todo território nacional, na área pública e privada compreendendo:

- a) as construções novas de estabelecimentos assistenciais de saúde de todo o país;
- b) as áreas a serem ampliadas de estabelecimentos assistenciais de saúde já existentes;
- c) as reformas de estabelecimentos assistenciais de saúde já existentes e os anteriormente não destinados a estabelecimentos de saúde.”

A importância da arquitetura para os estabelecimentos de saúde pauta-se nas prevenções das infecções hospitalares tendo uma conotação de barreiras, proteções, meios e recursos físicos, funcionais e operacionais relacionados com as pessoas, ambientes, circulações, práticas, equipamentos, instalações, materiais e fluidos.

Além dos cuidados com a estrutura física, outras normas devem ser seguidas para execução de um trabalho seguro nestes ambientes. Nos setores de maior trânsito e fluxo de pessoas, as sinalizações gerais das áreas restritas e permitidas devem ser frequentes e devem estar visíveis. As referidas sinalizações devem ser expressas, também, em "braile" para os deficientes visuais; ou com indicação simbólica ou monitor para os analfabetos.

11.2 Renovação de Ar em Áreas Críticas

A localização das entradas de ar externa deve ser o mais alto possível, em relação ao nível do piso, e tem de ficar afastadas das saídas de ar, dos incineradores e das chaminés das caldeiras; as saídas devem situar-se junto ao chão. Todas as aberturas para entrada e saída de ar devem possuir filtros de grande eficiência. (Resolução RDC nº50 /2002).

11.3 Processamento de Roupas Sujas/Contaminadas

Na Resolução RDC nº50 /2002, no seu item B.1.4, determina que o processamento de roupas sujas/contaminadas deve obedecer as seguintes regras: o fluxo da roupa nos estabelecimentos assistenciais de saúde pode ser agente de transmissão da infecção hospitalar. Nos estabelecimentos de saúde, as principais barreiras do fluxo de roupa são:

1ª.) Pré-classificação de roupa na origem: através de carros porta-saco (duplo ou triplo), dotados de tampa acionada por pé.

2ª.) Sala de recepção, classificação, pesagem e lavagem de roupa suja: ambiente altamente contaminado que necessita requisitos arquitetônicos próprios como: banheiro, exaustão mecanizada com pressão negativa, local para recebimento de sacos de roupa por carros, tubulão ou monta cargas, espaço para carga de máquina de lavar, ponto de água para lavagem do ambiente, pisos e paredes laváveis, ralos, interfone ou similar e visores. Pisos e paredes devem ser de material resistente e lavável. A conduta nessa área deve prever equipamento de proteção individual aos funcionários.

3ª.) Lavagem de Roupa: independente do porte da lavanderia, deve-se usar sempre máquinas de lavar de porta dupla ou de barreira, onde a roupa suja é inserida pela porta da máquina situada do lado da sala de recebimento, pesagem e classificação por um operador e, após lavada, retirada do lado limpo através de outra porta. A comunicação entre as duas áreas é feita somente por visores e interfones.

Assim o processamento da roupa deve seguir a seguinte seqüência: recepção → classificação / pesagem → lavagem / centrifugação → seleção (relavagem ou conserto se for o caso) → secagem / calandragem → passagem / prensagem → seleção para costura (conserto e

relavagem ou baixa, se for o caso) → dobragem → preparo de pacotes → armazenamento → distribuição.

11.4 Limpeza e Desinfecção das Superfícies

Os cuidados com a limpeza, descontaminação e desinfecção das superfícies tem sua relevância, pois estas atuam como fontes inanimadas tais como as superfícies fixas (teto, paredes, chão) e móveis (equipamentos, carrinhos, mesas) onde os microrganismos ficam sedimentados principalmente após manipulação de áreas contaminadas.

A limpeza e desinfecção das superfícies devem ser regulares e periódicas sempre ao termino de um turno (limpeza terminal) ou eventualmente quando houver contaminação visível.

Segundo Lacerda (2003), a limpeza das áreas críticas são mais rigorosas, sendo que a utilização de máquinas que efetuam a lavagem e aspiração concomitantes do piso (limpeza molhada) é mais efetiva que a limpeza úmida. Nos centros cirúrgicos a limpeza deve ser realizada antes, durante e após cada procedimento cirúrgico e ao final de cada dia. O pó deve ser retirado de todas as superfícies horizontais com tecido limpo embebido com um produto químico (escolhido de acordo com as normas do estabelecimento) para que não haja dispersão do pó. Após a remoção do pó a desinfecção das superfícies, embora seja discutida, deve ser realizada.

Capítulo 12 – Biossegurança Hospitalar

As áreas hospitalares, e de demais estabelecimentos de saúde, são classificadas de acordo com o risco de contaminação (Lacerda, 2003):

- **Áreas Críticas**

São as áreas que oferecem risco potencial para aquisição de infecção seja pelos procedimentos invasivos realizados, ou pela presença de pacientes susceptíveis às infecções. Ex.: centro cirúrgico e obstétrico, berçário, UTI, hemodiálise, laboratório, CME, banco de sangue e área suja de lavanderia.

