



**Sara Raquel  
dos Santos  
da Silva**

**Tradução e revisão de protocolos no domínio  
da bioquímica**





**Sara Raquel  
dos Santos  
da Silva**

**Tradução e revisão de protocolos no domínio  
da bioquímica**

Projeto apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tradução Especializada, realizado sob a orientação e coorientação científica da Professora Doutora Maria Teresa Murcho Alegre, Professora Auxiliar do Departamento de Línguas e Culturas da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, respetivamente.



Dedico este trabalho ao meu marido pelo apoio incondicional.



## **o júri**

presidente

Doutora Katrin Herget  
Leitora da Universidade de Aveiro

Prof.<sup>a</sup> Doutora Teresa Margarida dos Santos  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (arguente)

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Teresa Murcho Alegre  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (orientadora)





## **agradecimentos**

A realização deste projeto final só foi possível graças ao apoio constante de várias pessoas que fazem parte da minha vida, a quem dedico um obrigado muito especial:

Ao meu marido por simplesmente ser a minha alma gémea;

Aos meus pais por serem os melhores do mundo;

Ao meu irmão por acreditar em mim;

Ao meu sobrinho Samuel que apesar de estar longe está sempre nos meus pensamentos,

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram mesmo quando não ia treinar;

À Suzana e à Véronique que apenas conheci durante o Mestrado, mas que foram o meu rochedo neste percurso e às quais considero amigas para a vida;

À minha orientadora, a Prof. Doutora Maria Teresa Murcho Alegre, e ao meu coorientador, o Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, pelas dicas e sugestões que ajudaram a dar vida a este projeto;

À Doutora Liliana Gonçalves Fidalgo, pela disponibilidade em responder e explicar todas as minhas dúvidas;

A todos os que me deram força para fazer este Mestrado.



**palavras-chave**

Tradução Especializada, Análise tradutológica, Revisão, Legislação, Protocolos de kits enzimáticos, Protocolos experimentais, Enzimas.

**resumo**

O presente projeto insere-se no Mestrado em Tradução Especializada em Saúde e Ciências da Vida. Este trabalho visa a tradução de quatro protocolos de kits enzimáticos, destinados exclusivamente para a investigação, e de três protocolos experimentais, utilizados nos laboratórios do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro.

Pretende-se efetuar uma análise crítica à obrigatoriedade ou não de tradução deste género textual, do ponto de vista legal, quer a nível Europeu quer a nível nacional. Mais do que abordar criticamente a legislação referente à tradução de textos de instruções, o projeto visa principalmente descrever e analisar possíveis problemas de tradução, tendo por base o carácter funcionalista da análise textual de Nord e a organização do método tradutivo proposto por Gouadec.

Por último, sendo a revisão uma parte importante no processo de tradução, propõe-se a revisão de um protocolo experimental previamente traduzido, com uma abordagem à Norma Europeia de Tradução no que se refere a esta questão e à aplicabilidade desta à prestação de serviços de um tradutor freelance.



**keywords**

Specialised Translation, Translation analysis, Revision, Legislation, Enzymatic kit protocols, Experimental protocols, Enzymes

**abstract**

This project is part of the Master's Degree in Specialised Translation in the field of Health and Life Sciences. The aim is to translate four enzymatic kit protocols, intended to be used for research purposes only, as well as three experimental protocols, used in laboratorial classes at the Department of Chemistry in the University of Aveiro.

A critical analysis can be found on this piece of work regarding the matter of whether or not the translation of this text genre is mandatory, from a legal point of view, considering both European and Portuguese legislation. More than just presenting critical considerations regarding legislation on the translation of instrumental texts, the main aim of this project is to describe and analyse possible translation problems, based on the functionalist nature of Nord's text analysis and the translation methodology by Gouadec.

Last but not least, since revision is an important part of the translation process, an approach is made regarding the revision of an experimental protocol previously translated, taking into account the European Standard for Translation Services and its possible application to services provided by freelance translators.



## Índice

Índice.....	1
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	3
Lista de Anexos .....	5
1. Introdução.....	7
2. Enquadramento temático da Bioquímica.....	11
2.1 Protocolos de kits enzimáticos .....	17
2.2 Protocolos experimentais.....	18
3. Metodologia de tradução e de revisão.....	21
3.1 Tradução .....	21
3.2 Revisão .....	26
4. Ferramentas de tradução .....	29
5. Análise tradutológica.....	31
5.1 Caracterização do género textual.....	31
5.2 Protocolos dos kits enzimáticos .....	32
5.2.1 Macroestrutura .....	33
5.2.2 Microestrutura .....	35
5.2.3 Dificuldades e estratégias.....	37
5.3 Protocolos experimentais.....	43
5.3.1 Macroestrutura .....	45
5.3.2 Microestrutura .....	47
5.3.3 Dificuldades e estratégias.....	50
5.3.4 Revisão do texto 8 – Experiment no. 4 – Cellulose degradation.....	54
6. Conclusão .....	57
7. Bibliografia .....	59
8. Anexos.....	61

ANEXO A.....	63
ANEXO B.....	103
ANEXO C.....	109
ANEXO D.....	113
ANEXO E.....	209
ANEXO F.....	235
ANEXO G.....	241
ANEXO H.....	255
ANEXO I.....	261
ANEXO J.....	267
ANEXO K.....	273
ANEXO L.....	279
ANEXO M.....	285
ANEXO N.....	291
ANEXO O.....	297
ANEXO P.....	303
ANEXO Q.....	309
ANEXO R.....	315
ANEXO S.....	325
ANEXO T.....	335
ANEXO U.....	343
ANEXO V.....	351
ANEXO W.....	361
ANEXO X.....	371



## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>CAT</b>	Computer-Assisted Translation
<b>DLC</b>	Departamento de Línguas e Culturas
<b>DQ</b>	Departamento de Química
<b>IATE</b>	Inter-Active Terminology for Europe
<b>INFARMED</b>	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
<b>MBPL</b>	Manual de Boas Práticas de Laboratório
<b>PST</b>	Prestador de Serviços de Tradução
<b>RCAAP</b>	Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal
<b>RUO</b>	Research use only
<b>SPQ</b>	Sociedade Portuguesa de Química
<b>TC</b>	Texto(s) de chegada
<b>TP</b>	Texto(s) de partida
<b>UA</b>	Universidade de Aveiro
<b>UE</b>	União Europeia



## Lista de Anexos

<b>ANEXO A</b>	Decreto-Lei nº 189/2000 de 12 de agosto do Ministério da Saúde
<b>ANEXO B</b>	Artigo nº 8 do Anexo I do Decreto-Lei nº 189/2000
<b>ANEXO C</b>	Resposta do INFARMED
<b>ANEXO D</b>	Guia de Segurança do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
<b>ANEXO E</b>	Manual de Boas Práticas Laboratoriais
<b>ANEXO F</b>	Exemplo de um protocolo de reagente para diagnóstico <i>in vitro</i>
<b>ANEXO G</b>	Exemplo de um protocolo de reagente para diagnóstico <i>in vitro</i>
<b>ANEXO H</b>	Texto 1 – Acetyl-Coenzyme A Assay Kit
<b>ANEXO I</b>	Tradução – Kit enzimático para determinação da acetil-coenzima A
<b>ANEXO J</b>	Texto 2 – Asparaginase Activity Assay Kit
<b>ANEXO K</b>	Tradução – Kit enzimático para determinação da atividade da asparaginase
<b>ANEXO L</b>	Texto 3 – HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit
<b>ANEXO M</b>	Tradução – Kit de quantificação de HDL e LDL/VLDL
<b>ANEXO N</b>	Texto 4 – L-Carnitine Assay Kit
<b>ANEXO O</b>	Tradução – Kit enzimático para determinação da L-Carnitina
<b>ANEXO P</b>	Texto 5 – Experiment no. 2 – Enzymes in Laundry Detergents
<b>ANEXO Q</b>	Tradução – Protocolo nº 2 – Enzimas em detergentes para a roupa
<b>ANEXO R</b>	Texto 6 – Experiment no. 13 – Continuous immobilized enzymes reactor
<b>ANEXO S</b>	Tradução – Protocolo nº 13 – Reator contínuo de enzimas imobilizadas
<b>ANEXO T</b>	Texto 7 – Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase
<b>ANEXO U</b>	Tradução – Especificidade do substrato da invertase e da amilase e a inibição da invertase
<b>ANEXO V</b>	Texto 8 – Experiment no. 4 – Cellulose degradation
<b>ANEXO W</b>	Tradução – Trabalho nº 1 – A degradação da celulose
<b>ANEXO X</b>	Revisão – Protocolo nº 4 – Degradação da celulose



## 1. Introdução

O presente projeto, inserido no segundo ano do Mestrado em Tradução Especializada em Saúde e Ciências da Vida, da Universidade de Aveiro (UA), representa a parte final de um percurso de dois anos. Ao longo desses dois anos foi-nos dada a possibilidade de recordar, aprender e aprofundar conhecimentos científicos, metodologias de trabalho e competências de análise e investigação no âmbito da tradução especializada, no decorrer das aulas e através de diversos trabalhos académicos realizados durante esse período de tempo.

No segundo semestre do primeiro ano, alguns alunos tiveram a oportunidade de experienciar uma situação real ao fazerem um estágio numa empresa de tradução. Outros, como eu, puderam, por sua vez, desenvolver um projeto de tradução, o qual consistiu na tradução de um artigo à nossa escolha, na área da Saúde e Ciências da Vida, e a conseqüente redação de uma reflexão crítica sobre as metodologias tradutológicas postas em prática. A área de trabalho do meu anterior projeto incidiu sobre a Bioquímica, tendo em conta as repercussões desta em áreas como a biotecnologia, a farmacologia e a saúde. Além disso, a Bioquímica sempre me despertou um grande interesse. Por conseguinte, e para o projeto final de Mestrado, decidi continuar a trabalhar no mesmo campo, tentando aprofundar um pouco mais as questões pertinentes referentes aos textos abordados e às metodologias de tradução. Importa então, primeiramente, explicar em que consistiu o trabalho do ano passado, antes de passar à descrição do presente trabalho.

O projeto do ano passado abrangeu a tradução de apenas dois textos do mesmo género textual – protocolos de kits enzimáticos, mais especificamente para a determinação da presença dos ácidos L/D-málico em vinhos, sumos de fruta e outros.

O atual projeto consiste na tradução de protocolos experimentais, utilizados nos laboratórios do Departamento de Química (DQ) da UA, e de protocolos de kits enzimáticos destinados exclusivamente para investigação (*research use only* – RUO). Para além dos protocolos referidos, existe um outro tipo que se destina ao diagnóstico *in vitro*. Os protocolos de

diagnóstico *in vitro* requerem, por lei, a tradução obrigatória para a língua portuguesa, uma vez que se destinam à utilização por profissionais da área da saúde em laboratórios e hospitais. Veremos mais à frente que essa obrigatoriedade não se aplica aos protocolos de kits enzimáticos RUO. Contudo, torna-se pertinente questionar a obrigatoriedade de tradução apenas para um destes tipos de protocolo. Não seria interessante que este género de documentação fosse obrigatoriamente traduzida para a língua portuguesa, independentemente do seu público-alvo? Todos estes protocolos são referentes a kits enzimáticos e estão incluídos no género de textos de carácter instrumental/instrucional. Deverão todos ser traduzidos para a língua portuguesa?

Tendo em conta o público-alvo deste género textual, em particular dos que se preveem ser utilizados por técnicos analistas, investigadores ou outros profissionais da área da saúde, torna-se efetivamente relevante, e necessário, que os textos de partida (TP) não permaneçam no original (neste caso, em inglês), com o intuito de evitar qualquer tipo de erro que possa vir a ser provocado por má compreensão do texto original. Conforme referido anteriormente, um dos objetivos do projeto passa por levantar a questão da pertinência da tradução, da obrigatoriedade de tradução, prevista na legislação portuguesa e europeia, de protocolos destinados ao diagnóstico *in vitro* comparativamente aos protocolos exclusivos para investigação, e ainda a pertinência da tradução de protocolos experimentais para uso efetivo nos laboratórios do DQ da UA. Ainda, e por se tratar de um Projeto de Mestrado em Tradução Especializada, propõe-se a revisão da tradução de um protocolo experimental, anteriormente traduzido, na qual será abordada e analisada a utilização do capítulo sobre a revisão da Norma Europeia de Tradução 15038:2006, e a sua aplicabilidade para o tradutor freelance comparativamente às empresas de tradução.

No entanto, o projeto não se caracteriza apenas por levantar as questões acima referidas. Acima de tudo, trata-se de um projeto de tradução e este não ficaria completo sem a menção e aplicação de metodologias tradutológicas, que serviram de suporte ao processo de tradução propriamente dito. Para este trabalho, optamos por basear a tradução na metodologia de Gouadec, no seu modelo dividido em três fases – pré-tradução, tradução e pós-tradução. Para além disso, pretendem-se também abordar as teorias funcionalistas de Christiane Nord no âmbito da análise do TP no qual se inserem. No entanto, esta escolha não é vinculativa e serão abordados outros autores dos estudos de tradução, sempre e quando novas teorias se adaptem ao projeto em causa e as mesmas possam ser discutidas com vantagem.

Em primeiro lugar, surge um enquadramento temático da área da Bioquímica, no qual se integram as definições dos dois tipos de protocolo estudados e o ponto de vista legal - tanto a

nível Europeu como a nível nacional - no que se refere à obrigatoriedade de tradução ou não deste género textual. São apresentadas ainda algumas normas estabelecidas para laboratórios de análises clínicas em comparação com aquelas elaboradas para os laboratórios do DQ da UA, com o intuito de analisar as diferenças ou semelhanças, caso existam, entre ambos os documentos. Na parte final deste ponto, é feita uma descrição mais pormenorizada dos problemas e esforços surgidos para encontrar informação neste campo.

De seguida são abordados os referentes teóricos da tradução e da revisão, assim como a pertinência da aplicabilidade da Norma Europeia de Tradução no contexto da realidade de um tradutor freelance, comparativamente à das empresas de tradução.

Para além das exposições teóricas, pretende-se efetuar a análise tradutológica dos textos traduzidos, sendo esta, na minha opinião, uma das partes mais importantes neste trabalho. A análise tradutológica incide sobre a caracterização mais detalhada do género textual de ambos os protocolos, referindo as possíveis dificuldades de tradução, quer a nível linguístico, quer a nível da tradução, e as estratégias utilizadas para as ultrapassar.

Em suma, o objetivo principal deste projeto é descrever, o mais pormenorizadamente possível, as diversas fases do processo tradutológico com que o tradutor se depara, desde a receção e análise dos TP, à pesquisa, à tradução e estratégias utilizadas para resolver problemas, à utilização de ferramentas de apoio, e à consequente entrega e apresentação do seu trabalho.





## 2. Enquadramento temático da Bioquímica

A Bioquímica é a ciência que conjuga entre si a Química e a Biologia, uma vez que estuda as reações químicas que ocorrem nos seres vivos. Esta ciência tornou-se independente há relativamente poucos anos, pois era considerada apenas um ramo da Química. É uma ciência direcionada particularmente para a investigação, o que a torna, a meu ver, deveras interessante. É como uma catapulta para as descobertas dos segredos da vida. Contudo, não é minha intenção descrever ou explicar o que é a Bioquímica e tudo o que ela envolve, porque não é disso que trata este projeto. Passemos então à breve apresentação dos TP.

Os TP em análise dividem-se em dois grandes grupos: os protocolos dos kits enzimáticos RUO e os protocolos experimentais, utilizados como meio de aprendizagem nos laboratórios do DQ da UA.

Na tentativa de uma melhor organização a nível estrutural do projeto identificamos os textos da seguinte forma:

**TEXTO 1** – Acetyl-Coenzyme A Assay Kit

**TEXTO 2** – Asparaginase Activity Assay Kit

**TEXTO 3** – HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit

**TEXTO 4** – L-Carnitine Assay Kit

**TEXTO 5** – Experiment nº 2 – Enzymes in laundry detergents

**TEXTO 6** – Experiment nº 13 – Continuous immobilized enzyme reactor

**TEXTO 7** – Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase

**TEXTO 8** – Experiment nº 4 – Cellulose degradation

Os textos de 1 a 4 são protocolos de kits enzimáticos RUO. Os textos de 5 a 8 são, por sua vez, protocolos experimentais. Todos os TP serão sujeitos à análise da sua macro e microestrutura

e à sua tradução posterior, exceto o texto 8 que já se encontra traduzido. Este último texto (8) serve de atividade prática de revisão, uma vez que o mesmo foi traduzido anteriormente por uma ex-aluna do Departamento de Línguas e Culturas (DLC) da UA.

Todos os TP abordam a utilização de enzimas específicas para determinação de substâncias presentes numa amostra. Atualmente são utilizadas enzimas de grande especificidade para determinados substratos como catalisadoras em diagnóstico. A sua utilização em diagnósticos e em investigações foi possível graças aos avanços nas áreas da bioquímica e da biomédica, que permitiram a identificação e caracterização de enzimas relevantes.

Para que este tipo de produto (kit enzimático) possa ser comercializado em grande escala, as entidades produtoras devem seguir a legislação específica existente no país onde se encontram sedeadas, ou, no caso de exportarem os seus produtos, deverão ter em conta a legislação em vigor dos seus mercados de destino. Vejamos, por exemplo, o caso de Portugal que, fazendo parte da União Europeia (UE), deve seguir a legislação específica para a produção e comercialização deste tipo de produtos.

Portugal integrou a UE em 1986 com o objetivo de retirar mais-valias de uma união económica, que nessa altura contava já com vários países europeus. A UE surgiu “com o intuito de incentivar a cooperação económica na Europa, partindo-se do pressuposto de que os países com relações comerciais se tornam economicamente dependentes, reduzindo assim os riscos de conflito.”<sup>1</sup>

De facto, desde a sua criação, em 1958, a Europa assistiu à evolução de um grande mercado único em constante evolução. Embora tivesse os contornos de uma união apenas a nível económico, rapidamente evoluiu para uma organização que estende os seus domínios de intervenção desde a ajuda ao desenvolvimento à política ambiental. Os princípios da UE baseiam-se num Estado de direito. Significa que toda a sua atuação resulta da aprovação, voluntária e democrática, de Tratados, por todos os Estados-membros. A aprovação dos tratados torna-se deveras importante para todos os Estados-membros, pois neles estão definidos os objetivos da UE no que se refere aos seus variados domínios de intervenção, quer sejam eles políticos, sociais ou económicos. Por exemplo, o mercado único é o “principal motor da economia europeia”, uma vez que permite a circulação livre de pessoas, bens, serviços e capitais.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTAMENTO DE COMUNICAÇÃO DA COMISSÃO EUROPEIA, in *Informações Gerais sobre a União Europeia* ([http://europa.eu/about-eu/index\\_pt.htm](http://europa.eu/about-eu/index_pt.htm)), consultado em 12 de agosto de 2013.

<sup>2</sup> *Ibid.*

Logo, torna-se evidente a existência e a importância de legislação europeia também no que diz respeito à questão de dispositivos médicos, neste caso particular dos reagentes (kits enzimáticos) para diagnóstico. Após a aprovação de uma medida por parte da UE, cabe a cada país harmonizar as diretivas no panorama legislativo nacional, com o intuito de ir ao encontro do que foi estabelecido a nível europeu, por forma a facilitar e agilizar, neste caso específico, a livre circulação de dispositivos médicos no mercado europeu.

Numa primeira fase do projeto, fez-se a pesquisa de legislação existente sobre protocolos de kits enzimáticos e, de seguida, no decorrer da análise do género textual, demos conta da existência de vários tipos de dispositivos médicos (instrumentos de saúde utilizados para diversos fins no que se refere à saúde, nos quais estão englobados os protocolos de kits enzimáticos). Neste projeto são abordados essencialmente os dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* e os dispositivos médicos RUO.

Numa segunda fase, a leitura atenta da legislação europeia e nacional encontrada permitiu constatar que, a nível europeu, existe a DIRECTIVA 98/79/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, de 27 de Outubro de 1998, relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. E a nível nacional, existe o Decreto-Lei nº 189/2000, de 12 de agosto, que transpõe a diretiva europeia para a realidade nacional (Anexo A). Ambas as legislações definem a produção e a comercialização dos reagentes, designados como dispositivos médicos.

A existência de um Decreto-Lei por si só não é suficiente. Tem de haver uma entidade que faça cumprir as normas definidas no documento. Em Portugal, existe a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., mais comumente conhecida por INFARMED.