- **Áreas Semicríticas**

São todos os compartimentos ocupados por pacientes com doenças infecciosas de baixa transmissibilidade e doenças não infecciosas. Ex.: enfermarias, apartamentos e ambulatórios.

- **Áreas Não-críticas**

Todas as áreas não ocupadas por pacientes e aquelas destinadas a exames de pacientes. Ex.: escritórios, almoxarifado, setor de radiologia e consultórios.

Esta classificação norteia as medidas de precaução que devem ser aplicadas. Segundo Lacerda (2003) para as áreas críticas (ou restrita) há a indicação de utilização de roupa privativa, gorro, máscara e luvas, isto é as barreiras físicas são essenciais; áreas semicríticas, utilização de aventais e luvas quando na execução de procedimentos e áreas não críticas (ou irrestrita) é desejável o uso das barreiras físicas, mas podem ser utilizadas roupas comuns e a circulação de pessoas é livre.

Assim a Resolução RDC nº50 /2002 no seu subitem 6.1, do item 6, da parte III, determina: “as precauções padrão constituem-se de barreiras e ênfase nos cuidados com certos procedimentos, visando evitar que a equipe de assistência tenha contato direto ou indireto com os diversos líquidos corporais, agulhas, instrumentos e equipamentos encontram-se inclusos nos contatos indiretos.”

Há uma ênfase com relação a estas medidas preventivas e de controle de infecção de serviços de saúde referindo-se as precauções como de prática geral (aplicação das precauções padrão a todos os pacientes, durante todo o período de internação, independentemente do diagnóstico do paciente) e prática específica (aplica-se sempre que o paciente apresentar doença infecciosa, com possibilidade de transmissão de pessoa a pessoa

e/ou colonização por germes multirresistentes) conforme listagem organizada pela CDC. Consiste em suplementar as precauções universais com isolamento de bloqueio (IB) e com precauções com materiais infectantes (PMI). O isolamento de bloqueio consiste na utilização de barreiras físicas e cuidados especiais, para impedir que os germes envolvidos se transmitam.

Processamento de Artigos

O reprocessamento de artigos é o processo a ser aplicado a artigos hospitalares com a finalidade de reutilizá-los. Estes devem considerar a classificação para aplicação dos cuidados devidos. De acordo com MS (2001), os artigos hospitalares são definidos de acordo com o grau de risco de aquisição de infecções, nas seguintes categorias: críticos, semicríticos e não críticos, o que irá nortear o processo de desinfecção ou esterilização a ser utilizado.

○ Artigos Críticos

São aqueles que têm alto risco de infecção, se estiverem contaminados com qualquer microrganismo ou esporos. São artigos que entram em contato direto com os tecidos ou tratos estéreis devendo passar pelo processo de esterilização. Ex: instrumentais cirúrgicos; metais sem fio de corte; tubos de látex, acrílico, silicone; vidrarias e borracha para aspiração; fibra óptica; endoscópio; laringoscópios; etc.

○ Artigos Semicríticos

São aqueles que entram em contato com a pele não íntegra e membranas mucosas. Devem, no mínimo, serem submetidos à desinfecção. Em alguns casos, pelo risco de tornarem-se críticos devem ser esterilizados (rompimento acidental de mucosas). Ex: inaladores; máscaras de nebulização; Ambu; cânula de Guedel; lâminas de laringoscópios; espéculos vaginais; etc.

○ Artigos Não-críticos

São aqueles que entram em contato com a pele íntegra, portanto necessitam apenas serem desinfetados (desinfecção de médio e baixo nível), quando forem reutilizados em pacientes objetivando bloquear a transmissão de microrganismos. Ex: termômetros; esfigmomanômetros; comadres; bacias; cubas, dentre outros.

Os métodos de reprocessamento dos instrumentais hospitalares devem seguir a ordem de: descontaminação (discutida por alguns autores); limpeza; secagem; desinfecção (para os artigos a serem desinfetados, pode ser de alto, médio e baixo nível); empacotamento (quando necessário); esterilização e armazenamento (MS, 2001).

Vale ressaltar que a Resolução RDC nº 8 de 27 de fevereiro de 2009 (ANVISA), no seu Art 2º regulamenta: “a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquido para o instrumental cirúrgico e outros produtos para saúde.”

Esta Resolução aplica-se aos serviços de saúde que realizam procedimentos cirúrgicos e diagnósticos por videoscopia com penetração de pele, mucosas adjacentes, tecidos sub-epiteliais e sistema vascular, cirurgias abdominais e pélvicas convencionais, cirurgias plásticas com o auxílio de ópticas, mamoplastias e procedimentos de lipoaspiração.”