O INFARMED é uma entidade pública integrada na administração indireta do Estado. No entanto, tem autonomia administrativa, financeira e património próprio. A sua principal função passa pela regulamentação e pelo supervisionamento do setor dos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos e de higiene corporal. Para além disso, tem de garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos, dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal, de qualidade, eficazes e seguros, de acordo com a legislação europeia e nacional.<sup>3</sup>

No que diz respeito à legislação portuguesa, e conforme já referido anteriormente, o Decreto-Lei 189/2000 transpõe para o ordenamento jurídico interno a Diretiva nº 98/79/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de outubro. Sumariamente, este Decreto-Lei tem como

principal objetivo conciliar as disposições nacionais dos Estados-membros relativas à conceção, ao fabrico e à colocação no mercado dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.

Para além de outras informações, neste diploma encontra-se determinado o conceito de “dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*”. De acordo com a definição, este pode ser um instrumento utilizado *in vitro* para análises de amostras do corpo humano que tem como objetivo determinar a existência ou não de determinadas patologias.

«Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*», **qualquer dispositivo médico que consista num reagente, produto reagente**, calibrador, material de controlo, conjunto, instrumento, aparelho, equipamento ou sistema, utilizado isolada ou conjuntamente, **destinado pelo fabricante a ser utilizado *in vitro*** para análise de amostras provenientes do corpo humano, incluindo sangue e tecidos doados, exclusiva ou principalmente com o objetivo de obter dados relativos ao estado fisiológico ou patológico, anomalias congénitas.<sup>4</sup>

No entanto, quem se aventura pela primeira vez nesta linguagem tem dificuldade em entender o que são dispositivos médicos. Da mesma forma que encontramos uma definição para este termo na legislação portuguesa existem outras fontes onde se pode pesquisar sobre este assunto. Tendo em conta que a entidade responsável por este género de produtos é o INFARMED, podemos encontrar no seu sítio da Internet o conceito deste termo. O INFARMED explica que os dispositivos médicos são essencialmente “instrumentos de saúde”, nos quais se englobam outro tipo de produtos. As suas funções são definidas pelo fabricante e podem ser utilizados na prevenção, no diagnóstico ou no tratamento de doenças. Embora tenham um objetivo comum aos dos medicamentos, distinguem-se por não utilizarem mecanismos farmacológicos, metabólicos ou imunológicos.<sup>5</sup>

Após uma análise a estes conceitos, entende-se que os reagentes RUO não se classificam nestas definições, pois a sua finalidade é unicamente a investigação e não devem ser utilizados para outros fins. Embora não se insiram na legislação referida, considera-se pertinente o estudo do ANEXO I do Decreto-Lei nº 189/2000. Nesse anexo estão descritos os requisitos essenciais: gerais (A) e relativos à conceção e ao fabrico do produto (B). A parte B do anexo em causa é

<sup>3</sup> INFARMED, in *Sobre o Infarmed* ([http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE\\_O\\_INFARMED/APRESENTACAO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE_O_INFARMED/APRESENTACAO)), consultado em 12 de agosto de 2013.

<sup>4</sup> Alínea b, artigo nº 3, Decreto-Lei nº 189/2000 de 12 de agosto do Ministério da Saúde. Diário da República SÉRIE I-A, Nº 186. (<http://www.dre.pt/utel/getdiplomas.asp?iddip=20002329>), consultado em 06 de junho de 2013.

<sup>5</sup> INFARMED, in *Sobre o Infarmed* ([http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE\\_O\\_INFARMED/APRESENTACAO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/SOBRE_O_INFARMED/APRESENTACAO)), consultado em 12 de agosto de 2013.

aquela que mais significado traz para este projeto, mais especificamente o artigo nº 8 (Anexo B), uma vez que é nesse artigo que estão descritas todas as características da macroestrutura que o folheto informativo/protocolo do produto reagente deve conter.

O artigo nº 8 consiste na enumeração de uma lista de informações que deverão ser fornecidas pelo fabricante e as quais deverão acompanhar o produto, sob pena deste não poder ser comercializado. Uma das particularidades que vale a pena referir neste contexto é a obrigação de que cada “dispositivo”, independentemente da sua natureza, deve ser acompanhado de um folheto informativo, no qual devem estar contidas todas informações necessárias para a sua correta utilização. Ainda, e de acordo com a alínea 8.1, as informações devem ter em conta a formação e os conhecimentos dos potenciais utilizadores, pois prevê-se que estes sejam capazes de compreender as instruções de utilização do produto. Para além das normas iniciais, a legislação obriga à redação das instruções de utilização e do rótulo em língua portuguesa. Tendo em conta a existência de inúmeras empresas deste setor no mercado internacional, existe aqui uma obrigatoriedade de tradução dos protocolos. Partimos da análise da legislação para os produtos destinados para o diagnóstico *in vitro*, no entanto é minha opinião que esta obrigatoriedade de tradução deveria ser alargada a todo o tipo de produto que seja comercializado, independentemente da sua finalidade e do seu público-alvo. Esta é uma questão problemática que será abordada mais adiante neste projeto.

Não obstante o objetivo do Decreto-Lei em análise, podemos verificar que os TP cumprem alguns dos requisitos. Por exemplo, o artigo 8.5 do ANEXO I diz que o fabricante deve especificar claramente nas instruções a finalidade prevista para o dispositivo, caso esta não seja evidente para o utilizador. Em todos os quatro TP encontramos a seguinte informação:

**“This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses.”**

**Este produto destina-se apenas ao uso exclusivo em I&D.** Não deve ser usado como medicamento, em usos domésticos ou para outros fins.

Mais à frente, no artigo 8.7 do mesmo anexo, lê-se que nas instruções de utilização deve constar a composição do reagente no que diz respeito à sua natureza e quantidade ou concentração do(s) ingrediente(s) ativo(s) do(s) reagente(s) ou conjunto(s). Esta informação também aparece nos protocolos em análise. A título de exemplo:

### “Components

Acetyl-CoA Assay Buffer 25 mL  
Catalog Number MAK039A

Fluorescent Probe, in DMSO 0.2 mL  
Catalog Number MAK039B”

Nos TP existem outras informações, tais como as condições de armazenamento, a descrição pormenorizada do procedimento a adotar aquando da utilização do dispositivo e a abordagem matemática com base na qual se efetua o cálculo do resultado analítico, constantes no artigo 8.7.

### “Storage Temperature –20 °C”

“Acetyl CoA Standards for **Fluorometric Detection**: Assay Range (0.2–1 nmole): **Dilute** 10 mL of the 10 mM Acetyl CoA standard solution with 990 mL of water to prepare a 0.1 mM standard solution.”

Embora se tenha analisado brevemente o Decreto-Lei referente aos produtos para diagnóstico *in vitro*, e se tenha efetuado uma comparação entre o que a legislação exige para os protocolos desse género de produto e o protocolo para RUO, houve a preocupação de procurar saber se para os protocolos RUO existia ou não legislação específica, na qual fosse também obrigatório a tradução para a língua portuguesa. Não tendo encontrado nenhuma resposta, decidiu-se questionar diretamente a entidade responsável pelos dispositivos médicos em Portugal. A questão colocada ao INFARMED partiu, primeiramente, da apresentação do presente projeto. Seguidamente, questionou-se se os protocolos para RUO seguiam a mesma legislação dos protocolos para diagnóstico *in vitro*, relativamente à obrigatoriedade de tradução dos folhetos informativos.

Em traços gerais, a resposta do INFARMED (Anexo C) esclarece que, de acordo com a Diretiva 98/79/EC, os produtos usados exclusivamente para investigação, sem qualquer objetivo médico, não são considerados como dispositivos destinados à avaliação do departamento funcional. Na Diretiva é referido ainda que os reagentes produzidos nos laboratórios das instituições de saúde para serem utilizados nos próprios laboratórios, sem qualquer fim comercial, também não são abrangidos pela presente diretiva. No entanto, o INFARMED remete ainda para a *guideline* MEDDEV. 2.14/2 rev.1 - IVD GUIDANCE ; referente aos produtos RUO. Esta Diretiva sumariza o conceito de produtos exclusivamente para investigação, sublinhando que para

um produto ser categorizado como RUO, não poderá ter uma finalidade ou um objetivo médico. Logo, quer a Diretiva 98/79/EC quer o Decreto-Lei nº 189/2000, que a transpõe para a legislação nacional, relativos aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, não se aplica aos RUO, pelo que não existe obrigatoriedade de tradução em língua portuguesa do respetivo folheto informativo ao abrigo destes diplomas.

Após esta conclusão, entendemos que este género de protocolos não precisa de tradução para a língua portuguesa, pois não existe obrigatoriedade para que a mesma seja efetuada. No entanto, se analisarmos a finalidade e o público-alvo de uma tradução podemos encontrar várias metas. Ou seja, por um lado, se o público-alvo destes documentos fosse cientistas e investigadores, profissionais da mesma área e com um nível de conhecimento igual ao dos seus pares (os autores do texto) a tradução para a língua portuguesa não seria considerada. Porquê? A tradução não seria considerada porque existe uma perceção enraizada que profissionais com um grande nível de conhecimento, seja em que área for, têm um largo conhecimento da língua inglesa, logo não existe dificuldade de compreensão da mensagem contida no documento. Por outro lado, e neste caso concreto, o público-alvo de todos os textos (protocolos RUO e protocolos experimentais) são os alunos do DQ da UA. Partimos do princípio que estes ainda se encontram em formação quer na área da química e bioquímica quer na área das línguas. A tradução dos TP parece-nos pertinente, uma vez que estaremos a dar a esses alunos a oportunidade de lerem e estudarem informações e procedimentos de bioquímica em língua portuguesa.

## **2.1 Protocolos de kits enzimáticos**

De uma forma geral, o protocolo é o texto que acompanha o kit enzimático, ou seja o folheto informativo utilizado para determinação de parâmetros bioquímicos, no qual se encontram as informações necessárias para a sua correta utilização, por profissionais da área da saúde.

De acordo com a legislação portuguesa, o folheto informativo dos produtos para diagnóstico deve ser estruturado de forma a conter determinadas informações e instruções, passíveis de serem devidamente compreendidas e executadas pelos seus potenciais utilizadores.

As informações de utilização do produto serão novamente abordadas mais à frente na análise da macroestrutura deste género textual.

Conforme referido anteriormente, e no contexto deste projeto, existem dois tipos de reagentes: os que se destinam para o diagnóstico *in vitro* e os que se destinam unicamente à investigação. No sítio do INFARMED temos a oportunidade de verificar a controvérsia existente entre estes dois tipos de reagentes. Muitas vezes os reagentes RUO são adquiridos para outros fins, como por exemplo para a deteção, o diagnóstico ou a monitorização de estados fisiológicos ou patológicos. Tendo em conta que este não é o fim previsto pelos fabricantes de reagentes RUO, o INFARMED não pode garantir a sua conformidade com os requisitos aplicáveis aos reagentes para diagnóstico *in vitro* no que se refere à conceção, fabrico e colocação no mercado.<sup>6</sup> Temos de ter em conta que, para além do não cumprimento ao estabelecido no Despacho n.º 8835/2001 (II série), de 27 de Abril de 2001, referente ao Manual de Boas Práticas de Laboratório (Capítulo II, ponto 4.2), o INFARMED responsabiliza única e exclusivamente os utilizadores e outros responsáveis pelo laboratório pela utilização indevida dos reagentes.

Se existe legislação específica para os reagentes de diagnóstico *in vitro*, esta deve ser cumprida quer pelos seus fabricantes quer pelos seus utilizadores, para que não exista a possibilidade de colocar em perigo a saúde dos utentes e dos profissionais que os utilizam.

## 2.2 Protocolos experimentais

De acordo com a área sobre a qual estamos a trabalhar, o protocolo experimental pode ter diversas definições. No entanto, todas recaem sobre a mesma descrição. A título de exemplo, de acordo com o *Medical Dictionary*, o protocolo é um plano escrito, no qual estão especificados os procedimentos que devem ser seguidos para chegar a uma determinada conclusão. No caso concreto do protocolo experimental, para uso na sala de aulas, este consiste numa atividade relacionada com problemas e questões aplicadas na área das Ciências da Vida. É constituído essencialmente pela descrição do tema e dos objetivos da experiência, do procedimento experimental, nas suas várias fases e, por último, por várias questões que o aluno deverá

<sup>6</sup> INFARMED, in *Aquisição e utilização de reagentes destinados exclusivamente à investigação* ([http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS\\_MEDICOS/AQUISICAO\\_E\\_UTILIZACAO/AQUISICAO\\_UTILIZACAO\\_REAGENTES\\_INVESTIGACAO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS_MEDICOS/AQUISICAO_E_UTILIZACAO/AQUISICAO_UTILIZACAO_REAGENTES_INVESTIGACAO)), consultado em 08 de julho de 2013.



conseguir responder no final da sua experiência.

Para a execução dos protocolos experimentais, os alunos devem ter conhecimento das normas gerais e procedimentos de segurança que devem seguir quando se encontram no laboratório, por forma a não porem em perigo a sua saúde e a dos outros. Como tal, o DQ da UA elaborou um Guia de Segurança (Anexo D), com a ajuda de diversas pessoas, em especial de alguns dos diversos Presidentes do Conselho Diretivo desse Departamento e pelos responsáveis pela segurança do mesmo. De todos os anexos que fazem parte integrante deste documento, o que se torna pertinente comentar é o anexo 6, intitulado Guia de segurança do laboratório de aulas, no qual estão descritas detalhadamente as instruções que devem ser seguidas pelos alunos.

A nível nacional, também existe um manual que se assemelha ao que foi criado pelo DQ da UA, intitulado de Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL) (Anexo E) que deve ser cumprido pelos profissionais de saúde com o objetivo de proporcionarem um serviço de qualidade de cuidados de saúde. De acordo com este manual, cada laboratório deverá adaptar as normas à sua realidade. Aprovado pelo Despacho nº 8835/2001 (2ª série) de 27 de Abril de 2001 e emitido pelo Ministério da Saúde, o objetivo principal do MBPL traduz-se na tentativa de aperfeiçoar as práticas laboratoriais por forma a aumentar o nível de proteção da saúde e, dessa forma, permitir a acreditação dos laboratórios e a sua integração no sistema de qualidade da saúde.

Quer o MBPL quer o Guia de segurança do DQ da UA referem-se a atitudes e comportamentos exigidos pela prática laboratorial. A Química está associada a uma atividade experimental, realizada em laboratórios, quer quando se trata de investigação, diagnóstico ou apenas experimental numa sala de aulas. Contudo, esta prática envolve sempre riscos de diversa natureza por vezes difíceis de controlar. Estes manuais pretendem e procuram, cada um à sua maneira, minimizar erros de diagnóstico e de acidentes que possam expor pessoas e bens a situações de risco.

Após uma leitura mais atenta de ambos os documentos, conclui-se que estes se complementam a longo prazo. O Guia de segurança do DQ da UA procura instruir os futuros cientistas e analistas a trabalhar de uma forma segura, correta e adequada. É o passo inicial para um modo de laboração que irá ser aperfeiçoado ao longo dos anos e complementado futuramente nos locais de trabalho profissionais, através do cumprimento das práticas laboratoriais descritas no MBPL, por forma a alcançar uma prestação de serviços de saúde com qualidade.

Tratando-se este de um projeto de tradução, a prestação de um serviço com qualidade é também um dos seus objetivos principais. Dessa forma, enquanto estudantes de tradução especializada foram-nos proporcionados os meios para atingir esse fim. O capítulo seguinte expõe e explica a metodologia e ferramentas utilizadas para realizar a tradução a que nos propusemos, tendo em conta os conhecimentos adquiridos durante os dois anos de Mestrado.

### **3. Metodologia de tradução e de revisão**

#### **3.1 Tradução**

A tradução não é um processo fácil nem linear. Em termos de estudo, a tradução só começou a ser objeto de investigação tardiamente. Embora seja interessante escrever sobre a história da tradução, o conceito de tradução que efetivamente importa neste projeto é o da tradução de textos de especialidade, de acordo com a abordagem funcionalista da tradução. Essencialmente, segundo essa abordagem, a tradução é considerada como um ato de comunicação entre indivíduos de diferentes línguas e culturas.

O estudo dos processos tradutivos no âmbito desses géneros textuais começou a desenvolver-se nos anos 1970. Embora a teoria funcionalista de tradução seja atribuída a Hans. J. Vermeer, esta abordagem não foi inventada no século XX. Por exemplo, na obra de Christiane Nord e de acordo com esta, ao longo da história podemos encontrar tradutores que se debateram com o seguinte dilema: traduzir literalmente ou traduzir livremente. Situações diferentes requererem traduções diferentes. (cf Nord, 1997: 4). No entanto, apesar de já existir uma ideia de adaptação ao público-alvo, característica do modelo funcionalista de tradução, até à década de 70 dava-se uma maior importância à compreensão e interpretação do texto sem qualquer referência a estratégias de solução das dificuldades do tradutor.

Vermeer sentia a necessidade de se afastar das teorias linguísticas de tradução que prevaleciam nessa altura e, acima de tudo, preencher o vazio que existia (na altura) entre a teoria e a prática. Na sua obra “*Framework for a General Translation Theory*”, Vermeer assume a sua posição sobre o assunto:

Linguistics alone won't help us. First, because translating is not merely and not even primarily a linguistic process. Secondly, because linguistics has not yet formulated the right questions to tackle our problems. So let's look somewhere else. (*apud Nord, 1997: 10*)

Vermeer considera a tradução como uma transferência de signos comunicativos verbais e não-verbais de uma língua para outra. Este defende que o ato de traduzir é uma ação humana, dotada de intenções e propósitos, que tem lugar numa situação específica, e que se insere num determinado sistema cultural. Ou seja, a tradução não pode ser considerada como uma transferência palavra por palavra entre línguas. Tendo em conta uma teoria de comunicação humana, a tradução não se pode basear apenas na linguística, independentemente da complexidade que isso possa aportar. A tradução é um ato de comunicação, baseado num TP, com um determinado objetivo e propósito. O papel do tradutor é transferir a informação do TP, tendo em conta o objetivo da comunicação, o público-alvo e a cultura de chegada. Resumindo, para Vermeer, cada tradução é direcionada para um público-alvo específico, tendo em conta que traduzir significa “to produce a text in a target setting for a target purpose and a target addressees in target circumstances” (*apud Nord, 1997: 11s.*)

Christiane Nord baseia as suas obras nas teorias de Reiss e Vermeer, numa tentativa de sistematização das características do funcionalismo e na aplicação das mesmas na formação de tradutores. A abordagem de Christiane Nord, relativamente à análise do TP, complementa uma das fases do processo de tradução de Gouadec – a da pré-transferência, tendo em conta que através de uma análise inicial ao texto rapidamente se categoriza o género textual do mesmo. O conhecimento do género textual tem um grande peso na tradução funcionalista, como defende Christiane Nord.

Since text genres are characterized by conventional features, their classification plays an important role in functional translation. (Nord, 1997: 38)

A partir da identificação do tipo de texto que temos em mãos, e sabendo que cada género textual tem características únicas, o processo de tradução passa para um novo estágio – a identificação de possíveis problemas e diversas formas de ultrapassar essas situações. Para isso, não devemos esquecer qual o objetivo, a finalidade da tradução e o público-alvo e a cultura a que se destina.

Nord (1997: 47ss) apresenta uma tipologia de tradução baseada apenas em termos funcionalistas, numa tentativa de combinar as teorias e as considerações de House e de Reiss.

Assim, Nord defende que existem dois tipos de processos de tradução. O primeiro, a tradução documental, centrado no TP, e que pretende que o seu formato e conteúdo sejam reproduzidos de forma linear para o texto de chegada (TC). Em contrapartida, o segundo, a tradução instrumental, tem como objetivo a realização de adaptações e adequações no TP, tendo em conta o público e o contexto a que se destina, de forma a produzir um texto que exerça a mesma função do original. Baseando-se na função do processo de tradução e na função do TC como resultado do processo tradutivo, Nord estabelece então uma distinção entre ambos os tipos de processo.

The first [documental translation] aims at producing in the target language a kind of *document* of (certain aspects of) a communicative interaction in which a source-culture sender communicates with a source-culture audience via the source text under source-culture conditions. The second [instrumental translation] aims at producing in the target language an *instrument* for a new communicative interaction between the source-culture sender and a target-culture audience, using (certain aspects of) the source text as a model. (Nord, 1997: 47)

A escolha da teoria funcionalista de Nord como base para o meu projeto recai sobre o tipo de texto que tinha para traduzir. Os TP deste trabalho fazem parte de um tipo de texto com características muito próprias: os protocolos de reagentes e os protocolos experimentais.

Os protocolos, quer sejam experimentais ou não, são textos utilitários que têm como objetivo informar e dar instruções sobre como deve ser executado determinado processo. A finalidade da tradução destes textos é, acima de tudo, fazer crer ao destinatário que está a ler um texto produzido na sua língua e não uma tradução. Christiane Nord defende este ponto de vista ao referir que “[i]n the reception of an instrumental translation, readers are not supposed to be aware they are reading a translation at all” (Nord, 1997: 52).

Por conseguinte, o tradutor deverá começar por analisar o seu TP. Esta prática não se aplica apenas a este género textual, mas também a qualquer tipo de texto. A teoria funcionalista de Nord parece ser a mais adequada para a tradução de textos de especialidade, como por exemplo os deste projeto, os protocolos ou os manuais de instruções. Nord considera que a linguagem é utilizada com um propósito instrumental, neste tipo de textos. O objetivo principal de uma tradução instrumental é fazer com que o TC cumpra o propósito comunicativo do TP – “The result of an instrumental translation is a text that may achieve the same range of functions as an original text” (Nord, 1997: 50).

Nord apresenta ainda, na sua obra, três subtipos de tradução instrumental, de acordo com a função do TP e a função do TC:

- tradução equifuncional – quando a função do TP é a mesma da do TC (por exemplo, encontra-se na área dos textos técnicos, manuais de instrução e de utilização, receitas, textos de informação turística...);
- tradução heterofuncional – quando existem diferenças entre as funções do TP e as do TC (por exemplo, ocorre quando a função do TP não pode ser preservada por razões de desordem cultural e/ou temporal);
- tradução homóloga – quando se trata de uma tradução, por exemplo, no âmbito da poesia e na qual se permitem um certo grau de originalidade na adaptação cultural e temporal no TC.

Relativamente ao presente trabalho, a tradução é claramente equifuncional, uma vez que a função do TP é a mesma da do TC. Embora o público-alvo do TC seja diferente<sup>7</sup>, não houve necessidade de fazer adaptações na cultura de chegada.

Uma das tarefas iniciais do trabalho consistiu na pesquisa de normas e convenções deste género textual na cultura de chegada. Essa pesquisa resultou na leitura de diversos Decretos-Lei numa tentativa de encontrar convenções referentes aos protocolos, que pudessem ajudar na organização textual deste género de texto. Embora a legislação portuguesa especifique de uma forma geral o que deve conter um folheto informativo de reagentes para diagnóstico *in vitro*, resulta que não existe qualquer modelo específico que possa ser seguido. Não falando dos folhetos informativos de reagentes para RUO, que não são contemplados no Decreto-Lei 189/2000. Esta pesquisa inicial vai ao encontro das estratégias de tradução defendidas por Nord. “The form of the text is thus usually adapted to target-culture norms and conventions of text-type, genre, register and tenor” (Nord, 1997: 52). Na tradução instrumental, o tradutor deve ter em conta que o formato do texto é geralmente adaptado às normas e convenções do tipo de texto, género e registo da cultura de chegada. Uma vez que a legislação não esclarece quais as

<sup>7</sup> Os textos 1, 2, 3 e 4 destinam-se originalmente a técnicos de laboratório. Contudo, a tradução destina-se na língua de chegada a estudantes universitários.

convenções que devem ser seguidas, o próximo passo consistiu na pesquisa de textos paralelos. Ou seja, consistiu na procura de protocolos de kits enzimáticos RUO em língua portuguesa. A ideia era utilizar esses documentos como guia de convenções quando chegasse o momento da tradução propriamente dita. No entanto, apenas se encontraram exemplos de protocolos de kits enzimáticos para diagnóstico *in vitro* (anexo F e G). A diferença a nível gráfico e de conteúdo entre os dois documentos é bastante evidente. Tendo em conta que nenhum dos documentos segue a finalidade dos reagentes RUO, optou-se por não seguir nenhum dos exemplos. Em vez disso, decidiu-se que seria seguida a mesma estrutura gráfica de normas e convenções do TP, tendo em conta que o público-alvo seria capaz de compreender as instruções e informações constantes no texto, independentemente da forma gráfica que o TC tivesse. Na sua obra, Nord expõe que a tradução funcionalista não significa que as convenções do TP devam ser substituídas pelas da cultura de chegada. Tudo depende do propósito e do público-alvo e cabe ao tradutor optar pela adaptação ou não das convenções.

Functional translation does not mean that source-culture conventions must be replaced by target-culture conventions in each and every translation. Depending on the translation purpose and type, the translator may opt for reproduction or adaptation. (Nord, 1997: 57)

Qualquer tarefa independentemente da sua natureza precisa de um método a seguir, um modelo ou procedimento, sem o qual dificilmente se alcançaria o seu termo com êxito. A tradução, sendo ela própria uma tarefa, não é exceção. Dessa forma, antes de se iniciar um projeto de tradução existe a necessidade de determinar qual será a metodologia que irá servir de base a este trabalho.

Tendo em conta experiências anteriores, e por uma questão de gosto pessoal, seguiu-se o método de tradução de Gouadec (Gouadec, 2007: 12s). Embora este método esteja direcionado para tradutores profissionais e não possa ser aplicado ao contexto específico deste trabalho, adotou-se apenas a sua forma organizativa no método tradutivo.

Gouadec apresenta como processo de tradução um modelo organizado e dividido em três fases: pré-tradução, tradução e pós-tradução. A primeira fase, a da pré-tradução, engloba todas as tarefas que dizem respeito ao contacto inicial e ao consequente relacionamento entre o cliente e o tradutor, até ao momento em que o último recebe o material para traduzir. Nesta fase estão incluídas tarefas que têm a ver com a obtenção do trabalho, tais como orçamentação, negociação, discussão de todas as informações necessárias para execução do trabalho ou *translation brief*, como é designado inicialmente por Janet Fraser e posteriormente utilizado por

Christiane Nord (1997), e contratação. Naturalmente que neste contexto específico não existe um cliente. Logo, esta etapa não pode ser aplicada a este trabalho.

A segunda fase do método tradutivo de Gouadec, a tradução, diz respeito ao trabalho de tradução propriamente dito e é, por sua vez, subdividida em três fases: pré-transferência, transferência e pós-transferência.

A pré-transferência reúne todas as tarefas de preparação da tradução, ou seja análise da tipologia textual e de possíveis problemas que possam condicionar a utilização de ferramentas de apoio à tradução e as diversas etapas de trabalho. Esta fase inclui ainda investigação, pesquisa de textos de referência ou paralelos na língua de partida e de chegada, elaboração, atualização e seleção de glossários, dicionários, bases de dados terminológicas e memórias de tradução, recurso a especialistas da área, seleção das ferramentas tecnológicas de apoio à tradução, preparação do material a traduzir e contacto com o cliente, sempre que necessário, para esclarecimento de dúvidas.

Observam-se semelhanças entre esta etapa apresentada por Gouadec e a abordagem funcionalista de análise ao TP de Nord. Um dos aspetos mais importantes da teoria de Nord é a análise do TP. Nesta análise textual deverão ser encontrados possíveis problemas que possam dificultar a tarefa do tradutor, tendo em conta a tipologia textual, a função principal do texto a traduzir, o público-alvo e a cultura de chegada. Para esta análise, Nord apresenta uma vasta lista de perguntas que o tradutor terá de se colocar quando estiver a fazer essa análise.

Voltando ao método de Gouadec, a fase da transferência é onde a magia acontece, quando se transfere signos linguísticos e culturais de uma língua para a outra. A fase da pós-transferência diz respeito ao controlo de qualidade, tendo em conta os critérios previamente estabelecidos quer a nível linguístico quer a nível da correção técnica. E por último, a fase da pós-tradução, que envolve a formatação e a edição final para entrega.

### **3.2 Revisão**

De acordo com a integração na UE, todos os Estados-membros devem cumprir as normas estabelecidas pela Comunidade. Logo, assim como acontece para a produção e venda de dispositivos médicos, também houve a necessidade de “estabelecer e definir os requisitos para a prestação de serviços de tradução de qualidade” (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa), com a implementação da Norma Europeia de Qualidade para Serviços de Tradução – EN 15038. Esta



norma visa descrever e definir, de uma forma clara, todo o processo de tradução aos prestadores de serviços de tradução e aos seus clientes. Para este projeto apenas nos iremos centrar no processo de revisão e em como este pode ser aplicado por um tradutor freelance contrapondo-o com as empresas de tradução.

Primeiramente, a Norma apresenta uma lista de termos e as respetivas definições. Uma das definições que se encontra é a da revisão. Segundo a Norma, a revisão consiste na

análise de um texto na língua de chegada para determinar a sua adequação ao objetivo [...] esta operação inclui a verificação da ortografia, da gramática, da pontuação, da terminologia, do registo de língua, do estilo, etc. e pode implicar a reestruturação do texto (alinhamento do texto para fazer corresponder gráficos, ilustrações, etc.). Também pode incluir a redução ou o aumento do texto, de acordo com o espaço disponível. (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa)

De seguida, são estabelecidos os conceitos básicos de recursos humanos, recursos técnicos, gestão da qualidade e gestão de projetos. Neste capítulo estão expostas as competências profissionais que os tradutores, os revisores e os revisores técnicos devem ter. Para além das competências do tradutor, que compreendem a competência na tradução, na linguística e textual nas línguas de partida e de chegada, na pesquisa, aquisição e tratamento de informações, a nível cultural e ainda a nível de capacidade de utilização de ferramentas de apoio à tradução, o revisor deve também ter experiência de tradução numa determinada área. Os revisores técnicos, por sua vez, devem ser especialistas numa determinada área, na língua de chegada. Este documento permite estabelecer os limites de cada profissional, embora na realidade as fronteiras não sejam facilmente executáveis, uma vez que um tradutor pode ser revisor e vice-versa, levando à fusão das fronteiras previamente estabelecidas. Conforme a breve introdução da Norma, esta serve não só para os prestadores de serviço de tradução possam usufruir de “um conjunto de procedimentos e requisitos normalizados” (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa) para fazer frente às exigências dos mercado, como também esclarece e orienta o cliente sobre a diversidade de tarefas executadas pelo prestador de serviços de tradução (PST). Acredito que possa ser uma mais-valia para a profissão de tradução, quer a nível da prestação de um serviço com qualidade, quer a nível da “educação” do cliente.

No capítulo quatro é descrito o relacionamento entre o cliente e o PST desde a avaliação da viabilidade de execução do projeto, à apresentação de orçamento, adjudicação do trabalho por parte do cliente à parte final do mesmo, a faturação e o pagamento. Podemos encontrar informações gerais sobre o passo inicial e o contacto com o cliente.

No quinto capítulo, encontram-se detalhados os procedimentos aplicáveis aos serviços de tradução. Aqui podemos encontrar o serviço da revisão, o qual se encontra inserido no subcapítulo do processo de tradução, e que importa discutir para o projeto. A Norma faz a distinção entre revisão linguística e revisão técnica.

A revisão linguística deverá ser efetuada por outra pessoa que não o tradutor e evidentemente que deve ter as devidas competências nas línguas de partida e de chegada.

O revisor deve analisar a tradução para verificar a sua adequação relativamente ao objetivo. Este processo incluirá, segundo as exigências do projeto, a comparação entre os textos de partida e chegada para assegurar a coerência da terminologia, bem como a adequação do registo e estilo. (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa)

Por outro lado, a revisão técnica apenas será efetuada se esta for solicitada inicialmente pelo cliente.

O revisor técnico, com competência na área específica, deve efetuar uma revisão monolíngue para avaliar a adequação da tradução final relativamente ao objetivo acordado (por exemplo, avaliando o registo da tradução e assegurando que o mesmo respeita as convenções da área em questão). (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa)

Do ponto de vista de um tradutor freelance e de um estudante de tradução, a aplicabilidade do subcapítulo referente à revisão torna-se impraticável, uma vez que esta terá de ser efetuada por outra pessoa que não o tradutor. No entanto, embora se torne impraticável não parece de todo ser inviável. O tradutor freelance deverá ter bastante mais competências do que aquelas aplicadas a um tradutor. Este deverá ser capaz de fazer a revisão linguística do seu próprio texto, tendo em conta todas as especificações pré-determinadas inicialmente com o cliente. Para além de que esta situação também se estende à revisão técnica.

Após a análise da Norma Europeia, podemos chegar a duas conclusões. A primeira é que a redação desta norma padronizada tem uma maior aplicabilidade nas empresas de prestação de serviços de tradução, embora se possa adaptar ao serviço prestado por um freelance. A segunda, no meu entender, é que os requisitos apresentados na Norma seguem claramente o processo de tradução proposto por Gouadec e pelo funcionalismo apresentado por Nord.

O próximo capítulo apresenta as ferramentas de apoio à tradução escolhidas para este projeto, de acordo com as circunstâncias e a experiência do tradutor.

## 4. Ferramentas de tradução

Hoje em dia, o tradutor tem a possibilidade de acelerar e melhorar o seu trabalho, pois existem no mercado diversas ferramentas informáticas que o ajudam no processo de tradução, tais como as denominadas *CAT tools*, ou seja as ferramentas de tradução assistida por computador. Muitas dessas ferramentas incluem programas de memórias de tradução, programas de gestão de terminologia, alinhamento de textos paralelos, contagem de palavras, entre outros (Gouadec, 2007, p. 91). Para além de programas específicos para tradutores, existem outras ferramentas informáticas que auxiliam na resolução de problemas, como por exemplo os motores de busca, programas de conversão de texto, programas de tratamento de imagens, e muitos outros. Para o tradutor especializado, o conhecimento e a utilização de uma panóplia de ferramentas poderá trazer um grande benefício ao seu trabalho, no que diz respeito à gestão terminológica, à coerência e à qualidade da sua tradução. Por conseguinte, no presente projeto foi utilizada uma das ferramentas de apoio à tradução existente no mercado, nomeadamente a *MemoQ*, que contribuiu para a celeridade e coerência da tradução.

A escolha desta ferramenta *CAT* em detrimento de outras foi motivada essencialmente por quatro circunstâncias, sendo elas o custo financeiro, a experiência do utilizador, a sua qualidade e produtividade, e a integração de várias outras ferramentas necessárias para realizar um projeto de tradução especializada.

A *MemoQ* é uma *environment tool* desenvolvida pela Kilgray, uma empresa húngara, estabelecida no mercado desde 2004, embora apenas tenha libertado esta ferramenta em 2009. Esta aplicação apresenta um *interface* bastante intuitivo e fácil de usar, que representa uma mais-valia para os novos utilizadores. De acordo com o *blog* da Kilgray<sup>8</sup>, a empresa estabelece protocolos com instituições de Ensino Superior, as quais têm acesso ao *MemoQ* de uma forma gratuita, para fins educacionais. Além disso, a empresa disponibiliza a licença de utilização

<sup>8</sup> REYNOLDS, Peter in *Back to School with memoQ* (<http://kilgray.blogspot.pt/2013/09/back-to-school-with-memoq.html>) consultado em 17 de outubro de 2013.

permanente *translator pro* a estudantes por um preço especial, bastante mais baixo relativamente ao preço de mercado. A licença pode ser instalada em dois terminais e tem um valor de 99,00€ mais IVA. Este programa *MemoQ* não tem limite de utilização, uma vez que se trata de uma licença permanente, além de que possui as ferramentas necessárias para a elaboração de qualquer projeto de tradução, independentemente da sua dimensão.

A utilização da ferramenta *MemoQ* para este projeto foi também determinada pelo facto de, durante o primeiro ano de Mestrado, ter optado por aproveitar a promoção de estudante e adquiri-la com o intuito de poder trabalhar em casa num futuro próximo como profissional. Este facto determinou a minha experiência com o programa, apesar de ter tido a oportunidade de experienciar o SDL Trados nas aulas do primeiro semestre do segundo ano.

Após a escolha do programa a utilizar, a fase seguinte do projeto consistiu na preparação dos textos para traduzir. Os documentos foram facultados em dois formatos: os protocolos de kits enzimáticos em digital e os experimentais em suporte de papel. Em primeiro lugar, teve de se proceder à digitalização dos documentos que se encontravam em papel e guardá-los em extensão PDF. O programa *MemoQ* tem a particularidade de ser capaz de ler em diversas extensões, sendo o PDF uma delas. Embora a importação de PDF seja possível, há que ter em conta os diferentes elementos extratextuais, como por exemplo as imagens e as tabelas, os quais não são reconhecidos no ambiente integrado do *MemoQ*. No entanto, importei os textos em PDF para o programa e procedi à edição manual dos segmentos da língua original, sempre que necessário, ou seja, temos de ter em conta que o *MemoQ* processa o texto de uma forma muito simples. O programa divide o texto em vários segmentos. Cada segmento corresponde, a maior parte das vezes, a uma frase. Esta divisão em segmentos é feita automaticamente, tendo em conta o ponto final e a letra maiúscula que vem a seguir. Contudo, esta deteção por vezes não corre da melhor forma e surgem erros. Logo, é possível fazer a correção manual nos segmentos do TP.

Após estas pequenas correções, procedeu-se à tradução propriamente dita de todos os segmentos, durante a qual foi possível anotar comentários sobre questões pontuais acerca de cada segmento individual. Esta ação permitiu que, ao exportar o texto em documento *Word* bilingue, os comentários pudessem ser lidos e editados pelo revisor/validador.

O passo final na ferramenta *CAT* passou por fazer as alterações sugeridas pelo revisor/validador e posterior exportação do documento em formato *txt* e consequente formatação do TC de acordo com o formato do TP.

## 5. Análise tradutológica

A análise tradutológica dos TP insere-se na segunda fase do método tradutivo de Gouadec, mais especificamente na fase da pré-transferência. Neste ponto, e como referido anteriormente, a análise efetuada aos TP segue a teoria funcionalista de Christiane Nord.

Esta análise encontra-se dividida em três partes – a caracterização do género textual, a macroestrutura e a microestrutura. A caracterização do género textual analisa essencialmente a categoria textual à qual pertencem os textos em estudo. Por um lado, a análise à sua macroestrutura centra-se na estrutura global dos textos, ou seja a parte exterior, e por outro lado a microestrutura está centrada nos códigos linguísticos e estilísticos que se refletem diretamente na coesão e coerência textual.

### 5.1 Caracterização do género textual

Partindo então da teoria funcionalista de Nord e da sua distinção entre o carácter instrumental e documental de uma tradução, podemos afirmar que estamos perante documentos de carácter instrumental. Estes textos caracterizam-se por instruírem e orientarem o leitor no sentido deste efetuar uma série de procedimentos, com o intuito de chegar a um resultado final. Logo, estamos perante textos instrucionais ou diretivos.

Do ponto de vista comunicativo, o texto instrucional tem como função ensinar ou mostrar como fazer algo. De acordo com essa função, encontramos características únicas na sua estrutura. Por exemplo:

→ os verbos são, no geral, **verbos de movimento** que incitam à ação (*diluir, adicionar, neutralizar, misturar*);

- os modos verbais encontram-se no **imperativo** (*dilua, adicione, neutralize, misture, incube*);
- os verbos surgem por vezes acompanhados de advérbios ou locuções adverbiais que expressam o modo como devem ser realizadas determinadas ações (*Centrifugue os frascos de vidro **brevemente** antes de abrir*);
- as ações aparecem estruturadas de forma a atingir um objetivo (***Para preparar uma solução padrão 0,1 mM, adicione 10 µL da solução padrão acetil-CoA 10 mM a 990 µL de água***), ou com um valor temporal (*Misture bem com um agitador horizontal ou com a ajuda de uma pipeta, e incube a reação, **durante 60 minutos**, a 37 °C.*).

Este tipo de texto requer uma linguagem clara e direta, uma vez que qualquer erro na utilização dos materiais e no modo de preparação pode causar problemas na execução do procedimento.

Conforme referido no capítulo 2, os textos em análise encontram-se divididos em dois grupos. Seguidamente cada um dos grupos será analisado quanto à sua macroestrutura e microestrutura e serão expostas algumas das dificuldades surgidas e as estratégias tomadas para a sua resolução.