Capítulo 13 – Biossegurança nas Clínicas e Consultórios

O fluxo de clientes e/ou pacientes e visitantes é inquestionável e seu controle deve ser recomendado. As sinalizações das áreas restritas e permitidas devem ser permanentes e devem estar visíveis. O sistema de limpeza, desinfecção e assepsia devem ser iguais aos das instalações hospitalares. A utilização de equipamento de proteção individual é indispensável e recomendável para cada caso individualmente.

Os trabalhadores nestes ambientes deve aplicar as precauções padrão, principalmente com relação a utilização das barreiras físicas e lavagem das mãos. Os cabelos devem estar amarrados. Os jalecos e aventais devem ser retirados quando o profissional for deixar o ambiente, esta vestimenta deve ser acondicionada em sacos plásticos para posterior processamento. Na entrada e na saída das clínicas deve haver uma pia larga, com indicações ou sinalizações de assepsia e desinfecção, que deve estar visível e acessível (Universidade Federal da Bahia, 2001).

Os consultórios odontológicos têm suas normas regidas em manuais e legislações específicas. Todas as orientações podem ser encontradas no manual- Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos, MSc (2006).

PARTE V-

BIOSSEGURANÇA NOS AMBIENTES LABORATORIAIS

Capítulo 14: Laboratórios de Ensino e Pesquisa:

14.1- Laboratórios Nível de Segurança 1

14.2- Laboratórios Nível de Segurança 2

14.3- Laboratórios Nível de Segurança 3

14.4- Laboratórios Nível de Segurança 4

Capítulo 15: Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde

Capítulo 14 – Laboratórios de Ensino e Pesquisa

Especial atenção tem que ser voltada para as atividades nos laboratórios de ensino e saúde. As atividades laboratoriais executadas adequadamente e bem planejadas previnem a exposição indevida a agentes considerados de riscos a saúde e a acidentes. Estes procedimentos são denominados – boas práticas de laboratório (Hirata & Mancini Filho, 2002).

Segundo o Manual da Universidade Federal da Bahia (2001) há uma necessidade do delineamento prévio das atividades que a serem desenvolvidas pelas instâncias laboratoriais. Dentre estas, encontra-se fortemente indicado a análise dos seguintes dados: capacitação técnica; espaço físico e distribuição de setores; tipos de atividades desenvolvidas; fluxo de atividades; fluxo de pessoas; determinação de potenciais riscos dos vários tipos de acidentes (mapa de risco); identificação de riscos biológicos, físicos e químicos; confecção de um manual de procedimentos operacionais padrão; indicação de providências a serem adotadas em situações emergenciais; indicação de atividades em situações urgentes e emergentes; instrução de imunização da equipe; instrução de primeiros-socorros; divulgação interna da lista de endereços de notificação e informação na Secretaria de Saúde e setores relacionados com a saúde.

Segundo Teixeira & Valle (2002) a avaliação de risco incorpora ações que objetivam o reconhecimento ou a identificação dos agentes biológicos e a probabilidade do dano proveniente destes. Tal análise será orientada por vários critérios que dizem respeito não só ao agente biológico manipulado, mas também ao tipo de ensaio realizado, ao próprio trabalhador e, quando pertinente, à espécie animal utilizada no ensaio. Os agentes biológicos estão classificados em quatro grupos, onde são considerados como critérios: a patogenicidade para o homem; a virulência; o modo de transmissão; a endemicidade e a existência ou não de profilaxia e de terapêuticas eficazes.

Assim, segundo Manual de Classificação de Riscos de Agentes Biológicos, do Ministério da Saúde (2006c) os microrganismos podem ser classificados:

- **Classe de Risco 1** (baixo risco individual e para a coletividade): Incluem os agentes que não possuem capacidade comprovada de causar doença em pessoas ou animais sadios.

- **Classe de Risco 2** (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade): Incluem os agentes que podem causar doença no homem ou animais, porém não apresentam riscos sérios para os profissionais do laboratório, para a comunidade, para animais e para o meio ambiente. Os agentes desta classe, quando não existentes no país, devem ter sua importação restrita, sujeita a prévia autorização das autoridades competentes.

- **Classe de Risco 3** (alto risco individual e risco moderado para a comunidade): Incluem os agentes que usualmente causam doenças humanas ou animais graves que podem ser tratadas por medicamentos ou medidas terapêuticas gerais, representa risco moderado para a comunidade e para o meio ambiente. Os agentes desta classe, quando não existentes no país, devem ter sua importação restrita, sujeita a prévia autorização das autoridades competentes.

- **Classe de Risco 4** (alto risco individual e alto risco para a comunidade): Incluem os agentes de alto risco biológico (agentes virais) que causam doenças humanas e animais de alta gravidade e capazes de se disseminar na comunidade e no meio ambiente. Os agentes desta classe, quando não existentes no país, devem ter sua importação proibida e caso sejam identificados ou se tenha suspeita de sua presença no país, os materiais suspeitos de conter estes agentes devem ser manipulados com os níveis máximos de segurança disponíveis e devem ser destruídos por processos físicos (autoclavação) ou por processos químicos de reconhecida eficácia e posteriormente incinerados.