## 5.2 Protocolos dos kits enzimáticos

O primeiro grupo de TP, escolhidos como objeto de estudo, encontra-se enumerado no capítulo 2, categorizados da seguinte forma:

**TEXTO 1** – Acetyl-Coenzyme A Assay Kit (anexo H)

**Tradução** – Kit enzimático para determinação da acetil-coenzima A (anexo I)

**TEXTO 2** – Asparaginase Activity Assay Kit (anexo J)

**Tradução** – Kit enzimático para determinação da atividade da asparaginase (anexo K)

**TEXTO 3** – HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit (anexo L)

**Tradução** – Kit de quantificação de HDL e LDL/VLDL (anexo M)

**TEXTO 4** – L-Carnitine Assay Kit (anexo N)

**Tradução** – Kit enzimático para determinação da L-Carnitina (anexo O)

São designados de protocolos, tendo em conta a sua finalidade. Estes destinam-se a fornecer instruções, tendo por isso um caráter informativo e objetivo. Acima de tudo trata-se de um folheto informativo, no qual vem explicado qual é o produto, para que serve, qual é a sua composição, como deve ser usado e armazenado, quais os procedimentos a seguir e uma listagem de eventuais problemas que podem surgir e como se podem resolver.

Os protocolos selecionados são de produtos da empresa Sigma-Aldrich. De acordo com a informação no sítio da Sigma-Aldrich, podemos verificar que se trata de uma empresa, sediada nos Estados Unidos da América, líder no mercado nas áreas de Ciências da Vida e de Tecnologia de ponta. Os seus produtos, kits e serviços destinam-se exclusivamente ao uso em investigação, quer em laboratórios, indústrias, hospitais e universidades, entre outros.

Os textos de partida foram selecionados juntamente com o Prof. Jorge Saraiva, coorientador deste projeto, por mera curiosidade científica, uma vez que um dos objetivos do projeto é proporcionar aos alunos do DQ da UA uma leitura de protocolos de kits enzimáticos em português, aquando das suas experiências laboratoriais.

### **5.2.1 Macroestrutura**

A macroestrutura dos TP, conforme referido anteriormente, não segue totalmente as normas estipuladas para os reagentes de diagnóstico *in vitro*, tendo em conta que os textos em estudo têm como finalidade a investigação. No entanto, podemos encontrar semelhanças na macroestrutura dos TP comparativamente à que se encontra legalmente estipulada pela Diretiva da Comissão Europeia e pelo Decreto-Lei português, de acordo com os exemplos expostos no subcapítulo 2.1.

Embora estes textos se assemelhem ao folheto informativo dos produtos para diagnóstico *in vitro*, existem também alguns aspetos que remetem para a macroestrutura típica do artigo científico. Estes aspetos destacam-se, apenas e exclusivamente, devido à disposição gráfica e registo linguístico utilizados. Os TP, conforme já referido, fazem parte do género textual de

instruções, como por exemplo o manual de utilização e o folheto informativo, não sendo portanto considerados artigos científicos. A característica essencial dos artigos científicos centra-se na argumentação, encontrando-se por isso bastante longe dos textos instrucionais.

Os TP encontram-se divididos em duas colunas, com a exceção para o quadro que aparece na última página. De acordo com Coimbra (2005), as características gráficas mais relevantes do texto científico são, entre outras, a mancha gráfica corrida, a qual pode ou não ser dividida em colunas. Outra característica que é destacada por esta autora no seu artigo é a inserção de elementos de expressão não-verbal.

Neste caso concreto, um desses elementos é a utilização de tabelas para apresentar a informação sobre valores de “Reaction Mixes” (misturas de reação), a qual seria difícil de ser expressa apenas através de palavras, uma vez que poderiam ocorrer más interpretações ou a mensagem não passar devidamente. A utilização de parênteses surge de forma recorrente nos TP, com o objetivo de exemplificar e acrescentar informação. Existe ainda outra característica evidente nos textos científicos, a qual diz respeito à ausência de sinais de pontuação indicadores de subjetividade, emotividade ou transcrição de comunicação interpessoal, como são exemplo o ponto de exclamação, de interrogação e as reticências.

Os protocolos de kits enzimáticos têm todos a mesma disposição gráfica. Apenas variam entre si no conteúdo. Todos apresentam, como cabeçalho, o nome da empresa, endereço e possíveis contactos. De seguida, é apresentado o nome do produto, o número de catálogo e a temperatura aconselhável de armazenamento. Para além da divisão em colunas, o protocolo (ficha técnica), encontra-se dividido por títulos e subtítulos graficamente destacados (tipo e tamanho de letra únicos em todo o texto, a negrito quando se trata de título e a sublinhado quando são subtítulos). Os TP, tal como os textos científicos, apresentam uma sequência lógica, clara e bem estruturada, característica dos textos instrucionais que devem proporcionar ao leitor uma série de instruções que lhe permitam executar corretamente, pela devida ordem, uma ação. Os títulos abordados em todos os quatro textos são os seguintes:

- “Product Description”;
- “Components”;
- “Reagents and Equipment Required but Not Provided”;
- “Precautions and Disclaimer”;
- “Preparation Instructions”;
- “Storage/Stability”;



- “Procedure”;
- “Results”;
- “Troubleshooting Guide”.

### 5.2.2 Microestrutura

No que diz respeito à semântica dos textos, podemos verificar que estes apresentam as características próprias deste género textual. Tratando-se de textos instrucionais, com um carácter objetivo e conciso, não dão lugar a subjetividades e a más interpretações. As instruções têm de ser claras, simples e precisas, tendo em conta a finalidade e o público-alvo a que se destinam. Contudo, este facto não invalida a presença de frases longas, nomeadamente na parte em que se descreve o produto.

“It is formed either by the oxidative decarboxylation of pyruvate in mitochondria, by the oxidation of long-chain fatty acids, or by the oxidative degradation of certain amino acids.” (texto 1)

Forma-se na matriz mitocondrial, quer pela descarboxilação oxidativa do piruvato, quer pela oxidação de ácidos gordos de cadeia longa, ou ainda pela degradação de alguns aminoácidos.

Há que referir que os TP contêm frases curtas e objetivas, quando se trata de dar instruções de preparação, como por exemplo:

“Reconstitute in 220 µL of water.” (texto 1)

Dissolva em 220 µL de água.

Numa primeira abordagem, verificamos que os textos são de difícil compreensão para quem não está familiarizado com esta área de especialidade. O vocabulário e a terminologia específica utilizada vão ao encontro do público-alvo da língua de partida, profissionais nesta área da investigação. Parte-se do princípio que estes têm um domínio perfeito da terminologia. No entanto, estes textos são também utilizados por estudantes universitários durante as aulas laboratoriais de química e/ou bioquímica. Embora não tenham ainda um domínio natural da terminologia, as aulas servem de fio condutor para alcançarem um patamar mais elevado. É também por esse motivo que sou da opinião que este género de texto deveria ser traduzido

obrigatoriamente para a língua portuguesa, independentemente do seu público-alvo, tal como acontece hoje com os protocolos dos produtos destinados para o diagnóstico *in vitro*. Torna-se ainda mais difícil para os estudantes assimilarem a terminologia e o vocabulário específicos, tanto mais se a informação se encontrar numa língua que não é a sua.

## SIGLAS

Outra característica deste género textual é a utilização de siglas, acrónimos e abreviaturas. A utilização de formas braquigráficas parte da necessidade prática de abreviar expressões científicas. Nos textos em análise encontramos essencialmente siglas, as quais surgem, numa primeira vez, após a designação completa do termo, entre parêntesis, e posteriormente surge então apenas a sigla correspondente ao termo que se pretende utilizar, como por exemplo:

**“High-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and very-low-density lipoprotein (VLDL) are the lipoproteins responsible for the vast majority of cholesterol transport in the blood. High LDL levels and low HDL levels are strongly associated with increased risk of adverse cardiovascular events.” (texto 3)**

As **lipoproteínas de alta densidade (HDL)**, as **lipoproteínas de baixa densidade (LDL)** e as **lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)** são responsáveis pelo transporte da grande maioria de colesterol no sangue. Os altos níveis de **LDL** e os baixos níveis de **HDL** estão fortemente associados com o aumento de risco de acontecimentos adversos cardiovasculares.

Relativamente à tradução de siglas houve uma preocupação em pesquisar não só a sua correta tradução, mas também o seu contexto. Ou seja, houve uma preocupação em pesquisar se a utilização das siglas se verificava no contexto da área dos TP. Para verificar estas situações foi utilizado o motor de busca *Google*, parametrizado exclusivamente para resultados em PT-PT. Além disso, recorreu-se também ao IATE quando existia dúvida. Por exemplo, a sigla DMSO surgiu a seguir a um componente de produto e não aparecia qualquer expressão científica que informasse do que se tratava, nem anterior nem posteriormente. Após uma breve pesquisa no *Google*, verificou-se o resultado encontrado na base terminológica IATE, onde se pôde confirmar a informação apresentada pelo motor de busca, a qual estava correta. A sigla DMSO utiliza-se de forma igual no par de línguas EN-PT, e significa dimetilsulfóxido.

“Carnitine Substrate Mix, in **DMSO**” (texto 4)

Mistura substrato de carnitina, em **DMSO**

“Warm to room temperature to melt **DMSO** prior to use” (texto 4)

Antes de usar, aqueça até atingir a temperatura ambiente para fundir o **DMSO**.

## SINTAXE

Apesar da linguagem clara e simples utilizada nos textos instrucionais, devemos ter em conta que a tradução do par linguístico inglês-português representa sempre um desafio e este projeto não é exceção. A ordem das palavras numa frase na língua inglesa deve sofrer uma análise mais cuidada quando se trata de traduzir para a língua portuguesa. Nos exemplos seguintes, apresenta-se o caso da necessidade de alteração da localização, na língua portuguesa, da expressão “with asparaginase” (1), pois de outra forma a ideia do tratamento ser com a asparaginase e não com outra enzima poderia ficar perdida na tradução. No exemplo seguinte (2), apresenta-se a alteração do modificador do grupo verbal “briefly”, de acordo com a ordem canónica da frase em português.

(1) “Treatment of certain hematopoietic malignancies such as acute lymphoblastic leukemia (ALL), **with asparaginase** results in depletion of blood levels of asparagine resulting in cell cycle arrest and apoptosis.”

O tratamento **com asparaginase** de certas malignidades hematopoiéticas, tais como a leucemia linfoblástica aguda (LLA), resulta na redução dos níveis de asparagina no sangue, que se traduz na paragem do ciclo celular e na consequente apoptose.

(2) “**Briefly** centrifuge vials before opening.”

Centrifugue os frascos de vidro **brevemente** antes de abrir.

### 5.2.3 Dificuldades e estratégias

Este subcapítulo pretende destacar algumas das dificuldades surgidas durante o processo tradutivo, quer estas sejam de carácter textual, semântico, morfossintático ou lexical, quer digam respeito à tradução propriamente dita da terminologia específica no domínio da bioquímica. Torna-se importante referir desde já que, além dos dicionários bilingues e de gramáticas em ambas as línguas, foram utilizadas outras fontes para validar a utilização de terminologia específica. A escolha dessas fontes partiu do princípio de serem consideradas fidedignas pelo tradutor, baseando a sua seleção em experiências adquiridas ao longo dos dois anos de mestrado. As fontes consultadas são principalmente a Base Terminológica IATE (Inter-Active Terminology for Europe), que consiste numa base de dados interinstitucional da UE através da qual se pode consultar informação fornecida pelas diversas instituições da UE; a Sociedade Portuguesa de Química (SPQ), através dos seus boletins e o Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal (RCAAP), que engloba conteúdos científicos em acesso livre existentes nos repositórios institucionais de algumas entidades nacionais de ensino superior.

Por vezes a utilização destes recursos não foi suficiente, tendo sido necessário consultar outros materiais, tais como o livro “Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos” e o seu equivalente na língua inglesa, o e-book de acesso gratuito, “Compendium of Chemical Terminology Gold Book”. Esta pesquisa mais específica foi estimulada pela necessidade de compreender a formação da nomenclatura de alguns compostos orgânicos, tal como “stereoisomers”.

As dificuldades de tradução serão abordadas independentemente do texto em que se encontram, e não sendo diferenciadas por categorias, uma vez que algumas delas são recorrentes nos quatro textos em estudo. Para cada uma delas foi redigido um pequeno texto, no qual se apresenta o problema e a estratégia utilizada para ultrapassá-lo.

### **Assay**

“Asparaginase activity is determined by a coupled enzyme **assay**, which results in a colorimetric (570 nm)/fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/ \lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$ ) product, proportional to the aspartate generated.” (texto 2)

A atividade da asparaginase é determinada por um **ensaio** conjugado de enzimas, o qual resulta num produto colorimétrico (570 nm)/fluorimétrico ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/ \lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$ ), proporcional à quantidade de aspartato produzido.

Inicialmente, o termo “assay” foi traduzido por “análise”. Contudo, a tradução por “análise” ao longo do texto não era propriamente a mais correta. Em algumas situações o termo escolhido não se adequava ao contexto. Por conseguinte, após uma análise aos conceitos de “análise” e de “ensaio”, verificou-se que o termo adequado seria “ensaio”. No contexto da química, uma **análise** significa determinar a composição química de uma determinada substância. **Ensaio**, por sua vez, expressa um meio utilizado para investigar se uma coisa serve ou não para cumprir um objetivo inicialmente proposto. No caso específico dos protocolos, estamos perante um ensaio que é destinado exclusivamente à investigação. Futuramente, os seus componentes poderão ser utilizados para diagnósticos *in vitro*. Justifica-se assim a escolha deste termo.

### **Acetyl-Coenzyme A Assay Kit**

(texto 1)

- (1) Kit de **análise** para a determinação do Acetil-Coenzima A
- (2) Kit de **ensaio** para a determinação do Acetil-Coenzima A
- (3) Kit enzimático para a determinação do Acetil-Coenzima A

A tradução dos títulos dos protocolos demonstrou ser um desafio bastante interessante. De início, e conforme a explicação do termo anterior, a tradução do termo “assay” foi “análise” (1). No entanto, após uma pesquisa sobre os termos propriamente ditos, verificou-se que a tradução mais correta seria “ensaio” (2). Mas os títulos costumam ser uma breve síntese do que o documento trata, e a tradução por “ensaio” não correspondente exatamente à composição e descrição do kit. Após a revisão e a validação das traduções por profissionais da área das Ciências da Vida, a tradução correta corresponde ao número (3).

### **Fatty acid carbons**

“It is also a key precursor in lipid biosynthesis and the source of all **fatty acid carbons.**” (texto 1)

É também um precursor chave na biossíntese lipídica e a origem de todos **os ácidos gordos carboxílicos.**

O principal problema na tradução desta expressão foi a dificuldade em encontrar a sua equivalência em português através da utilização de dicionários bilingues. Neste género de dicionários podemos encontrar a tradução de “fatty acid”, no entanto a colocação de “carbons” a seguir dificultou um pouco o trabalho. Ao pesquisar o termo “ácido gordo” na enciclopédia da Porto Editora, Infopédia, revi que estes ácidos são carboxílicos, dependendo as suas características da quantidade de carbonos. Embora em pesquisas posteriores através do *Google*, especificadas apenas para sítios em língua portuguesa, não tenha obtido qualquer resultado para a expressão “ácidos gordos carboxílicos”, parece ser esta a melhor tradução.

### **Donor**

“Histone acetylases (HAT) use Acetyl-CoA as the **donor** for the acetyl group used in the post-translational acetylation reactions of histone and non-histone proteins.” (texto 1)

As histona-acetilases (HAT) utilizam a acetil-CoA como **dador** do grupo acetilo, utilizada em reações de acetilação pós-translacional de histonas e de proteínas não-histonas.

A tradução inicial deste termo foi “fonte”, uma vez que, não sendo conhecedora da utilização correta das palavras em todas as áreas do saber, fiquei em dúvida que a tradução poderia ser efetivamente “dador”. No entanto, após a consulta de diversas teses de mestrado de química e bioquímica relativamente à utilização deste termo, verificou-se, efetivamente, que surge sempre o termo dador/dadora quando se trata da doação de átomos ou eletrões nos grupos acetilo.

### **Sonicate**

“Homogenize or **sonicate** thoroughly.” (texto 1)

Homogeneizar ou **sonicar** cuidadosamente.

Embora o termo “sonicar” seja largamente utilizado pela comunidade química portuguesa, o mesmo não se encontra abrangido ainda nos dicionários monolíngues e bilingues

da língua portuguesa. Por conseguinte, não tendo encontrado tradução para a palavra “sonicate” em dicionários bilingues, pesquisei inicialmente a palavra no dicionário monolíngue de língua inglesa *on-line* da Collins para tentar compreender a ação implicada pelo verbo. Literalmente quer dizer “sujeitar a ultrassons”. Pesquisei em dicionários monolíngues de língua portuguesa alguma palavra derivada de “som” que pudesse ter o mesmo significado. Como também não encontrei, passei a pesquisar nos boletins da SPQ. Numa das edições acabei por encontrar um artigo intitulado “Algumas Aplicações Analíticas dos Ultra-sons”. O artigo começa da seguinte forma, que passo a citar:

Alguns dos efeitos químicos produzidos pelos ultra-sons (transformações) são conhecidos desde os primeiros anos do século passado. Apesar disso, os químicos analíticos têm empregado a técnica de sonicação como uma opção para agitação e para auxiliar em processos de extração e/ou lixiviação. Contudo, normalmente há uma forte tendência em abdicar de efeitos peculiares e inerentes à irradiação de soluções com ondas ultra-sônicas de baixa frequência. (MAURO KORN et al, 2005: 51)

Uma vez que os autores lecionam no Brasil, conforme indicado no boletim, o meu principal receio baseava-se na aceitação do termo na língua portuguesa. Para tirar as dúvidas, decidi transformar o nome em verbo e pesquisar no *Google*. O verbo “sonicar” é utilizado em diversas teses de mestrado por todo o país, assim como pela SPQ. Portanto, estamos perante um decalque da forma verbal inglesa “sonicate”. Desta forma se justifica a tradução efetuada.

### **Supernatant**

“Neutralize the **supernatant** with 3 M potassium bicarbonate solution, adding in aliquots of 1  $\mu\text{L}/10 \mu\text{L}$  of **supernatant** while vortexing until bubble evolution ceases (2 – 5 aliquots).” (**texto 1**)  
Neutralize o **sobrenadante** com uma solução de hidrogenocarbonato de potássio 3 M, adicionando em alíquotas de 1  $\mu\text{L}/10 \mu\text{L}$  de **sobrenadante**, enquanto agita num vórtice, até à libertação de bolhas gasosas (2 – 5 alíquotas).

De acordo com a maioria da terminologia específica, nem sempre se encontra a tradução correta rapidamente na língua portuguesa. Este termo foi traduzido inicialmente como “flutuante”, pois não tinha sido pesquisado ainda o seu significado na área das Ciências. Por

consequente, na fase da revisão linguística, antes de entregar a tradução aos validadores do projeto, houve a necessidade de fazer uma breve pesquisa sobre o termo. Após essa investigação, e de acordo com a Base Terminológica IATE, o termo correto na área da química é “sobrenadante”.

## Background

“The **background** for the assays is the value obtained for the 0 (blank) Acetyl-CoA standard”. (texto 1)

A **linha de base** para os ensaios é o valor obtido para o padrão acetil-CoA 0 (branco).

“Correct for the **background** by subtracting the blank standard value from all readings.” (texto 1)

(1) Corrija o **espectro** subtraindo o valor do padrão branco em todas as leituras.

(2) Corrija o **senal base** subtraindo o valor do branco a todas as leituras.

Em todos os TP, o termo “background” foi sempre traduzido por espectro. No entanto, após a revisão dos validadores, tomou-se conhecimento que dependendo do contexto em que a palavra se enquadre, esta pode ter significados diferentes, como se pode verificar nos exemplos em cima.

## Packing slip

“Please see product information on the Sigma-Aldrich website at [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) and/or on the reverse side of the invoice or **packing slip**.”

Ver por favor a informação do produto no sítio da Sigma-Aldrich em [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) e/ou no verso da fatura ou da **guia de remessa**.

Uma das estratégias de solução para este problema consistiu na pesquisa do significado do termo em inglês. Apenas se partia do princípio que se tratava de um documento de transporte. De acordo com o dicionário de negócios da Cambridge em linha, o termo “packing slip”, a par de



“packing list” e “packing note” fazem referência à lista de bens ou produtos colocados numa caixa para serem despachados para um determinado local. O documento equivalente na nossa realidade cultural é a guia ou nota de remessa, ou a guia de transporte ou ainda o manifesto de carga, embora este último seja mais utilizado quando se trata de exportação de bens via aérea ou marítima. Para validar este termo, questionei um especialista na área de exportação que me confirmou tratar-se de uma guia de remessa.