Para manipulação dos agentes biológicos, nos laboratórios, existem 4 Níveis de Biossegurança que estão relacionados com os riscos crescentes de segurança (MS, 2006b)

14.1 Laboratório Nível de Biossegurança 1

Desenvolve atividades com agentes de riscos biológicos de classe I. Este tipo de laboratório não requer características especiais na arquitetura, apenas bom planejamento e funcionalidade. O trabalho pode ser desenvolvido em bancada aberta, e a contenção está baseada nas Boas Práticas de Laboratórios e no uso adequado de EPIs.

14.2 Laboratório Nível de Biossegurança 2

Desenvolve atividades com agentes de risco biológicos 2 em laboratórios clínicos, de diagnóstico, laboratórios-escolas; universidades e outros. Podem ser manipulados em bancada aberta, mas, dependendo da demanda de amostras, do volume do microrganismo e da possibilidade de formação de aerossóis, recomenda-se o uso de Cabines de Segurança Biológica e de centrífugas com copos de segurança. O uso de boas práticas de laboratório (BPL) e EPIs fornecem proteção adequada.

14.3 Laboratório Nível de Biossegurança 3

Desenvolve atividades com agentes de risco biológicos 3 em laboratórios clínicos, de diagnóstico, laboratórios de ensino superior; de pesquisa ou de produção. Neste tipo de laboratório é exigido um desenho arquitetônico e construção mais elaborada. No NB-3 destacam-se as barreiras primárias e secundárias para proteção dos trabalhadores de áreas contíguas, a comunidade e o meio ambiente. Toda manipulação deve ser feita com CSB ou outro equipamento e contenção física. Estes laboratórios devem ser registrados junto as autoridades sanitárias locais, estaduais, nacionais e/ou internacionais.

14.4 Laboratório Nível de Biossegurança 4

Desenvolve atividades com agentes de risco biológicos 4 que apresentam elevado risco individual e comunitário, representando um grande perigo para as pessoas e animais. São de fácil transmissibilidade por aerossóis não existindo profilaxia e tratamento, podendo levar a pessoa a óbito. Todas as manipulações devem estar restritas as CSB classe II ou III, com roupas de pressão positiva, ventiladas por sistemas de suporte de vida. Os trabalhadores devem possuir treinamento completo e específico, direcionado a manipulação de microrganismos altamente perigosos.

Capítulo 15 – Gerenciamento de Resíduos dos Serviços de Saúde

De acordo com Mastroeni (2006), os resíduos gerados pelos serviços de saúde devem obedecer a uma estratégia que consiste no seu acompanhamento desde o local de geração até sua disposição final. Devem também ser aplicados critérios para os resíduos produzidos por laboratórios. Todas as etapas do gerenciamento são de responsabilidade do gerador do resíduo, tanto dentro como fora do local onde foi gerado, mesmo quando há contratação de serviços de transporte, tratamento e disposição final.

As etapas a serem seguidas para o gerenciamento dos resíduos são: caracterização; segregação; acondicionamento; tratamento; armazenamento; transporte e disposição final. Todas estas etapas estão disponibilizadas no Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (2006) do Ministério da Saúde.

No Brasil, órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA e o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA têm assumido o papel de orientar, definir regras e regular a conduta dos diferentes agentes, no que se refere à geração e ao manejo dos resíduos de serviços de saúde, com o objetivo de preservar a saúde e o meio ambiente, garantindo a sua sustentabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Department of Health and Ageing. Infection Control Guidelines: for the prevention of transmission of infectious diseases in the health and Ageing. Australia. 2004

ANCA (Australian National Council on AIDS) & National Health and Medical Research Council (NHMRC). Infection Control in the Health Care Setting – Guidelines for the Prevention of Transmission of Infectious Disease. 2004.

ANVISA. Resolução– RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre a suspensão da esterilização química por imersão para instrumental cirúrgico e outros produtos da saúde utilizados nos procedimentos citados. **Brasília.** Disponível em < <http://www.aguaseguas.com.br/images/stories/pdflegislacaonovas/027.pdf>> acesso em 12 de outubro de 2010.

ANVISA. Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em < http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/geral/manual_odonto.pdf> acesso em 12 de outubro 2010.

ANVISA. Resolução - RDC nº 48, de 2 de junho de 2000. Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar. **Brasília.** Disponível em< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/48_00rdc.htm> acesso em 25 de novembro de 2010.

ANVISA. Portaria de nº802 de 08 de outubro de 1998. Institui Sistema de Controle e Fiscalização em toda a cadeia dos produtos farmacêuticos. **Brasília.** Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/802_98.htm> acesso em 15 de novembro de 2010.