### 5.3 Protocolos experimentais

À semelhança dos protocolos dos kits enzimáticos também estes se encontram categorizados da seguinte forma:

**TEXTO 5** – Experiment no. 2 – Enzymes in laundry detergents (anexo P)

**Tradução** – Protocolo nº 2 – Enzimas em detergentes para a roupa (anexo Q)

**TEXTO 6** – Experiment no. 13 – Continuous immobilized enzyme reactor (anexo R)

**Tradução** – Protocolo nº 13 – Reator contínuo para enzimas imobilizadas (anexo S)

**TEXTO 7** – Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase (anexo T)

**Tradução** – A especificidade do substrato da invertase e da amilase e a inibição da invertase (anexo U)

**TEXTO 8** – Experiment no. 4 – Cellulose Degradation (anexo V)

**Tradução** – Trabalho nº 1 – A degradação da celulose (anexo W)

**Revisão** – Protocolo nº 4 – A degradação da celulose (anexo X)

Tal como os protocolos de kits enzimáticos, também estes são designados de protocolos tendo em conta a sua finalidade. À semelhança dos anteriores, inserem-se no género de texto instrucional, uma vez que servem para informar, guiar e explicar ao seu leitor quais os procedimentos sobre um determinado produto. A principal diferença entre ambos os protocolos é que os primeiros são também utilizados por profissionais na área da investigação científica e tecnológica; os segundos, por sua vez, são utilizados apenas por estudantes (universitários, neste

caso). O público-alvo dos protocolos experimentais é bastante específico, para estes casos, tendo em conta o objetivo experimental, o carácter científico e prático, e a terminologia e linguagem bastante específica. Podemos confirmar o destinatário destes textos através dos próprios textos, uma vez que por diversas vezes é referido o aluno. Vejamos os seguintes exemplos:

“A small piece of fabric soiled by the dyed casein **will be provided to each student.**” (texto 5)

“**Será fornecido a cada aluno** um pequeno pedaço de tecido manchado por caseína tingida com corante azul.”

“Enzyme immobilization should be completed **before the class so that the students may concentrate on** the measurement of enzyme kinetic parameters **during the laboratory period.**”

(texto 6)

“A imobilização enzimática deverá ser terminada **antes da aula, para que os alunos possam concentrar-se na** medição dos parâmetros cinéticos enzimáticos **durante o período de laboratório.**”

Embora os excertos anteriores sejam bastante explícitos, existe uma outra característica nestes TP que nos esclarece sobre o público-alvo. À exceção do texto 7, que é diferente dos outros três protocolos, e sobre o qual falaremos mais à frente, todos eles têm uma secção de questões. As questões estão relacionadas com as experiências descritas, sobre as quais os alunos terão de responder a fim de o professor poder atestar sobre a interiorização dos factos pelos alunos.

Os textos 5, 6 e 8 foram elaborados pelo Professor Nam Sun Wang, Professor Universitário no Departamento de Engenharia Química e Biomolecular, da Universidade de Maryland, nos Estados Unidos da América.

O texto 7, intitulado “Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase”, foi redigido por Diego D. Viteri e Jeff Orlinsky e publicado em outubro de 1999 na revista científica da Escola Secundária de Warren, nos Estados Unidos da América.

Tal como os TP anteriormente analisados, também estes foram escolhidos juntamente com o Professor Jorge Saraiva, com o objetivo de oferecer a oportunidade aos estudantes do DQ da UA de lerem os protocolos experimentais na sua língua materna. Já por si só os protocolos tornam-se difícil de entender na língua portuguesa, quanto mais se for numa língua estrangeira, em que nem todos os alunos universitários se encontram em pé de igualdade.

### 5.3.1 Macroestrutura

A macroestrutura dos protocolos experimentais difere essencialmente na sua mancha gráfica comparativamente aos protocolos de kits enzimáticos. Como já referido anteriormente, existem diferenças entre os textos 5, 6 e 8, elaborados pelo Professor Nam Sun Wang, e o texto 7. Vejamos portanto a macroestrutura dos textos 5, 6 e 8.

Os protocolos experimentais 5, 6 e 8 são textos instrumentais ou instrucionais, ou seja caracterizam-se pela sua utilidade e/ou objetivo, que passa por dar instruções ao leitor sobre como deve ser executado determinado processo.

Conforme Christiane Nord, a finalidade destes textos é fazer crer ao destinatário que está a ler um texto produzido na sua língua e não uma tradução. Para alcançar essa finalidade a macroestrutura e a microestrutura dos TP deverão ser primeiramente analisadas para encontrar possíveis dificuldades que poderão surgir no momento da tradução. Dessa forma, o tradutor pode preparar-se, pesquisando diversas formas para o ajudar posteriormente a ultrapassar essas dificuldades, através de meios informáticos, ferramentas *CAT*, profissionais da área e toda a informação fiável que, nos dias de hoje, se pode obter através da Internet.

Apesar de estarem muito longe de serem incluídos na categoria dos textos científicos, os TP partilham algumas características com esse género textual, nomeadamente na sua grafia, registo linguístico e também no seu conteúdo científico de carácter experimental sobre enzimas.

Os textos apresentam uma mancha gráfica corrida, “interrompida por secções organizadas segundo uma ordem lógica e delimitadas por intratítulos graficamente destacados” (Coimbra, 2005). O texto encontra-se organizado da seguinte forma:

- Título destacado a negrito;
- Identificação do autor e endereço;
- Conteúdos;
- Objetivos;
- Introdução;
- Lista de reagentes e instrumentos;
- Procedimentos;
- Discussões;
- Questões;

## - Referências

Verificamos, à semelhança dos textos científicos, a utilização de elementos de expressão não-verbal, por exemplo tabelas, que apresentam informação sobre valores de taxa de escoamento e tempo de residência, entre outras informações. Também a utilização de parênteses surge abundantemente nos TP, com o intuito de acrescentar informação e esclarecer situações; e de aspas para salientar determinados vocábulos (1). Igualmente se verifica o uso do itálico quando se trata de latinismos, como por exemplo o nome de bactérias (2). Vejamos os seguintes exemplos:

(1) “Simulate a **“warm” (40°C)** and a **“cold” (20°C)** wash cycle by repeating the above experiment at appropriate temperatures. **(Note that all the temperatures can be run simultaneously).**” (texto 5)

Simule um ciclo de lavagem a **«quente» (40 °C)** e outro a **«frio» (20 °C)**, repetindo a experiência acima referida, à temperatura adequada. **(Note que as lavagens a todas as temperaturas podem ser efetuadas em simultâneo).**

(2) “Currently, these enzymes are manufactured commercially in large quantities through fermentation by common soil bacteria ***Bacillus subtilis*** or ***Bacillus licheniformis***.” (texto 5)

Atualmente, estas enzimas são manufaturadas comercialmente em grandes quantidades, por fermentação de bactérias comuns do solo, a ***Bacillus subtilis*** ou a ***Bacillus licheniformis***.

Uma outra característica, com semelhança nos textos científicos, é a ausência de sinais de pontuação indicadores de subjetividade, emotividade ou transcrição de comunicação interpessoal. Essa característica é evidente nestes TP, tendo em conta a ausência de pontos de exclamação, de interrogação e de reticências.

O texto 7 pode ser fácil e enganosamente considerado um artigo científico, uma vez que à primeira vista visualizamos uma formatação gráfica típica deste género textual. Para além da mancha gráfica e do registo linguístico utilizado, damos conta da primeira informação relevante neste texto: a data e o local de publicação. O texto está dividido de uma forma lógica e organizado de forma clara, delimitado por quatro grandes secções: introdução, resultados, discussão e conclusão. Muito antes da introdução, surge o título e a identificação dos autores, seguidos do resumo, das palavras-chave e o significado de abreviaturas que surgem ao longo do

texto. As várias secções estão ainda divididas em outras mais pequenas, intercaladas por imagens e tabelas, as quais ajudam a explicar informações que poderão ser difíceis de transmitir apenas por palavras. De facto, à semelhança de todos os outros TP, estes denotam a ausência de sinais de pontuação indicadores de subjetividade, assim como a utilização de parênteses. Apesar de ter a macroestrutura e microestrutura típicas de um artigo científico, este texto é utilizado pelo Prof. Jorge Saraiva com o mesmo fim dos textos anteriormente referidos: aulas laboratoriais. Este texto é portanto um protocolo experimental, texto instrucional, uma vez o texto expõe os procedimentos que têm de ser seguidos para determinar a especificidade do substrato invertase e da amilase e a inibição da enzima invertase.

### 5.3.2 Microestrutura

Uma particularidade destes quatro TP é a escrita ortográfica em inglês dos EUA, facilmente observável na utilização da letra *z* em vez de *s*, em palavras tais como “hydrolyze”, “catalyzes”, “recognize”, assim como a utilização de outras palavras tais como “colored”, “color”. As principais diferenças entre o inglês americano e o inglês britânico caracterizam-se exatamente pela variação nas terminações de palavras e de verbos. Em inglês americano utiliza-se a terminação –or (color, honor, humor) enquanto no inglês britânico emprega-se a terminação –our (colour, honour, humour). Outro exemplo é a utilização da terminação –ize no inglês americano (organize, realize, recognize), em verbos derivados da terminação grega –izo, enquanto em inglês britânico se utiliza –ise (organise, realise, recognise). Estas são apenas algumas das diferenças entre as duas grafias.

Relativamente à semântica dos quatro textos, verificamos que estes apresentam características próprias dos textos instrucionais. Tendo em conta este género textual, a particularidade mais pertinente é a utilização constante e consistente da forma verbal do imperativo, que reflete a intenção pragmática de dar instruções, como por exemplo:

**“Dissolve** 1 g of household laundry detergent in 200 ml of hot (60°C) water in a 250 ml flask.”  
(texto 5)

**Dissolva** 1 g de detergente para a roupa em 200 mL de água aquecida a 60 °C num balão volumétrico de vidro de 250 mL.

A presença de frases extensas com estrutura interna complexa é também uma característica pertinente nos TP. Por vezes, existe a necessidade de ler uma frase com muita atenção e dividi-la para a melhor compreender como um todo, e de seguida passar à sua tradução, como se pode verificar na seguinte frase.

“Because enzymes are biological catalysts that promote the rate of reactions but are not themselves consumed in the reactions in which they participate, they may be used repeatedly for as long as they remain active.” (texto 6)

As enzimas podem ser usadas repetidamente durante o tempo que se mantiverem ativas, porque são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de reações, mas que não se auto consomem nas reações em que participam.”

No entanto, a presença de frases longas não invalida o uso de frases curtas e objetivas.

“Enzymes are proteins that are specific for particular reactions.” (texto 7)

As enzimas são proteínas específicas para determinadas reações.

Do ponto de vista formal, estamos perante textos de difícil compreensão, pelo menos para quem não está familiarizado com a terminologia e a área de saber. Os autores partem do princípio que o público-alvo é capaz de interpretar o que está escrito. Conforme já referido anteriormente, o público-alvo destes TP são estudantes universitários que, caso não estejam já familiarizados com alguma terminologia mais específica, encontram-se numa boa posição para aprenderem.

## **VOZ PASSIVA**

A nível sintático verificamos a existência de construções passivas, característica inerente dos textos científicos. A utilização da voz passiva “confere ao texto um carácter impessoal e objetivo.” (Coimbra, 2005). No entanto, esta característica necessita de ser analisada de uma forma cuidada quando nos encontramos perante uma tradução do par linguístico inglês-

português. Regra geral, a voz passiva não apresenta problemas na tradução de inglês para português. Contudo, deverão ser tidas em conta as frases com voz passiva que não têm uma tradução direta para o português, pois essas constituem um verdadeiro desafio para o tradutor.

(1) “It **was found** that invertase only hydrolyzed sucrose, while the carbohydrates maltose, lactose, and starch were not hydrolyzed.” (texto 7)

**Descobriu-se** que a invertase apenas hidrolisou a sacarose, enquanto os hidratos de carbono maltose, lactose e amido não foram hidrolisados.”

(2) “**By the reaction** of certain carbohydrates with invertase and amylase, the specificity of those two enzymes **was determined.**” (texto 7)

A especificidade da invertase e da amílase **foi determinada pela reação** de alguns hidratos de carbono com estas duas enzimas.

## SINTAXE

A ordem das palavras na frase na tradução do par linguístico português-inglês representa também um desafio para o tradutor. É necessário fazer uma leitura cuidada do TP para compreender a mensagem e transpor para a língua de chegada de forma ao público-alvo entender o que se está a transmitir. Em todos os TP encontramos frases longas que ao serem traduzidas para a língua portuguesa requerem uma alteração na ordem das frases. Portanto, por diversas vezes foi necessária, por questões estilísticas, a alteração da estrutura frásica.

“Because the commercial detergent is not completely soluble in water, filter the detergent solution before use.” (texto 5)

Filtre a solução de detergente antes de a usar, porque os detergentes comerciais não são totalmente solúveis em água.

## ERROS GRÁFICOS

Nestes protocolos experimentais foram encontrados diversos erros gráficos que na maior parte das vezes não se traduziram num problema para o tradutor, porque foram facilmente resolvidos sem consulta do autor do texto.

“In the second procedure, four test tubes were labeled a, h, c, and d.” (texto 7)

No segundo procedimento, foram etiquetados quatro tubos de ensaio com as letras A, B, C e D.

Nesta frase verificou-se que as letras utilizadas para identificar os tubos não seguiam uma ordem alfabética, uma situação que se estranhou no momento da leitura mais cuidada. No entanto, nas frases seguintes surge a solução para este problema. De facto, os tubos foram etiquetados com as letras A, B, C e D.

“To test tubes a and c 8 drops of sucrose were added, while to tubes b and d 8 drops of starch were added.” (texto 7)

Aos tubos de ensaio A e C foram adicionadas 8 gotas de sacarose, enquanto aos tubos B e D foram adicionadas 8 gotas de amido.

Embora este género de erro possa ser facilmente ultrapassado, surgiu um que requereu muito mais do que uma questão de lógica. Por vezes, os erros gráficos podem comprometer uma tradução, caso os mesmos não sejam discutidos com o autor do texto. Neste projeto não havia uma facilidade de contacto com o autor do texto. No entanto, e tendo em conta que estes protocolos são de facto utilizados e experimentados no DQ da UA, foi o coorientador que serviu de contacto em caso de dúvida.

### **5.3.3 Dificuldades e estratégias**

À semelhança do subcapítulo 5.2.3 *Dificuldades e estratégias* da tradução dos protocolos de kits enzimáticos, este capítulo aborda igualmente as questões que dificultaram o processo de tradução e como foram ultrapassadas.

#### **Laundry detergents**

“Enzymes in **laundry detergents**” (texto 5)



## Enzimas em **detergentes para a roupa**

A primeira dificuldade surge logo no título do texto 5. Inicialmente traduzido por “Enzimas em detergentes de lavar a roupa” verificou-se que a expressão poderia não ser a mais corrente. Através do motor de busca *Google* fiz uma pesquisa (com aspas a delimitar as expressões e apenas sítios em português de Portugal – site:.pt) com o objetivo de entender melhor qual a expressão mais usada em Portugal. As expressões consultadas foram as seguintes:

- “detergente **de** lavar roupa”
- “detergente **para** lavar roupa”
- “detergentes **para** a roupa”

A questão prendeu-se inicialmente com a utilização das preposições **de** e **para**. Logo, após a pesquisa, confirmei que a utilização da preposição **de** surgia apenas em 39 resultados, enquanto a preposição **para** surgia em 351. No entanto, na mesma procura descobri que a expressão “detergentes para a roupa” surgia em 32.800 resultados comparativamente às outras duas expressões. Decidi então que o melhor seria alterar o título para “Enzimas em detergentes para a roupa”, tendo em conta o maior número de vezes que esta surge, assim como a questão desta expressão ter surgido em sítios fidedignos, no meu entender, tais como a Deco Proteste, SKIP, Jerónimo Martins, entre outros.

## **Hydrolyze... in... into**

“To hydrolyze protein-based stains **in** fabrics **into** soluble amino acids” (texto 5)

Hidrolisar a aminoácidos solúveis nódos com origem em proteínas **existentes em** tecidos.

A tradução inicial desta frase tinha sido “Hidrolisar nódos de proteínas em tecidos para aminoácidos solúveis.” Contudo, a frase parecia estar muito colada ao original. Por conseguinte, pesquisei nos dicionários em linha da Porto Editora – Infopédia – o termo hidrólise, que se utiliza da seguinte forma: “**hidrolisar** *um determinado composto e a água, com rotura das moléculas desta em H e OH.*” Com esta nova informação, passei à alteração da frase inicial, acrescentando o adjetivo “existente” ao texto de chegada para que a tripla utilização da preposição **em** não se tornasse tão evidente.

### **Dyed casein**

“A small piece of fabric soiled by the **dyed casein** will be provided to each student” (texto 5)

Será fornecido a cada aluno um pequeno pedaço de tecido manchado por **caseína tingida com corante azul**.

Outra das dificuldades encontradas foi a tradução do termo “dyed casein”. Inicialmente tinha optado por traduzir por “caseína azulada”. Contudo, em pesquisas em textos da área não se encontra informação que nos esclareça sobre a possibilidade da caseína ser colorida ou antes ter uma cor específica. Não tendo encontrado uma solução para a qual tenha ficado satisfeita, solicitei ajuda aos validadores nesta questão. A explicação dos especialistas foi bastante clarificadora. “Dyed casein” significa então caseína tingida com corante azul e é utilizada como substrato para se conseguir visualizar a ação das protéases de uma forma rápida e prática.

### **Bath soap**

“Because detergents, especially **bath soaps**, are generally formulated to degrade mainly oil and grease, protein-based stains have traditionally been among the hardest to remove.” (texto 5)

“As nódoas com base proteica são, tradicionalmente, as mais difíceis de remover, porque os detergentes, especialmente o **sabão**, são em geral formulados para eliminar nódoas de óleos e gorduras.”

A tradução do termo “bath soap” não aportou efetivamente uma dificuldade. Simplesmente torna-se pertinente referir a tradução e a adaptação que o termo sofreu no TC. A tradução deste termo para o português é “sabonetes”. Contudo, na nossa cultura não se utilizam sabonetes para lavar a roupa, mas sim o tradicional sabão azul ou por exemplo o sabão de nome Clarim que é já usado há muitos anos. Por essa razão, houve a necessidade de adaptar este termo para a cultura portuguesa.

### **Water bath**

“The **water bath** can be constructed from a 1000 mL beaker heated on a magnetic stirrer. (texto 6)

Esta frase demonstrou ser uma dificuldade grande de ultrapassar relativamente ao seu sentido, àquilo que o autor queria transmitir. A tradução inicial (1) foi completamente alterada após a revisão pelos validadores, como se pode verificar em (2). Sem a ajuda e a orientação dos especialistas, não teria chegado à tradução correta desta frase em particular, pois não me consegui abstrair do original, resultando numa tradução menos correta. Este é um dos exemplos que demonstram a importância que a revisão linguística e/ou técnica tem no processo tradutivo.

(1) O banho de água pode ser construído a partir de uma proveta de 1.000 mL aquecida num agitador magnético.

(2) Pode ser utilizado um gobelé de 1.000 mL com água aquecida numa placa de agitação magnética, utilizada como banho.

#### **Tube 4 (S drops)**

“Buffer I was added to test **tube 4 (S drops)**, and to test tube 5 (16 drops).” (texto 7)

Foi adicionado tampão I ao tubo de ensaio 4 (8 gotas) e ao tubo de ensaio 5 (16 gotas).

A dificuldade nesta frase foi derivada pelo erro gráfico que existia no original, nomeadamente o S que surge entre parênteses. Logicamente este S deveria ser um número que indicaria à pessoa que está a realizar a experiência quantas gotas deveria colocar no tubo 4. O tradutor não pode correr o risco de tirar conclusões com base apenas no texto, uma vez que não se encontra familiarizado com a experiência em si. A melhor estratégia, sempre que possível, é questionar o autor do texto relativamente a este erro gráfico. Neste caso, tendo em conta que os validadores utilizam o texto para aulas laboratoriais, estão familiarizados com a experiência. Após expor a questão foi-me confirmado que o S é um 8. Porém surgiu uma outra dúvida nesta frase. O que significaria aquele “I” depois da palavra “buffer”? Com a ajuda dos validadores, tentou-se responder a esta questão, a qual nos reportou para o parágrafo dos “Materials and Methods”. Neste parágrafo podemos confirmar que existem dois “buffers” (1 e 11), que leva a entender que o erro gráfico deve estar aqui, e não ser “1” e “11”, mas sim “I” e “II”.