ANVISA Resolução– RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. **Brasília.** Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/50_02rdc.pdf> acesso em 12 de novembro de 2010.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 214, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em farmácias.** Brasília. Disponível em <
http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2006/rdc/214_06rdc.htm> acesso em 15 de outubro de 2010.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 216, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas práticas para Serviços de Alimentação** Brasília. Disponível em <
[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/CF4EFE7D0F91614B832576250049D87C/\\$File/NT00041F3E.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/CF4EFE7D0F91614B832576250049D87C/$File/NT00041F3E.pdf)> acesso em 15 de outubro de 2010.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.** Brasília. Disponível em <
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6347788044658f63970cbf8b9c163b5b/RDC+N+17-10.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>> acesso em 30 de novembro de 2010.

ANVISA. **Manual de orientações para fiscalização sanitária em estabelecimentos prestadores de atividades físicas e afins.** Brasília. 2009. Disponível em <
http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/descentralizacao/grupo_referencia_academia_ginastica.pdf> acesso em 30 de novembro de 2010.

ANVISA. **Protocolo das Ações de Vigilância Sanitária.** Brasília. Abril/2007 Disponível em <
http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/descentralizacao/protocolo_acoes.pdf> acesso em 15 de outubro de 2010.

BAHIA. Secretaria da Saúde. Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde. Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário. BRASIL. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. **Manual de Biossegurança.** Salvador. 2001.

BANNISTER, B. A., BEGG, N. T. & GILLESPIE, S. H. **Infection Disease.** 2 th. Blackwell Science. Paris. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde** / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.182 p. – (Série A. Normas e

Manuais Técnicos). Disponível em <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_gerenciao_residuos.pdf> acesso em
23 de outubro de 2010.

BRASILa. Ministério da Saúde. **Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006. 52 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASILb.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. em português rev. e atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 290 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASILc. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Higienização das mãos em Serviços de Saúde** / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 53 p

BRASIL. Lei n. 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Decreta a obrigatoriedade do Programa de Controle de Infecção Hospitalar em todos os hospitais brasileiros. Diário Oficial da União, Brasília, p.265, 7 jan. 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 36 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS N° 2.616, de 12 de Maio de 1998, que regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição a Portaria MS 930 / 92. Disponível em < www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/legislacao-sanitaria/estabelecimentos-de-saude/controle-de-infeccao-hospitalar/portaria_2616.pdf> acesso em 16 de setembro de 2010.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 9- Programa de Prevenção de Riscos Ambientais. Publicada pela Portaria GM 3214 de 08 de junho de 1978. Disponível em <

http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_09_at.pdf> acesso em 12 de outubro de 2010

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 32 - Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde. 2005. Disponível em <http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_32.pdf> acesso em 12 de outubro de 2010.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 6 - Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde. 1994. Disponível em <<http://www.normaslegais.com.br/legislacao/trabalhista/nr/nr6.htm>> acesso em 12 de outubro de 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Assistência à Saúde. Coordenação geral das Unidades Hospitalares próprias do Rio de Janeiro. **Orientações gerais para central de Esterilização**. 56p. 2001.série A. Normas e Manuais Técnico; n.108.

CASSETTARI, V. C.; BALSAMO, A. C.; SILVEIRA, I. R. **Manual para prevenção das infecções hospitalares** 2009. Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em http://www.hu.usp.br/arquivos/Manualccih_2005.pdf> acesso em 14 de abril de 2010.

CARVALHO, C.M.R.S., et al. **Aspectos de Biossegurança relacionados ao uso do jaleco pelos profissionais de saúde: uma revisão de literatura**. Texto Contexto Enferm, Florianópolis, 2009 Abr-Jun; 18(2): 355-60

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guidelines for environmental infection control in health-care facilities: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR 2003; 52 (No. RR-10): 1-48. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm>> acesso em 14 de outubro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE EDUCAÇÃO FÍSICA (CONFED). Resolução CONFED nº 046/2002. Dispõe sobre a Intervenção do Profissional de Educação Física e respectivas competências e define os seus campos de atuação profissional. Disponível em <

http://www.confef.org.br/extra/resolucoes/conteudo.asp?cd_resol=82> acesso em 02 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE ENFERMAGEM (COFEN). Resolução COFEN nº 290/2004. Fixa as Especialidades de Enfermagem. Disponível em < <http://inter.coren-sp.gov.br/node/3886>> acesso em 15 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Resolução CFF nº 300, de 30 de janeiro de 1997. Regulamenta o exercício profissional em Farmácia e unidade hospitalar, clínicas e casa de saúde de natureza pública ou privada. Disponível em < http://www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/legislacao-sanitaria/estabelecimentos-de-saude/exercicio-profissional/res_300.pdf> acesso em 15 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Decreto nº 85.878 de 07/04/1981. Estabelece normas para execução de Lei nº 3.820, de 11 de novembro de 1960, sobre o exercício da profissão de farmacêutico, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/decretos/85878.pdf>> acesso em 15 de outubro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL (COFFITO). Resolução nº8 de 20 de fevereiro de 1978. Aprova as Normas para habilitação ao exercício das profissões de fisioterapeuta e terapeuta ocupacional e dá outras providências. Disponível em < http://www.coffito.org.br/publicacoes/pub_view.asp?cod=935&psecao=9> acesso em 15 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL (COFFITO). **Resolução nº 371, de 6 de novembro de 2009.** *Dispõe sobre a alteração do artigo 1º da Resolução COFFITO nº 366.* Disponível em < ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2009/iels.dez.09/iels222/U_RS-COFFITO-371_061109.pdf> *acesso em 25 de novembro de 2010.*

CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA. Medidas de Controle de Infecção para Fonoaudiólogos - Manual de Biossegurança. 8º Colegiado, Brasília, 2007. Disponível em < <http://www.fonoaudiologia.org.br/discovirtual/pubdownload/pubmanual2.pdf>> acesso em 17 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRIÇÃO. LEI Nº 8.234, de 17 de setembro de 1991. Regulamenta a profissão de nutricionista e determina outras providências. Disponível em < <http://www.cfn.org.br/novosite/conteudo.aspx?IDMenu=56>> acesso em 15 de novembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRIÇÃO. RESOLUÇÃO CFN Nº 380/2005. Dispõe sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições estabelecem parâmetros numéricos de referencia, por área de atuação, e dá outras providências. Disponível em < <http://www.crn5.org.br/data/site/uploads/arquivos/380%20-%20Areas%20de%20atuacao,%20atribuicoes%20e%20parametros%20numericos.pdf>> acesso em 5 de dezembro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. Portaria CFO-22/2001. **Baixa Normas sobre anúncio e exercício das especialidades odontológicas e sobre cursos de especialização revogando as redações do Capítulo VIII, Título I; Capítulo I, II e III, Título III, das Normas aprovadas pela Resolução CFO-185/93, alterada pela Resolução CFO- 198/95.** Disponível em <<http://cfo.org.br/servicos-e-consultas/ato-normativo/?id=378>> acesso em 15 de outubro de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA (CFO). **Manual de Biossegurança.** Disponível em < http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/09/manual_biosseguranca.pdf> acesso em 23 de abril de 2010.

CONSELHO FEDERAL DE PSICOLOGIA. Resolução CFP N.º 014/00, de 20 de dezembro de 2000. Institui o título profissional de Especialista em Psicologia e dispõe sobre normas e procedimentos para seu registro. Disponível em < <http://www.crp07.org.br/upload/legislacao/legislacao71.pdf>> acesso em 21 de outubro de 2010.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. Resolução 287, de 08 de Outubro de 1998. Relaciona 14 (quatorze) categorias profissionais de saúde de nível superior para fins de atuação no CNS. Disponível em < http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_98.htm> acesso em 14 de outubro de 2010.

CONSELHO REGIONAL DE FONOAUDIOLOGIA-SP. Decreto nº 87.218, de 31 maio de 1982 - Regulamenta a Lei nº 6.965, de 09 de dezembro de 1981, que dispõe sobre a regulamentação da profissão de Fonoaudiólogo, e determina outras providências. Disponível

em < <http://www.fonosp.org.br/legislacao/decretos-federais/decreto-n%C2%BA-87218-de-31-de-maio-de-1982/>> acesso em 15 de novembro de 2010.

COSTA, M. A. F. **Construção do conhecimento em saúde: o ensino de Biossegurança em cursos de nível médio na Fundação Oswaldo Cruz.** Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ensino de Biociências e Saúde. Rio de Janeiro. 2005. Disponível em <http://www.bdt.d.cict.fiocruz.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=66> acesso em 01 de dezembro de 2010.

COSTA, M.A.F. & COSTA, M.F.B. **Biossegurança: um elo estratégico de SST.** Revista CIPA da Fiocruz. nº 253 de janeiro de 2002. Disponível em <<http://www.biossegurancalaboratorial.com.br/files/sst.pdf>> acesso em 02 de novembro de 2010.

CRICK, F. The double helix: a personal view. Nature. Vol 248: 766-69, abril 1974. Disponível em < <http://www.nature.com/nature/dna50/Crick3.pdf>> acesso em 15 de novembro de 2010.

DAVID, C.M.N. INFECÇÃO EM UTI. Medicina, Ribeirão Preto,31: 337-348, jul./set. 1998. Disponível em < http://www.fmrp.usp.br/revista/1998/vol31n3/infeccao_em_uti.pdf> acesso em 12 de outubro de 2010.

DECRETO LEI nº 938 de 13 de outubro de 1969. Provê sobre as profissões de fisioterapeuta e terapeuta ocupacional, e dá outras providências. Disponível em < http://www.coffito.org.br/conteudo/con_view.asp?secao=33> acesso em 15 de novembro de 2010.