A validação é uma fase importante na tradução, pois os tradutores nem sempre se encontram na melhor posição para corrigir erros gráficos de forma correta.

### **5.3.4 Revisão do texto 8 – Experiment no. 4 – Cellulose degradation**

Um dos objetivos principais deste trabalho passava pela revisão da tradução do texto 8, tradução essa efetuada anteriormente por uma aluna do DLC da UA.

De acordo com a Norma Europeia sobre a tradução, a revisão linguística deve ser efetuada por outra pessoa, que não o tradutor, que evidentemente deve ter as devidas competências nas línguas de partida e de chegada.

O revisor deve analisar a tradução para verificar a sua adequação relativamente ao objetivo. Este processo incluirá, segundo as exigências do projeto, a comparação entre os textos de partida e chegada para assegurar a coerência da terminologia, bem como a adequação do registo e estilo. (prEN 15038:2004 Versão Portuguesa)

Partindo do princípio deste conceito, de seguida irá ser feita a comparação entre o TP e o de chegada, apontando essencialmente as diferenças entre ambos e comentando as possíveis alterações ao TC, na tentativa de assegurar a coerência da terminologia e a adequação do género textual.

Relativamente à macroestrutura do TC visualizamos que a formatação gráfica do TP não foi de forma nenhuma mantida. Além disso, e de carácter ainda mais grave, a inexistência da identificação do autor no TC levanta questões delicadas que passam pelos direitos de autor. Esta é uma das faltas sérias que um tradutor não pode nem deve cometer. O trabalho do tradutor consiste na comunicação de uma mensagem que se encontra numa língua para outra língua. Esta transposição deve ser o mais fiel possível, de acordo com a intenção, o público-alvo e a cultura de chegada. O tradutor é apenas o meio de comunicação entre dois intervenientes. Não tem o direito de omitir informação e alterar a formatação do texto a seu belo prazer (a não ser que isso lhe seja solicitado).

Numa primeira leitura do TC damos conta que o texto não segue as normas do novo acordo ortográfico, provavelmente porque na altura em que foi feita a tradução, a utilização do

novo acordo ainda não era obrigatória. Logo, todo o TC foi novamente redigido de acordo com o novo acordo ortográfico.

No que se refere agora à coerência textual, verificou-se, por exemplo, a utilização dos termos “ponte” e “ligação” de uma forma indiscriminada ao longo do texto, independentemente do contexto ser de facto o mesmo, conforme se pode ver em (1) e em (2). Para além disso, estes dois nomes são sinónimos e a utilização de ambos os termos é verificada na área das Ciências. O termo em inglês é sempre o mesmo - “bond”, no entanto não é traduzido da mesma forma em todo o texto. Propõe-se a correção exemplificada em (3).

(1) “The process of breaking the glucosidic **bonds** that hold the glucose basic units together to form a large cellulose molecule is called *hydrolysis* because a water molecule must be supplied to render each broken **bond** inactive.”

(2) O processo de quebrar as **pontes** glicosídicas que mantêm as unidades básicas da glucose juntas, para formar uma grande molécula de celulose é chamado de hidrólise. Isto devido a que a molécula de água deve ser fornecida para tornar inactiva cada **ligação** quebrada.

(3) O processo de quebra das **ligações** glicosídicas, que mantêm as unidades básicas da glucose juntas de modo a formarem uma molécula de celulose maior, tem o nome de hidrólise, porque é necessário fornecer uma molécula de água para inativar cada **ligação** quebrada.

Ainda relativamente à coerência da terminologia, é aconselhável fazer uma leitura mais cuidada e atenta antes da entrega da tradução. Neste caso, enquanto revia a tradução, dei conta de dois termos exatamente iguais se não fosse a troca de um –i por um –u na expressão “ligação glicosídica”. Primeiramente aparece escrita desta forma e mais à frente no texto aparece “ligação glucosídica”. Após pesquisa no sítio da SPQ confirmou-se que o termo correto é o primeiro. O trabalho do revisor passa por verificar e garantir que situações como estas são detetadas e corrigidas. No entanto, de acordo com Brian Mossop (2007), o tradutor *freelance* tem de ter a capacidade e o cuidado de rever a sua tradução, pois de outra forma teria de contratar uma pessoa para lhe fazer a revisão linguística e/ou a revisão terminológica. Se assim tivesse de acontecer, a ideia de *freelance* perdia-se.

Freelances working directly for clients (not on contract for an agency) obviously need to pay special attention to self-revision since typically no other translator will see the text before delivery to the client.(Mossop, 2007: 116s.)

A nível da sintaxe, temos um exemplo de “colagem” do original relativamente à ordem das palavras na frase. Por exemplo:

“Devido ao facto de cada molécula de celulose ser um polímero não ramificado de 1000 para 1 milhão de unidades de D-glicose, ligadas por pontes glicosídicas  $\beta$ -1,4, a celulose proveniente de várias fontes é igual a nível molecular.”

A ordem canónica na língua portuguesa é a seguinte: a oração subordinante vem primeiro e em segundo lugar vem a oração subordinada. Neste exemplo, a ordem segue a estrutura frásica do original. Logo, propôs-se a seguinte correção:

“A celulose proveniente de diferentes fontes é a mesma a nível molecular, porque cada molécula de celulose é um polímero não ramificado de 1.000 a 1 milhão de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4.”

Para além das alterações acima referidas, foram sugeridas outras que podem ser verificadas na revisão em anexo. Não foram todas descritas no relatório, pois não são consideradas pertinentes para discussão.

## 6. Conclusão

Este projeto consistiu na tradução de protocolos de kits enzimáticos e experimentais e na revisão de um protocolo experimental anteriormente traduzido por uma aluna da UA. Além disso, foi questionada a obrigatoriedade da tradução deste género textual, tendo em conta a legislação portuguesa e europeia que não contempla essa obrigatoriedade no que diz respeito a protocolos de kits enzimáticos destinados exclusivamente à investigação. A tradução, a revisão e a análise tradutológica dos TP, com base em teóricos da tradução, resultaram numa aprendizagem e num conhecimento mais alargado da área de especialização escolhida.

Evidentemente que o projeto tinha dois objetivos que seguiram a par até à conclusão do trabalho – o objetivo proposto pelo aluno, que se prendeu com a tradução e a revisão de protocolos no domínio da bioquímica, e o objetivo proposto pela entidade de ensino superior. Este último consistiu na formação de um tradutor especializado na área da Saúde e Ciências da Vida, que culmina na apresentação de um projeto, no qual se demonstrem as competências adquiridas ao longo dos dois anos de curso, e a capacidade de continuar a sua especialização por meios próprios durante a sua carreira profissional.

A Tradução Especializada requer ao tradutor uma constante atualização na sua área de especialização tendo em conta os dias em que vivemos. O nosso mundo está sempre em evolução, e o tradutor deve ser capaz de fazer o seu trabalho de uma forma rápida e correta, recorrendo a todos os meios que tenha ao seu dispor para o fazer.





## 7. Bibliografia

### Sobre tradução

Comité Europeu de Normalização (2004). *prEN 15038:2004 Norma Europeia de Qualidade para Serviços de Tradução*. Disponível em: [http://www.idiomaglobal.pt/pagina/130/en\\_15038](http://www.idiomaglobal.pt/pagina/130/en_15038)

European Committee for Standardization (2006). *EN 15038:2006 European Quality Standard for Translation Services*. Disponível em: [http://www.idiomaglobal.pt/pagina/130/en\\_15038](http://www.idiomaglobal.pt/pagina/130/en_15038)

Gouadec, Daniel (2007). *Translation as a Profession*. Amsterdam/Philadelphia: John Benjamins Publishing Company. URL: [http://ymerleksi.wikispaces.com/file/view/Translation+as+a+Profession+-+Gouadec,+Daniel+\(John+Benjamins\).pdf](http://ymerleksi.wikispaces.com/file/view/Translation+as+a+Profession+-+Gouadec,+Daniel+(John+Benjamins).pdf)

Mossop, Brian (2007). *Revising and Editing for Translators*. Manchester: St. Jerome Publishing

Nord, Christiane (1997). *Translation as a Purposeful Activity. Functionalist Approaches Explained*. Manchester, Kinderhook: St. Jerome Publishing

### Sobre Ciências da Vida

International Union of Pure and Applied Chemistry (version 2.3.2) (2012). *Compendium of Chemical Terminology Gold Book*. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/>

International Union of Pure and Applied Chemistry Organic Chemistry Division; Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (III.1); Sociedade Portuguesa de Química (2010). *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*. Lisboa: Lidel – edições técnicas, Lda.

Korn, Mauro; Pereira, Madson de Godoi; Borges, Sivanildo da Silva (2005) “Analíticas Dos Ultra-Sons.” *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 96: 51–56. URL: [http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ\\_096\\_051\\_09.pdf](http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_096_051_09.pdf)

## **Outros**

Coimbra, Rosa Lída (2005) *Linguística do Texto e do Discurso*. Universidade de Aveiro. Texto policopiado

## **8. Anexos**



## **ANEXO A**

Decreto-Lei nº 189/2000 de 12 de agosto do Ministério da Saúde



## Decreto-Lei n.º 189/2000, de 12 de Agosto

Transpõe para o ordenamento jurídico interno a Directiva n.º 98/79/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro, que visa harmonizar as disposições nacionais dos Estados membros relativas à concepção, ao fabrico e à colocação no mercado dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*

O Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, estabeleceu o regime de colocação no mercado dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, que constituem uma categoria de dispositivos usados em medicina para o estudo *in vitro* de amostras provenientes do corpo humano e se destinam a avaliar o estado de saúde ou de doença, determinar a segurança e a compatibilidade na transfusão e na transplantação e monitorizar terapêuticas.

Posteriormente, estabelecendo os requisitos essenciais relativos à fiabilidade destes dispositivos e tendo em consideração a sua finalidade e, ainda, a protecção da saúde dos utilizadores e de terceiros, foi adoptada a Directiva n.º 98/79/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro, publicada no Jornal Oficial das Comunidades Europeias, n.º L 331, de 7 de Dezembro de 1998, que harmoniza as disposições nacionais dos Estados membros relativas à concepção, fabrico e colocação no mercado dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, e que o presente diploma transpõe para o ordenamento jurídico interno.

Prevê aquela directiva que, durante um período transitório de cinco anos após a sua entrada em vigor, podem continuar a ser aplicadas as disposições nacionais sobre a matéria. Assim, é mantido em vigor, pelo mesmo período, o Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, introduzindo-se-lhe as alterações indispensáveis à clarificação do procedimento relativo à colocação no mercado de certos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.

Foi ouvido o Instituto Português da Qualidade.

Assim:

Nos termos da alínea a) do n.º 1 do artigo 198.º da Constituição, o Governo decreta o seguinte:

### CAPÍTULO I

#### Introdução

##### Artigo 1.º

##### Objecto

O presente diploma transpõe para o ordenamento jurídico interno a Directiva n.º 98/79/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro, relativa aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, e estabelece as regras a que devem obedecer o fabrico, a comercialização e a entrada em serviço dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* e respectivos acessórios, adiante designados por dispositivos.

##### Artigo 2.º

##### Âmbito

1 - As disposições do presente diploma aplicam-se aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* e respectivos acessórios.

2 - As obrigações decorrentes do presente diploma impostas aos fabricantes aplicam-se igualmente à pessoa singular ou colectiva que monta, acondiciona, executa, renova ou rotula um ou vários produtos pré-fabricados e lhes atribui uma finalidade na qualidade de dispositivos, com vista à sua colocação no mercado em seu próprio nome.

3 - O disposto no número anterior não se aplica a quem, não sendo fabricante na acepção da alínea f) do artigo 3.º, monte ou adapte a um doente específico dispositivos já colocados no mercado com a mesma finalidade.

4 - O presente diploma não se aplica:

- a) Aos produtos para uso laboratorial de carácter geral, a menos que os fabricantes de tais produtos, dadas as suas características, os destinem a exames diagnósticos *in vitro*;
- b) Aos dispositivos fabricados e utilizados ao nível de uma só instituição de saúde e nas respectivas instalações de fabrico, ou utilizados em locais situados na sua proximidade imediata, que não sejam objecto de transferência para outra entidade jurídica e cuja regulamentação será objecto de portaria do Ministro da Saúde;
- c) Aos dispositivos invasivos destinados a colher amostras, assim como aos dispositivos colocados em contacto directo com o corpo humano com a finalidade de obter uma amostra, abrangidos pelo Decreto-Lei n.º 273/95, de 23 de Outubro.

### Artigo 3.º

#### Definições

Para efeitos do presente diploma, entende-se por:

- a) «Dispositivo médico», qualquer instrumento, aparelho, equipamento, material ou outro artigo, utilizado isolada ou conjuntamente, incluindo os suportes lógicos necessários para o seu bom funcionamento, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, e seja destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de diagnóstico, prevenção, monitorização, tratamento ou palição de uma doença, de uma lesão ou deficiência, estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico e controlo da concepção;
- b) «Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*», qualquer dispositivo médico que consista num reagente, produto reagente, calibrador, material de controlo, conjunto, instrumento, aparelho, equipamento ou sistema, utilizado isolada ou conjuntamente, destinado pelo fabricante a ser utilizado *in vitro* para a análise de amostras provenientes do corpo humano, incluindo sangue e tecidos doados, exclusiva ou principalmente com o objectivo de obter dados relativos ao estado fisiológico ou patológico, anomalias congénitas, determinação da segurança e compatibilidade com potenciais receptores, ou ao controlo de medidas terapêuticas, bem como os recipientes de amostras, que suportam ou não o vácuo, especificamente destinados pelo seu fabricante a conter e preservar directamente amostras provenientes do corpo humano com vista a um estudo de diagnóstico *in vitro*;
- c) «Acessório», artigo que, embora não sendo um dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*, seja especificamente destinado pelo seu fabricante a ser utilizado em conjunto com um dispositivo, por forma a permitir a utilização deste de acordo com a sua finalidade;
- d) «Dispositivo para autodiagnóstico», qualquer dispositivo destinado pelo fabricante a poder ser utilizado por leigos no seu domicílio;
- e) «Dispositivo para avaliação do comportamento funcional», qualquer dispositivo destinado pelo fabricante a ser sujeito a um ou mais estudos de avaliação do respectivo comportamento funcional em laboratórios de análises clínicas ou noutros locais adequados exteriores às suas próprias instalações;



- f) «Fabricante», a pessoa singular ou colectiva responsável pela concepção, fabrico, acondicionamento e rotulagem de um dispositivo com vista à sua colocação no mercado sob o seu próprio nome, independentemente de as referidas operações serem efectuadas por essa pessoa ou por terceiros por sua conta;
- g) «Mandatário», pessoa singular ou colectiva estabelecida na Comunidade que, tendo sido expressamente designada pelo fabricante, aja e possa ser contactada pelas autoridades e instâncias na Comunidade em nome do fabricante no que respeita às obrigações deste nos termos do presente diploma;
- h) «Finalidade», a utilização a que o dispositivo se destina, de acordo com as indicações fornecidas pelo fabricante no rótulo, instruções de utilização e publicidade;
- i) «Colocação no mercado», a primeira colocação à disposição, gratuita ou não, de um dispositivo que não se destine à avaliação do comportamento funcional, com vista à sua distribuição ou utilização no mercado comunitário, independentemente de se tratar de um dispositivo novo ou renovado;
- j) «Entrada em serviço», fase em que um dispositivo se encontra à disposição do utilizador final como estando pronto para a primeira utilização no mercado comunitário, em conformidade com a respectiva finalidade;
- k) «Materiais de calibração e de controlo», qualquer tipo de substância, material ou artigo, concebido pelo fabricante para estabelecer relações de medida ou para avaliar o comportamento funcional de um dispositivo relativamente à utilização a que se destina;
- l) «Especificações técnicas comuns», critérios de avaliação e de reavaliação do comportamento funcional, critérios de libertação dos lotes e métodos e materiais de referência.

## CAPÍTULO II

### **Colocação no mercado e entrada em serviço**

#### Artigo 4.º

#### **Requisitos essenciais**

Todos os dispositivos a que se refere o presente diploma devem cumprir os requisitos essenciais, constantes do anexo I do presente diploma e que dele faz parte integrante, que lhes são aplicáveis, atendendo à respectiva finalidade.

#### Artigo 5.º

#### **Colocação no mercado e entrada em serviço**

1 - Só podem ser colocados no mercado e entrar em serviço os dispositivos que satisfaçam os requisitos essenciais estabelecidos no anexo I, quando correctamente entregues e instalados, mantidos e utilizados de acordo com a respectiva finalidade, e que ostentem a marcação «CE», nos termos do artigo 7.º, se esses dispositivos tiverem sido objecto de uma avaliação de conformidade, nos termos do artigo 8.º

2 - Os dispositivos destinados à avaliação do comportamento funcional podem ser colocados à disposição, para esse efeito, em laboratórios ou outras instituições referidas

na declaração apresentada no anexo VIII do presente diploma e que dele faz parte integrante, desde que obedçam às condições fixadas no n.º 2 do artigo 8.º

3 - No âmbito de feiras industriais, exposições e outras demonstrações, é permitida a apresentação de dispositivos, ainda que não obedçam aos requisitos estabelecidos no presente diploma, desde que devidamente assinalada a sua não conformidade, bem como a impossibilidade da sua colocação no mercado e entrada em serviço, antes de se encontrarem em conformidade.

4 - Os dispositivos devem apresentar a rotulagem e as instruções de utilização de acordo com o n.º 8 do anexo I, redigidas em língua portuguesa.

#### Artigo 6.º

##### **Presunção da conformidade**

1 - Presumem-se em conformidade com os requisitos essenciais estabelecidos no anexo I os dispositivos que obedçam ao disposto nas normas nacionais adoptadas de acordo com as normas harmonizadas, cujas referências tenham sido publicadas no Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

2 - A lista das normas nacionais que adoptem normas harmonizadas é aprovada por despacho conjunto dos Ministros da Economia e da Saúde.

3 - Presumem-se ainda em conformidade com os requisitos essenciais referidos no anexo I os dispositivos concebidos e fabricados de acordo com as especificações técnicas comuns elaboradas para os dispositivos constantes da lista A do anexo II do presente diploma e que dele faz parte integrante e, se necessário, da lista B do mesmo anexo.

4 - As especificações técnicas comuns são publicadas no Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

5 - Os fabricantes ficam obrigados a respeitar as especificações técnicas comuns, podendo em alternativa adoptar soluções equivalentes, desde que devidamente justificadas.

6 - Sempre que no presente diploma for feita referência a normas harmonizadas, consideram-se igualmente abrangidas as especificações técnicas comuns.

#### Artigo 7.º

##### **Marcação «CE»**

1 - Os dispositivos, com excepção dos destinados à avaliação do comportamento funcional, que satisfaçam os requisitos essenciais referidos no artigo 4.º devem ostentar a marcação «CE» de conformidade aquando da sua colocação no mercado.

2 - A marcação «CE» de conformidade, que consta do anexo X do presente diploma e que dele faz parte integrante, deve ser aposta de modo visível, legível e indelével no dispositivo, se praticável e adequado, bem como nas instruções de utilização e na embalagem comercial.

3 - A marcação «CE» deve ser acompanhada do número de identificação do organismo notificado responsável pela realização dos procedimentos previstos nos anexos III, IV, VI e VII do presente diploma e que dele fazem parte integrante.

4 - É proibida a aposição de marcas ou inscrições susceptíveis de confusão no que se refere ao significado ou ao grafismo da marcação «CE», sem prejuízo de poder ser

aposta qualquer outra marca no dispositivo, na embalagem ou no folheto de instruções que o acompanha, desde que tal aposição não tenha por efeito reduzir a visibilidade ou a legibilidade da marcação «CE».

5 - Quando a autoridade competente verificar que a marcação «CE» foi indevidamente aposta, o fabricante ou o mandatário é obrigado a fazer cessar de imediato a infracção, nas condições fixadas por aquela autoridade.

6 - Se a não conformidade persistir, a autoridade competente tomará as medidas adequadas para restringir ou proibir a colocação do dispositivo no mercado ou assegurar a sua retirada do mercado, em termos idênticos aos previstos no artigo 16.º

7 - O disposto nos n.ºs 5 e 6 aplica-se igualmente nos casos em que a aposição da marcação «CE» tiver sido efectuada indevidamente, embora de acordo com os procedimentos estabelecidos no presente diploma, mas em produtos por ele não abrangidos.