DECRETO No 85.878, DE 7 DE ABRIL DE 1981. Estabelece normas para execução da Lei nº 3.820, de 11 de novembro de 1960, sobre o exercício da profissão de farmacêutico, e dá outras providências. Disponível em < <http://www.cff.org.br/userfiles/file/decretos/85878.pdf>> acesso em 17 de novembro de 2010.

DECRETO nº 53.464 de 21-01-1964. Dispõe sobre a Profissão de Psicólogo . Disponível em http://www.pol.org.br/pol/cms/pol/legislacao/legislacaoDocumentos/decreto_1964_53464.pdf > acesso em 23 de outubro 2010.

FABRICIO, S. C. C. et al . Assistência domiciliar: a experiência de um hospital privado do interior paulista. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 5, Oct. 2004 .

Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010411692004000500004&lng=en&nrm=iso acesso em 22 outubro 2010. doi: 10.1590/S0104-11692004000500004.

FACULDADE CATÓLICA DO CEARÁ. Curso de Educação Física. Manual de Segurança de Laboratório do curso de Educação Física. Disponível em http://fmf.marista.edu.br/down/2009/manual_seguranca_edufisica_2009.pdf acesso em 12 de maio de 2010.

FIGUEIREDO, R. M. & LEITE, C. As Práticas de precauções/isolamento a partir do diagnóstico de internação em unidades de moléstias infecciosas. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 08, n. 03, p. 358 - 362 2006. Disponível em http://www.fen.ufg.br/revista/revista8_3/v8n3a06.htm acesso 29 de novembro de 2010.

FIOCRUZ. Portaria nº131/2003 da Presidência da Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em http://www.fiocruz.br/biosseguranca/ctbio/docs/port_131_2003_pres_fiocruz.pdf acesso em 07 novembro de 2010.

FONTANA, Rosane Teresinha. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Rev. bras. enferm.**, Brasília, v. 59, n. 5, Oct. 2006 . Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003471672006000500021&lng=en&nrm=iso acesso em 22 novembro 2010. doi: 10.1590/S0034-71672006000500021.

GARNER, J. S. Guidelines for Isolation Precautions in Hospitals Hospital Infection Control Advisory Committee Guidelines for isolation precautions in hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. v.17, n.4, p.53-80, 1996.

HEALTH PROTECTION SCOTLAND. Transmission Based Precautions (TBP) – Information on Droplet/Contact/Airborne Precautions, HPS ICT 2009. Disponível em <http://www.documents.hps.scot.nhs.uk/hai/infection-control/transmission-based-precautions/mic-p-tbp-2009-04.pdf> acesso 24 de outubro de 2010.

HIRATA, M. H. & MANCINI-FILHO, J. Manual de Biossegurança. Editora Manole. São Paulo. Reimpressão 2008.

HOMRICH, M. S. **Plantas transgênicas de soja [*Glycine (Max.) L Merrill*] resistentes à lagarta *Anticarsia gemmatallis***. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Porto Alegre, março de 2008.

IJAZ, T. , et al. **Isolation of Etiological Agents of Nosocomial Infections from a Hospital Environment and Iatrogenic Spread of These Infections**. International Journal of Infectious Diseases. Vol.12, supplement 1, pag e365. 2008.

LACERDA, R. A. Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsias. São Paulo. Atheneu Editora. 2003.

LEI nº 5.081. Regula o exercício da odontologia. Disponível em < <http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/09/lei5081.pdf> > acesso 15 de outubro de 2010.

LEI nº 6.965. Regula o exercício da fonoaudiologia. Disponível em < <http://www.leidireto.com.br/lei-6965.html> > acesso 15 de outubro de 2010.

LEI nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, revogada pela Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados. Disponível em < <http://www3.dataprev.gov.br/SISLEX/paginas/42/1995/8974.htm> > acesso em 12 de novembro de 2010.

LEI nº 7.498, de 25 de Junho de 1986. Dispõe sobre a regulamentação do exercício da enfermagem, e dá outras providências. Alterada pela LEI nº 8.967 de 28 de dezembro de 1994. Disponível em < <http://www.soleis.adv.br/enfermagempofissao.htm> > e < <http://pnass.datasus.gov.br/documentos/normas/19.pdf> > acesso em 15 de novembro de 2010.

LEI nº 4.119 de 27 de agosto de 1962. Dispõe sobre os cursos de formação em Psicologia e regulamenta a profissão de Psicólogo . Disponível em < http://www.psi.ufba.br/documentos/Regulamentacao_da_Profissao.pdf > acesso em 23 de outubro de 2010.

MACHADO, M.H. *Os médicos e sua prática profissional: as metamorfoses de uma profissão*. Tese de doutorado. IUPERJ, Rio de Janeiro. 1996.

MAFRA, D.A.L. et al. Percepção dos Enfermeiros sobre a importância do uso dos Equipamentos de Proteção Individual para Riscos Biológicos em um Serviço de Atendimento Móvel de Urgência. *O Mundo da Saúde* São Paulo: 2008; jan/mar 32(1):31-38. Disponível em < http://www.scamilo.edu.br/pdf/mundo_saude/58/31a38.pdf> acesso em 25 de outubro de 2010.