#### Artigo 8.º

##### **Avaliação da conformidade**

1 - Tendo em vista a aposição da marcação «CE», nos termos do artigo 7.º, com excepção dos dispositivos destinados à avaliação do comportamento funcional, o fabricante deve:

- a) No que respeita aos dispositivos não abrangidos no anexo II, adoptar o procedimento previsto nos n.ºs 2 a 5 do anexo III e elaborar a declaração «CE» de conformidade requerida, antes da colocação dos dispositivos no mercado;
- b) No que respeita aos dispositivos para autodiagnóstico não previstos no anexo II, optar por um dos seguintes procedimentos:
  - i) Cumprimento dos requisitos enumerados nos n.ºs 2 a 6 do anexo III, antes de elaborar a declaração «CE» de conformidade;
  - ii) Procedimento da alínea c);
  - iii) Procedimento da alínea d);
- c) No que respeita aos dispositivos da lista A do anexo II, optar por um dos seguintes procedimentos:
  - i) Procedimento relativo à declaração «CE» de conformidade, previsto no anexo IV - sistema completo de garantia da qualidade;
  - ii) Procedimento relativo ao exame «CE» de tipo, previsto no anexo V do presente diploma e que dele faz parte integrante, em conjunto com o procedimento relativo à declaração «CE» de conformidade, previsto no anexo VII - garantia da qualidade da produção;
- d) No que respeita aos dispositivos da lista B do anexo II, optar por um dos seguintes procedimentos:
  - i) Procedimento relativo à declaração «CE» de conformidade, previsto no anexo IV - sistema completo de garantia da qualidade;
  - ii) Procedimento relativo ao exame «CE» de tipo, previsto no anexo V, em conjunto com o procedimento relativo à verificação «CE», previsto no anexo VI, ou com o procedimento relativo à declaração «CE» de conformidade, previsto no anexo VII - garantia da qualidade da produção.

2 - No que respeita aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional, o fabricante deve seguir o procedimento referido no anexo VIII e elaborar, antes de tais dispositivos estarem disponíveis, a declaração referida no mesmo anexo.

3 - O disposto no número anterior aplica-se sem prejuízo da legislação relativa aos aspectos éticos referentes à utilização de tecidos ou de substâncias de origem humana para a realização de estudos de avaliação do comportamento funcional.

4 - No procedimento de avaliação da conformidade de um dispositivo, o fabricante e, se for caso disso, o organismo notificado devem atender aos resultados das operações de avaliação e verificação que tenham sido realizadas numa fase intermédia do fabrico, em conformidade com o disposto no presente diploma.

5 - O fabricante pode encarregar o seu mandatário estabelecido na Comunidade de aplicar os procedimentos previstos nos anexos III, V, VI e VIII.

6 - O fabricante deve conservar a declaração de conformidade, a documentação técnica referida nos anexos III a VIII, as decisões, os relatórios e os certificados elaborados pelo organismo notificado e colocá-los à disposição da autoridade competente para efeitos de inspecção durante um período de cinco anos após o fabrico do último produto.

7 - Se o fabricante não estiver estabelecido na Comunidade, a obrigação de disponibilizar a documentação referida no número anterior aplica-se ao respectivo mandatário.

8 - Se o procedimento de avaliação da conformidade envolver a intervenção de um organismo notificado, o fabricante, ou o seu mandatário, pode dirigir-se a um organismo da sua escolha que tenha sido reconhecido para o efeito.

9 - Os processos e a correspondência respeitantes aos procedimentos referidos nos números anteriores, quando decorram em Portugal, deverão ser obrigatoriamente redigidos em língua portuguesa, salvo se o organismo notificado aceitar outra língua comunitária.

10 - O organismo notificado pode, sempre que tal se justifique, exigir quaisquer informações ou dados necessários para emitir e prorrogar o certificado de conformidade, tendo em conta o procedimento adoptado.

11 - As autorizações emitidas pelo organismo notificado em conformidade com os anexos III, IV e V têm uma validade máxima de cinco anos e são prorrogáveis por períodos não superiores a cinco anos, mediante pedido apresentado no prazo fixado no contrato assinado por ambas as partes.

12 - A autoridade competente pode, mediante pedido devidamente justificado e sempre que tal utilização contribua para a protecção da saúde, autorizar a colocação no mercado e a entrada em serviço de dispositivos isolados que ainda não tenham sido objecto dos procedimentos de avaliação da conformidade legalmente exigíveis.

13 - O disposto nos números anteriores aplica-se igualmente a qualquer pessoa singular ou colectiva que fabrique dispositivos abrangidos pelo presente diploma e que, sem os colocar no mercado, os ponha em serviço e os utilize no âmbito da sua actividade profissional.

Artigo 9.º  
**Novos produtos**

1 - Para efeitos do presente diploma, considera-se que um dispositivo é um novo produto quando:

- a) No que respeita ao analito ou outro parâmetro relevante, tal dispositivo não tiver estado continuamente disponível no mercado comunitário nos três anos anteriores;
- b) O procedimento envolver tecnologia analítica não utilizada continuamente no mercado comunitário para um dado analito ou outro parâmetro nos três anos anteriores.

2 - Sempre que um dispositivo que ostente a marcação «CE» constitua um novo produto, o fabricante deverá especificar este facto aquando da notificação referida no artigo 10.º

CAPÍTULO III

**Responsáveis pela colocação dos dispositivos no mercado**

Artigo 10.º  
**Fabricante**

1 - Qualquer fabricante com sede em Portugal, que coloque dispositivos no mercado em seu próprio nome, deve notificar a autoridade competente dos seguintes elementos:

- a) Nome ou denominação social e endereço da sede social;
- b) Informações relativas aos reagentes, produtos reagentes e materiais de calibragem e de controlo, em termos de características tecnológicas comuns ou de substâncias a analisar, bem como toda e qualquer alteração significativa que neles seja introduzida, incluindo a suspensão da colocação no mercado;
- c) Informações não compreendidas na alínea anterior, que sejam adequadas ao dispositivo em causa.

2 - No caso dos dispositivos abrangidos pelo anexo II e dos dispositivos para autodiagnóstico, o fabricante deve ainda notificar:

- a) Nome comercial do dispositivo em Portugal e nomes comerciais sob os quais é comercializado na Comunidade Europeia;
- b) Tipo de dispositivo e modelo;
- c) Descrição e destino do dispositivo;
- d) Número de identificação dos organismos notificados intervenientes no procedimento de avaliação de conformidade;
- e) Rotulagem e instruções de utilização certificadas pelo organismo notificado;
- f) Data da colocação no mercado ou entrada em serviço no território nacional;
- g) Nome e endereço da sede social dos distribuidores no território nacional;
- h) Os parâmetros analíticos e, se for o caso, os parâmetros de diagnóstico contemplados no n.º 3 do anexo I;

- i) Os resultados da avaliação do comportamento funcional nos termos do anexo VIII;
- j) Os certificados e quaisquer alterações significativas introduzidas, incluindo a suspensão da colocação no mercado.

3 - Os fabricantes que não disponham de sede em Portugal e coloquem no mercado ou ponham em serviço no território nacional os dispositivos enumerados no anexo II ou os dispositivos para autodiagnóstico devem notificar a autoridade competente dos seguintes elementos:

- a) Nome ou denominação social e endereço da respectiva sede social;
- b) Nome comercial do dispositivo em Portugal e nomes comerciais sob os quais é comercializado nos restantes Estados membros da Comunidade Europeia;
- c) Tipo de dispositivo e modelo;
- d) Descrição e destino do dispositivo;
- e) Número e identificação dos organismos notificados intervenientes no procedimento de avaliação de conformidade;
- f) Rotulagem e instruções de utilização certificadas pelo organismo notificado;
- g) Data da colocação no mercado ou entrada em serviço no território nacional;
- h) Nome e endereço da sede social dos distribuidores em território nacional.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

1 - ...

2 - ...

#### Artigo 11.º **Mandatário**

Caso coloque os dispositivos no mercado em seu próprio nome e não disponha de sede social em nenhum Estado membro, o fabricante deve designar um mandatário estabelecido na Comunidade, que fica sujeito ao cumprimento das obrigações referidas no artigo anterior.

#### Artigo 12.º **Distribuidor**

Os distribuidores de dispositivos que operem no mercado nacional devem comunicar, por escrito, ou fornecer à autoridade competente:

- a) O nome ou denominação social e endereço da respectiva sede;
- b) Uma lista dos produtos que comercializam, com indicação da marca, modelo ou versão;
- c) A documentação técnica necessária à calibração periódica dos dispositivos que comercializam.

## Artigo 13.º

**Organismos notificados**

1 - A autoridade competente designa os organismos nacionais que pretendam realizar os procedimentos estabelecidos no artigo 8.º e atribui as tarefas específicas de cada organismo, comunicando tais actos à Comissão Europeia e aos Estados membros.

2 - Para a designação dos organismos notificados são aplicados os critérios enunciados no anexo IX.

3 - Presumem-se em conformidade com os critérios enunciados no anexo IX os organismos acreditados pelo Instituto Português da Qualidade (IPQ) que satisfaçam os critérios estabelecidos nas normas nacionais que transpõem as normas harmonizadas aplicáveis.

4 - A autoridade competente deve exercer uma fiscalização permanente sobre os organismos notificados de modo a garantir o cumprimento constante dos critérios estabelecidos no anexo IX.

5 - Se a autoridade competente verificar que um organismo deixou de satisfazer os critérios enunciados no anexo IX, deve anular ou restringir a notificação, informando de imediato a Comissão Europeia e os Estados membros.

6 - A designação dos organismos notificados, incluindo o número de identificação que lhes for atribuído pela Comissão Europeia, é objecto de publicação na 2.ª série do Diário da República.

## Artigo 14.º

**Obrigações do organismo notificado**

1 - O organismo notificado e o fabricante ou o mandatário fixarão de comum acordo os prazos para a finalização das operações de avaliação e verificação referidas nos anexos III a VII.

2 - O organismo notificado informará a autoridade competente e os outros organismos notificados de todos os certificados anulados ou restringidos, assim como, mediante pedido, dos certificados emitidos ou recusados e, igualmente, de todos os dados suplementares relevantes.

3 - O organismo notificado poderá, segundo o princípio da proporcionalidade, suspender, retirar ou impor qualquer restrição ao certificado emitido, se verificar que um fabricante não cumpre ou deixou de cumprir os requisitos estabelecidos no presente diploma, ou que o certificado não devesse ter sido emitido, a não ser que o fabricante garanta o cumprimento desses requisitos através da aplicação de medidas correctoras adequadas.

4 - Nos casos referidos no número anterior, o organismo notificado informará a respectiva autoridade competente que, por sua vez, deve informar a Comissão Europeia e os Estados membros.

5 - O organismo notificado fornecerá, a pedido, todas as informações e documentação, incluindo os documentos orçamentais, necessárias para permitir à autoridade competente verificar o cumprimento dos requisitos enunciados no anexo IX.

## CAPÍTULO IV

**Autoridade competente**

## Artigo 15.º

.....  
Revogado pelo Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho. O texto original era o seguinte:

*Autoridade competente e fiscalização*

1 - Para efeitos do presente diploma, é autoridade competente o Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED).

2 - Sem prejuízo das competências legalmente atribuídas a outras entidades, nomeadamente à Inspeção-Geral das Actividades Económicas, a fiscalização do cumprimento das disposições do presente decreto-lei cabe à autoridade competente.

## Artigo 16.º

**Cláusula de salvaguarda**

1 - Sempre que a autoridade competente verificar que os dispositivos referidos no n.º 1 do artigo 5.º, ainda que correctamente instalados, assistidos e utilizados de acordo com a respectiva finalidade, possam comprometer a saúde e a segurança do doente ou de terceiros, adopta todas as medidas provisórias para a sua retirada do mercado e de serviço, comunicando de imediato à Comissão Europeia a decisão, devidamente fundamentada, de que dá também conhecimento ao fabricante ou mandatário.

2 - Para efeitos do disposto no número anterior, entende-se que comprometem a saúde e a segurança do doente ou de terceiros os dispositivos que não estão conformes com o presente diploma, nomeadamente:

- a) Não observem os requisitos essenciais referidos no artigo 4.º;
- b) Não estejam em conformidade com as normas e especificações técnicas referidas no artigo 6.º, quando indicadas pelo fabricante;
- c) Tenham por base normas que comportem lacunas.

## Artigo 17.º

**Sistemas de vigilância**

1 - ...

2 - ...

3 - ...

4 - Nos dois anos subsequentes, no caso dos novos produtos a que se refere o artigo 9.º, a autoridade competente pode, mediante justificação, requerer que o fabricante apresente um relatório sobre a experiência adquirida com o dispositivo, após a sua colocação no mercado, dando informação aos outros Estados membros que o solicitarem.

5 - ...

Revogado pelo Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho, com excepção do n.º 4. O texto original era o seguinte:



1 - Os utilizadores, os fabricantes e outros responsáveis pela colocação no mercado e pela entrada em serviço dos dispositivos devem comunicar à autoridade competente todas as informações relativas a incidentes ocorridos após a respectiva colocação no mercado dos dispositivos abrangidos pelo presente diploma, nomeadamente:

- a) Qualquer disfunção, avaria ou deterioração das características ou do comportamento funcional, bem como qualquer imprecisão na rotulagem ou nas instruções de utilização de um dispositivo, que sejam susceptíveis de causar ou ter causado a morte ou uma deterioração grave do estado de saúde de um doente, utilizador, ou terceiro;
- b) Qualquer motivo de ordem técnica ou médica relacionado com as características ou com o comportamento funcional de um dispositivo que, pelas razões referidas na alínea anterior, tenha conduzido à retirada sistemática do mercado dos dispositivos do mesmo tipo por parte do fabricante.

2 - Sempre que a autoridade competente verifique fundamento nas informações prestadas nos termos do número anterior, deve desencadear os procedimentos adequados à salvaguarda da saúde, nomeadamente de acordo com o artigo 18.º, informando igualmente o fabricante ou o mandatário.

3 - Os incidentes e as medidas adoptadas referidos nos números anteriores devem ser comunicados pela autoridade competente à Comissão Europeia e aos outros Estados membros.

4 - ...

5 - O sistema de vigilância dos dispositivos será objecto de portaria dos Ministros da Economia e da Saúde.

#### Artigo 18.º

#### Sistema de vigilância especial

1 - Sempre que um dispositivo ou um grupo de dispositivos ponham em risco a saúde pública ou a segurança dos utilizadores ou de terceiros, a autoridade competente proíbe ou restringe a sua colocação no mercado ou impõe condições especiais, tomando todas as medidas transitórias necessárias e justificadas para o efeito.

2 - Estas medidas serão comunicadas à Comissão Europeia e aos outros Estados membros, com indicação dos fundamentos da decisão.

### CAPÍTULO V

#### Sanções

#### Artigo 19.º

#### Contra-ordenações

1 - Constituem contra-ordenações:

- a) A colocação no mercado de dispositivos que comprometam a segurança ou a saúde dos doentes, dos utilizadores e de terceiros, punida com coima de €3000 a €44750;
- b) A colocação no mercado de dispositivos que não tenham aposta a marcação «CE», punida com coima de €2000 a €44750;
- c) A utilização indevida da marcação «CE», punida com coima de €2000 a €44750;
- d) A quebra de confidencialidade em relação às informações de natureza técnica dos processos de certificação, punida com coima de €3000 a €44750;
- e) A ausência de instruções de utilização e rotulagem redigidas em língua portuguesa, quando for caso disso, punida com coima de €3000 a €44750;

- f) As infracções ao disposto nos n.ºs 2 e 3 do artigo 5.º, nos n.ºs 4 e 5 do artigo 7.º, nos n.ºs 6 e 7 do artigo 8.º, no n.º 2 do artigo 9.º, nos artigos 10.º, 11.º e 12.º, nos n.ºs 2, 4 e 5 do artigo 14.º e no n.º 1 do artigo 17.º, punidas com coima de €2000 a €44750.

2 - Sendo o infractor pessoa singular, os montantes máximos das coimas previstas no número anterior são reduzidos para €3700.

3 - A tentativa e a negligência são puníveis.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

1 - *Constituem contra-ordenações:*

- a) *A colocação no mercado de dispositivos que comprometam a segurança ou a saúde dos doentes, dos utilizadores e de terceiros, punida com coima de 200000\$00 a 9000000\$00;*
- b) *A colocação no mercado de dispositivos que não tenham aposta a marcação «CE», punida com coima de 150000\$00 a 4500000\$00;*
- c) *A utilização indevida da marcação «CE», punida com coima de 150000\$00 a 7000000\$00;*
- d) *A quebra de confidencialidade em relação às informações de natureza técnica dos processos de certificação, punida com coima de 150000\$00 a 7000000\$00;*
- e) *A ausência de instruções de utilização e rotulagem redigidas em língua portuguesa, quando for caso disso, punida com coima de 100000\$00 a 4500000\$00;*
- f) *As infracções ao disposto nos n.ºs 2 e 3 do artigo 5.º, nos n.ºs 4 e 5 do artigo 7.º, no n.º 2 do artigo 9.º, nos artigos 10.º, 11.º e 12.º e nos n.ºs 2, 4 e 5 do artigo 14.º, punidas com coima de 100000\$00 a 4500000\$00.*

2 - *Sendo o infractor pessoa singular, os montantes máximos das coimas previstas no número anterior são reduzidos para 750000\$00.*

3 - *A tentativa e a negligência são puníveis.*

## Artigo 20.º

### **Procedimento de contra-ordenação e aplicação de coimas**

1 - A instrução dos procedimentos de contra-ordenação cabe ao INFARMED, sem prejuízo da intervenção, no domínio das respectivas atribuições, de outras entidades públicas.

2 - A aplicação das coimas previstas no presente diploma compete ao presidente do órgão executivo do INFARMED.

3 - O produto das coimas aplicadas ao abrigo do disposto no presente capítulo reverte:

- a) Em 10% para a entidade que levanta o auto de notícia;
- b) Em 30% para o INFARMED;
- a) Em 60% para o Estado

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 76/2006, de 27 de Março. O texto original era o seguinte:

#### *Aplicação e destino das coimas*

1 - *Sem prejuízo das competências das autoridades policiais e administrativas, a instrução dos processos contra-ordenacionais, bem como a aplicação das coimas, cabe à autoridade competente, designada no artigo 15.º*

2 - *O produto das coimas reverte:*

- a) *Em 60% para o Estado;*

- b) *Em 10% para a entidade que levantou o auto de notícia;*
- c) *Em 30% para a entidade instrutora do processo.*

### Artigo 21.º

#### **Recursos**

Das decisões tomadas ao abrigo do presente diploma cabe recurso nos termos gerais.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

*Das decisões tomadas ao abrigo do presente diploma cabe recurso contencioso nos termos gerais.*

## CAPÍTULO VI

### **Disposições finais e transitórias**

### Artigo 22.º

#### **Base de dados europeia**

1 - As informações relativas à aplicação do presente decreto-lei são registadas numa base de dados europeia, acessível às autoridades competentes, contendo o seguinte:

- a) Dados relativos ao registo dos fabricantes e dos dispositivos, de acordo com o artigo 10.º;
- b) Dados relativos aos certificados emitidos, modificados, completados, suspensos, retirados ou recusados, de acordo com os procedimentos previstos nos anexos III a VII;
- c) Dados obtidos de acordo com o processo de vigilância definido no artigo 17.º

2 - Enquanto não estiver implementada a base de dados europeia, a notificação das informações previstas no número anterior é efectuada pelo fabricante ou pelo seu mandatário à autoridade competente, aquando da colocação dos produtos no mercado.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

1 - ...

a) ...

b) ...

c) *Dados obtidos de acordo com o processo de vigilância definido no artigo 18.º*

2 - ...

### Artigo 23.º

#### **Confidencialidade**

Sem prejuízo da divulgação das informações necessárias à salvaguarda da saúde pública, todos os intervenientes na execução do presente diploma ficam sujeitos ao dever de sigilo relativamente às informações de que tenham conhecimento no desempenho das suas atribuições.

### Artigo 24.º

#### **Normas éticas**

1 - Para efeitos do presente diploma, a colheita, recolha e utilização de tecidos, células e substâncias de origem humana são regidas, do ponto de vista ético, pelos princípios estabelecidos na Convenção do Conselho da Europa Relativa à Protecção dos Direitos Humanos e da Dignidade do Ser Humano no Que Respeita à Aplicação da Biologia e da Medicina e pelas normas legais e regulamentares nacionais sobre a matéria.