MANDAL, B.K. et al. **Infectious Diseases**. 6 th. Blackwell Publishing. 2004.

MASTROENI, M. F. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. 2ª Ed. Atheneu. São Paulo. 2006

MELO, D.S. et al. Compreensão sobre Precauções Padrão pelos enfermeiros de um hospital publico de Goiânia – GO. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* vol.14 no.5 Ribeirão Preto Sept./Oct. 2006. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rlae/v14n5/pt_v14n5a13.pdf> acesso em 12 de outubro de 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria MS nº1884/94, que estabelece Normas para Projetos Físicos de Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. Disponível em < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/normas_montar_centro_.pdf> acesso em 25 de outubro de 2010.

NEVES, T.P. et al. **O conceito de Biossegurança à luz da Ciência Pós-Normal: avanços e perspectivas para a saúde coletiva**. *Saúde Soc.* São Paulo. v.16(3):158-168, 2007.

ODA, Leila. O Protocolo de Cartagena: Rotulagem – uma discussão comercial e não de segurança. *Noticias. ANBio*.1999. Disponível em < www.mrweb.com.br/clientes/anbiodestaque/geral2.asp?cod=468> acesso em 03 de novembro de 2010.

OSBORNE, S. **Influences on compliance with standard precautions among operating room nurses**. *American Journal of Infection Control*. Vol 31(7):415-123.2003. Disponível em http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6W9M-49XWTSS-C1&_cdi=6686&_user=972049&_pii=S0196655302482685&_orig=search&_coverDate=11%2F30%2F2003&_sk=999689992&view=c&wchp=dGLzVlbzSkzV&md5=91d67a8fb92d94d38fda80f91542a6df&ie=/sdarticle.pdf> acesso 12 de novembro de 2010.

PEREIRA, E.C.P., et al. Reflexões sobre conceitos estruturantes em biossegurança: contribuições para o ensino de ciências. *Ciências & Cognição*. Vol 14 (1):296-303 Mar 2009. Disponível em <http://www.cienciasecognicao.org>> acesso em 29 de outubro de 2010.

PEREIRA, M. S. et al. A Infecção Hospitalar e suas implicações para o cuidar da Enfermagem. *Texto Contexto Enferm* 2005 Abr-Jun; 14(2):250-7. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v14n2/a13v14n2.pdf>> acesso em 10 de outubro de 2010.

PROJETO DE LEI nº 268 de 2002. Dispõe sobre o exercício da Medicina. <<http://www.senado.gov.br/sf/publicacoes/diarios/pdf/sf/2002/12/11122002/25485.pdf>> acesso em 15 de outubro de 2010.

ROBERTS, R.J. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Vol 102(17): 5905-8. April, 26, 2005. Disponível em <<http://www.pnas.org/content/102/17/5905.full.pdf+html>> acesso em 14 de outubro de 2010

ROSDAHL, C.B. & KOWALSKI, M. T. *Textbook of Basic Nursing*. 9th. Wolters Kluwer. 2007.

SCHEIDT, K.L.S. et al. As ações de biossegurança implementadas pelas Comissões de Controle de Infecções Hospitalares. *R Enferm UERJ*, Rio de Janeiro, 2006 jul/set; 14(3): 372-77. Disponível em < <http://www.facenf.uerj.br/v14n3/v14n3a07.pdf>> acesso em 12 de outubro de 2010.

SIEGEL, J.D. et al. **Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings**. USA. *Am J Infect Control*. 35:S65-164.2007.

SILVA, Ruvani Fernandes da. A infecção hospitalar no contexto das políticas relativas à saúde em Santa Catarina. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 11,n.1,Febr. 2003. Disponível em<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010411692003000100016&lng=en&nrm-iso> acesso em 21 de outubro de 2010. doi: 10.1590/S0104-11692003000100016.

SIMAS, C.M. & CARDOSO, T. A. O. Biossegurança e Arquitetura em laboratórios de saúde pública. *Pós*. Vol 1 (24):108-124. São Paulo. Dezembro 2008.

TIETJEN, L., BOSSEMEYER, D. & MCLINTOSH, N. **Infection Prevention. Guidelines for healthcare facilities with limited resources**. JHPIEGO. USA. Mar 2003. Disponível em

<http://www.reproline.jhu.edu/english/4morerh/4ip/IP_manual/ipmanual.htm> acesso em 29 de outubro de 2010.

TEIXEIRA, P. & VALLE, S. **Biossegurança uma abordagem multidisciplinar**. Editora FIOCRUZ. 3ª Reimpressão. Rio de Janeiro. 2002.

World Health Organization (WHO). Practical Guidelines for Infection Control in Health care Facilities. India. 2004. Disponível em
<http://www.searo.who.int/LinkFiles/Publications_PracticalguidelinSEAROpub41.pdf> acesso em 24 de novembro de 2010.