2 - No âmbito do diagnóstico, serão ainda aplicáveis as normas da protecção da confidencialidade dos dados pessoais, das informações relativas à vida privada, bem como o respeito pelo princípio da não discriminação a partir das características genéticas familiares dos homens e das mulheres.

#### Artigo 25.º

##### **Comissão técnica**

1 - Para efeitos do presente diploma, compete à comissão de avaliação dos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, adiante designada por comissão, a emissão de pareceres em matérias relacionadas com dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*.

2 - A composição, competências e funcionamento da comissão são definidos por portaria do Ministro da Saúde.

#### Artigo 26.º

##### **Normas transitórias**

1 - Até 7 de Dezembro de 2003, a colocação no mercado dos dispositivos médicos abrangidos pelo presente diploma continua a ser feita de acordo com o regime jurídico que lhes era aplicável em 7 de Junho de 2000.

2 - Os dispositivos referidos no número anterior podem entrar em serviço até 7 de Dezembro de 2005.

3 - A aplicação do Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, faz-se sem prejuízo do disposto no artigo seguinte.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

*1 - Até 7 de Dezembro de 2003 podem continuar a ser colocados no mercado os dispositivos que obedecem aos requisitos estabelecidos no Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, com as alterações introduzidas no artigo 27.º do presente diploma.*

*2 - Os dispositivos referidos no número anterior podem entrar em serviço até 7 de Dezembro de 2005.*

#### Artigo 27.º

##### **Alterações ao Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro**

Os artigos 3.º, 12.º e 13.º do Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, passam a ter a seguinte redacção:

#### «Artigo 3.º

[...]

1 - ...

2 - Os dispositivos referidos na alínea c) do n.º 2 do artigo anterior são introduzidos no mercado mediante comunicação ao INFARMED.

## Artigo 12.º

[...]

1 - A comunicação ao INFARMED referida no n.º 2 do artigo 3.º deve conter os seguintes elementos:

- a) Uma declaração assinada pelo responsável pela colocação no mercado de que os dispositivos que comercializa não colocam em risco a saúde e segurança dos utilizadores e que se compromete a elaborar documentação técnica relativa ao dispositivo;
- b) Uma ficha de registo, por dispositivo, com menção da informação considerada essencial, nomeadamente nome do responsável pela colocação no mercado, fabricante, distribuidor, país de origem, nome comercial, data de colocação no mercado, apresentação, prazo de validade e composição.

2 - A documentação prevista na alínea a) do número anterior deve conter os elementos estabelecidos no n.º 1 e nas alíneas a) a d), f), g), i) a m), p) e q) do n.º 2 do artigo 4.º, quando aplicáveis.

## Artigo 13.º

[...]

À embalagem, rótulo e folheto informativo dos dispositivos referidos no n.º 2 do artigo 3.º aplica-se o disposto nas alíneas a) a h) do n.º 1 e nos n.ºs 2, 3 e 4 do artigo 5.º e o disposto no n.º 1 e nas alíneas a) a c) do n.º 2 e no n.º 3 do artigo 6.º, com as necessárias adaptações.»

## Artigo 28.º

**Norma revogatória**

O Decreto-Lei n.º 306/97, de 11 de Novembro, cessará a sua vigência a partir de 8 de Dezembro de 2003, sem prejuízo do disposto no n.º 2 do artigo 26.º

## Artigo 29.º

**Entrada em vigor**

O presente diploma entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 29 de Junho de 2000. - *António Manuel de Oliveira Guterres - Joaquim Augusto Nunes Pina Moura - Joaquim Augusto Nunes Pina Moura - Maria Manuela de Brito Arcanjo Marques da Costa.*

Promulgado em 27 de Julho de 2000.

Publique-se.

O Presidente da República, *JORGE SAMPAIO.*

Referendado em 1 de Agosto de 2000.

O Primeiro-Ministro, em exercício, *Jaime José Matos da Gama.*

## ANEXO I

### *Requisitos essenciais*

#### **A - Requisitos gerais**

1 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma que a sua utilização não comprometa, directa ou indirectamente, a situação clínica e a segurança dos doentes, nem a segurança e a saúde dos utilizadores e, eventualmente, de terceiros, nem comprometa a segurança de bens, quando forem utilizados nas condições e para os fins previstos.

1.1 - Os eventuais riscos associados à sua utilização devem ser aceitáveis, quando comparados com o benefício proporcionado aos doentes, e compatíveis com um elevado grau de protecção da saúde e segurança.

2 - As soluções adoptadas pelo fabricante na concepção e construção dos dispositivos devem observar os princípios da segurança, atendendo ao avanço da técnica geralmente reconhecido, e a sua selecção deve respeitar os seguintes princípios, por ordem crescente de importância:

2.1 - Eliminar ou reduzir os riscos ao mínimo possível - concepção e construção intrinsecamente seguras;

2.2 - Quando apropriado, adoptar as medidas de protecção adequadas para os riscos que não podem ser eliminados;

2.3 - Informar os utilizadores dos riscos residuais devidos a eventuais lacunas nas medidas de protecção adoptadas.

3 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a poderem desempenhar uma ou mais das funções previstas no alínea b) do artigo 3.º, de acordo com as especificações do fabricante, tendo em conta o progresso técnico.

3.1 - Os dispositivos devem demonstrar os comportamentos funcionais declarados pelo fabricante, designadamente e, sempre que adequado, em termos de sensibilidade analítica, sensibilidade de diagnóstico, especificidade analítica, especificidade de diagnóstico, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, incluindo o controlo das interferências importantes conhecidas e limites de detecção.

3.2 - A rastreabilidade dos valores atribuídos aos calibradores e aos materiais de controlo deve ser assegurada por intermédio de procedimentos de medição de referência disponíveis e ou materiais de referência disponíveis de grau superior.

4 - As características e os comportamentos funcionais referidos nos n.ºs 1 a 3 não devem ser alterados de modo a comprometer a saúde e a segurança dos doentes ou dos utilizadores e, eventualmente, de terceiros, durante a vida útil dos dispositivos prevista pelo fabricante, quando submetidos a variações que possam ocorrer em condições normais de utilização.

4.1 - Se não for indicada a vida útil, o mesmo se aplica à vida útil que é razoável prever para os dispositivos do mesmo tipo, tendo em conta a sua finalidade e utilização prevista.

5 - Os dispositivos devem ser concebidos, fabricados e acondicionados de modo que as suas características e comportamentos funcionais, em termos da sua finalidade,

não sofram alterações no decurso do armazenamento e do transporte, temperatura, ou humidade, tendo em conta as instruções e informações fornecidas pelo fabricante.

## **B - Requisitos relativos à concepção e ao fabrico**

### **1 - Propriedades químicas e físicas:**

1.1 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a assegurar as características e os comportamentos funcionais referidos na parte A, «Requisitos gerais», tendo em atenção a possível diminuição do comportamento funcional analítico devido à incompatibilidade entre os materiais utilizados e as amostras que sejam utilizadas com os dispositivos, atendendo à sua finalidade, tais como tecidos biológicos, células, fluidos orgânicos e microrganismos.

1.2 - Os dispositivos devem ser concebidos, fabricados e acondicionados por forma a minimizar os riscos apresentados por fugas de produtos, contaminantes e resíduos no que respeita ao pessoal envolvido no transporte, armazenamento e utilização, tendo em conta a finalidade do produto.

### **2 - Infecção e contaminação microbiana:**

2.1 - Os dispositivos e os respectivos processos de fabrico devem ser concebidos por forma a eliminar ou reduzir, tanto quanto possível, o risco de infecção para o utilizador ou para terceiros, permitir a sua fácil manipulação e, se for caso disso, minimizar a contaminação e as fugas do dispositivo, no decurso da utilização, bem como, no que respeita aos receptáculos de amostras, o risco da sua contaminação.

2.2 - Nos dispositivos que incorporem substâncias biológicas deve reduzir-se ao mínimo o risco de infecção, através da selecção de dadores e de substâncias adequadas e da utilização de procedimentos apropriados e validados de inactivação, conservação, ensaio e controlo.

2.3 - Os dispositivos que ostentem a menção «Esterilizado» ou que possuam características microbiológicas especiais devem ser concebidos, fabricados e acondicionados numa embalagem adequada e segundo procedimentos adequados, por forma a garantir a conservação das características microbiológicas indicadas no rótulo, aquando da sua colocação no mercado, e a manterem este estado nas condições previstas de armazenamento e transporte até que seja violada ou aberta a protecção que assegura a esterilidade.

2.4 - Os dispositivos que ostentem a menção «Esterilizado» ou que possuam características microbiológicas especiais devem ter sido fabricados e esterilizados segundo um método apropriado e validado.

2.5 - Os sistemas de embalagem de dispositivos, com excepção dos referidos no n.º 2.3, devem manter o produto intacto e assegurar o grau de higiene especificado pelo fabricante, bem como, caso os dispositivos devam ser esterilizados antes da sua utilização, reduzir o mais possível o risco de contaminação microbiana.

2.5.1 - Devem ser tomadas medidas tendentes a reduzir, na medida do possível, a contaminação microbiana no decurso da selecção e manuseamento das matérias-primas, do fabrico, do armazenamento e da distribuição, caso o comportamento funcional do dispositivo possa ser por ela afectado.

2.6 - Os dispositivos destinados a ser esterilizados devem ser fabricados em condições, nomeadamente de carácter ambiental, adequadas e controladas.

2.7 - Os sistemas de embalagem para dispositivos não esterilizados devem conservar o produto sem deterioração do grau de limpeza previsto e, caso se destinem a ser esterilizados antes da utilização, devem minimizar o risco de contaminação microbiana, bem como adequar-se ao método de esterilização indicado pelo fabricante.

### 3 - Propriedades relativas ao fabrico e ao ambiente:

3.1 - Caso um dispositivo se destine a ser utilizado em conjunto com outros dispositivos ou equipamentos, esse conjunto, incluindo o sistema de ligação, deve ser seguro e não prejudicar os comportamentos funcionais específicos dos dispositivos, devendo qualquer restrição à utilização ser especificada na rotulagem e ou nas instruções de utilização.

3.2 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a reduzir ao mínimo os riscos inerentes à sua utilização em conjunto com os materiais, substâncias e gases com os quais possam entrar em contacto no decurso da sua utilização normal.

3.3 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a suprimir ou minimizar tanto quanto possível:

- a) Os riscos de lesão devidos às suas características físicas, incluindo a relação pressão/volume, e às suas características dimensionais e, eventualmente, ergonómicas;
- b) Os riscos decorrentes de influências externas razoavelmente previsíveis, nomeadamente campos magnéticos, efeitos eléctricos externos, descargas electrostáticas, pressão, humidade, temperatura ou variações de pressão e de aceleração ou penetração não intencional de substâncias no dispositivo.

3.3.1 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma que haja um grau adequado de protecção intrínseca em relação a perturbações electromagnéticas, a fim de que possam funcionar de acordo com os fins a que se destinam.

3.4 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a minimizar os riscos de incêndio ou explosão em condições normais de utilização e em situação de primeira avaria, devendo prestar-se especial atenção aos dispositivos cuja utilização implique a exposição a substâncias inflamáveis ou a substâncias susceptíveis de favorecer a combustão ou associação com tais substâncias.

3.5 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados de forma a facilitar a gestão da eliminação segura de resíduos.

3.6 - As escalas de medição, monitorização e graduação, incluindo as alterações de cor e outras indicações visuais, devem ser concebidas e fabricadas de acordo com princípios ergonómicos que atendam à finalidade dos dispositivos.

### 4 - Dispositivos com funções de medição:

4.1 - Os dispositivos que constituam instrumentos ou aparelhos cuja função primária é a medição analítica devem ser concebidos e fabricados por forma a assegurar uma suficiente constância e exactidão das medições dentro de limites de precisão adequados, atendendo à sua finalidade e à disponibilidade e adequação dos procedimentos e materiais de medição de referência; estes limites de precisão devem ser indicados pelo fabricante.

4.2 - Se os valores forem expressos em números, devem ser apresentados em unidades legais, em conformidade com o disposto no Decreto-Lei n.º 238/94, de 19 de Setembro, relativo às unidades de medida.

### 5 - Protecção contra radiações:

5.1 - Os dispositivos devem ser concebidos, fabricados e acondicionados por forma a reduzir ao mínimo a exposição dos utilizadores e de terceiros à emissão de radiações.

5.2 - Quando os dispositivos se destinam a emitir radiações visíveis e ou invisíveis potencialmente perigosas, devem ser, na medida do possível:

- a) Concebidos e fabricados por forma a assegurar que as suas características e a quantidade de radiações emitidas possam ser controláveis e ou reguláveis;
- b) Dotados com indicadores visuais e ou sonoros de tais emissões.



5.3 - As instruções de utilização dos dispositivos que emitem radiações devem conter informações pormenorizadas sobre a natureza das radiações emitidas, os meios de protecção do utilizador, a maneira de evitar manipulações erróneas e eliminar os riscos inerentes à instalação.

6 - Requisitos relativos aos dispositivos médicos ligados a uma fonte de energia ou com ela equipados:

6.1 - Os dispositivos que integrem sistemas electrónicos programáveis, incluindo suportes lógicos, devem ser concebidos de modo a garantir a repetibilidade, a fiabilidade e o comportamento funcional desses sistemas, de acordo com a respectiva finalidade.

6.2 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a minimizar os riscos decorrentes da criação de interferências electromagnéticas susceptíveis de afectar o funcionamento de outros dispositivos ou equipamentos instalados no ambiente habitual.

6.3 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a evitar, tanto quanto possível, os riscos de choques eléctricos não intencionais em condições normais de utilização e em situação de primeira avaria, desde que os dispositivos estejam correctamente instalados e sujeitos a manutenção.

6.4 - Protecção contra riscos mecânicos e térmicos:

6.4.1 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a proteger o utilizador contra riscos mecânicos, suficientemente estáveis nas condições de funcionamento previstas, adequados para resistir aos esforços inerentes ao ambiente de trabalho previsto e manter essa resistência durante o tempo de vida previsto dos dispositivos sujeitos a quaisquer inspecções e requisitos de manutenção indicados pelo fabricante.

6.4.1.1 - Quando existam riscos devidos à presença de partes móveis, a ruptura ou desprendimento, ou a fuga de substâncias, devem ser incorporados meios de protecção apropriados.

6.4.1.2 - Qualquer protector ou outro meio incluído no dispositivo para adequada protecção, especialmente em relação às partes móveis, deve ser seguro e não interferir com o acesso ao funcionamento normal do dispositivo ou restringir a sua manutenção de rotina, como previsto pelo fabricante.

6.4.2 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a minimizar, na medida do possível, os riscos decorrentes das vibrações por eles produzidas, atendendo ao progresso técnico e aos meios disponíveis para redução das vibrações, especialmente na fonte, excepto no caso de as vibrações fazerem parte do funcionamento previsto.

6.4.3 - Os dispositivos devem ser concebidos e fabricados por forma a minimizar, na medida do possível, os riscos decorrentes do ruído produzido, atendendo ao progresso técnico e aos meios disponíveis para redução do ruído, designadamente na fonte, excepto no caso de as emissões sonoras fazerem parte do funcionamento previsto.

6.4.4 - Os terminais e dispositivos de ligação a fontes de energia eléctrica, hidráulica, pneumática ou gasosa que devam ser manipulados pelo utilizador devem ser concebidos e construídos por forma a minimizar todos os riscos eventuais.

6.4.5 - As partes acessíveis dos dispositivos, excluindo as partes ou zonas destinadas a fornecer calor ou atingir determinadas temperaturas, e o meio circundante não devem atingir temperaturas susceptíveis de constituir perigo em condições normais de utilização.

7 - Requisitos aplicáveis aos dispositivos para autodiagnóstico:

7.1 - Estes dispositivos devem ser concebidos e construídos por forma a terem um comportamento funcional adequado à sua finalidade, tendo em conta as capacidades técnicas e os meios à disposição dos utilizadores, bem como os efeitos das variações previsíveis na técnica e no ambiente dos utilizadores; as informações e instruções fornecidas pelo fabricante devem ser facilmente inteligíveis e aplicáveis pelo utilizador.

7.1.1 - Devem ser concebidos e construídos por forma a:

- a) Garantir que o dispositivo seja de fácil utilização pelo utilizador a que se destina, em todas as fases da manipulação;
- b) Reduzir tanto quanto possível os riscos de os utilizadores cometerem erros na manipulação do dispositivo e na interpretação dos resultados.

7.2 - Os dispositivos para autodiagnóstico devem incluir, na medida do possível, um método de controlo, ou seja, um procedimento que permita ao utilizador certificar-se de que, no momento da utilização, o produto terá o comportamento funcional previsto.

8 - Informações fornecidas pelo fabricante:

8.1 - Cada dispositivo deve ser acompanhado das informações necessárias para a sua correcta utilização em completa segurança e para a identificação do fabricante, tendo em conta a formação e os conhecimentos dos potenciais utilizadores, essas informações devem ser constituídas pelas indicações constantes da rotulagem e das instruções de utilização.

8.1.1 - Sempre que exequível e adequado, as informações necessárias para a utilização correcta e com segurança do dispositivo devem figurar no próprio dispositivo e ou, se for caso disso, na embalagem comercial; se os dispositivos não puderem ser rotulados individualmente, as informações devem constar da embalagem e ou das instruções que acompanhem um ou mais dispositivos.

8.1.2 - As instruções de utilização devem acompanhar ou ser incluídas na embalagem de um ou mais dispositivos.

8.1.3 - Em casos excepcionais e devidamente justificados, as instruções podem ser dispensadas desde que o dispositivo possa ser usado de forma correcta e segura sem elas.

8.1.4 - As instruções de utilização e o rótulo devem, obrigatoriamente, ser redigidos em língua portuguesa.

8.2 - Sempre que adequado, as informações deverão ser apresentadas sob a forma de símbolos, os quais, bem como as respectivas cores de identificação, devem estar em conformidade com as normas harmonizadas.

8.2.1 - Nas áreas em que não existam quaisquer normas, os símbolos e as cores usados devem ser descritos na documentação que acompanha o dispositivo.

8.3 - No caso de dispositivos que contenham substâncias ou preparações susceptíveis de ser perigosas, dadas a natureza e quantidade dos seus componentes e a forma de que se revestem, há que utilizar os símbolos de perigo e aplicar os requisitos de rotulagem previstos nos Decretos-Leis n.ºs 209/99, de 11 de Junho, e 189/99, de 2 de Junho.

8.3.1 - Se não houver espaço suficiente para apor todos estes dados no próprio dispositivo ou no seu rótulo, os símbolos de perigo relevantes devem ser colocados no rótulo e os outros dados requeridos por estes decretos-leis mencionados nas instruções de utilização.

8.3.2 - Aplicar-se-á o disposto nestes diplomas para a ficha de segurança, a menos que todos os dados relevantes adequados constem já das instruções de utilização.

8.4 - O rótulo deve conter as seguintes informações, que, quando adequado, podem ser representadas por símbolos:

- a) O nome ou a designação comercial e o endereço do fabricante; relativamente aos dispositivos importados para serem distribuídos na Comunidade, o rótulo, a embalagem exterior ou as instruções de utilização deverão ainda incluir o nome e o endereço do mandatário do fabricante;
- b) As informações estritamente necessárias para que o utilizador possa identificar, de forma inequívoca, o dispositivo e o conteúdo da embalagem;
- c) Se aplicável, a menção «Esterilizado» ou a indicação de qualquer estado microbiológico ou de higiene especial;
- d) O código do lote, precedido da menção «Lote», ou o número de série;
- e) Se aplicável, a data limite de utilização segura do dispositivo ou dos seus elementos, sem degradação do seu comportamento funcional, expressa pela ordem do ano e mês e, se relevante, do dia;
- f) No que respeita aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional, a menção «unicamente para avaliação do comportamento funcional»;
- g) Se aplicável, a indicação de que se trata de um dispositivo para utilização *in vitro*;
- h) Condições especiais de armazenamento e ou manuseamento;
- i) Se aplicável, instruções particulares de utilização;
- j) Advertências e ou precauções adequadas a adoptar;
- k) No caso de um dispositivo para autodiagnóstico, a menção clara desse facto.

8.5 - Caso a finalidade prevista de um dispositivo não seja evidente para o utilizador, o fabricante deve especificá-la claramente nas instruções e, se adequado, no rótulo.

8.6 - Na medida do possível, os dispositivos e os elementos individualizados devem ser identificados em termos de lotes, por forma a possibilitar a realização de acções destinadas a detectar riscos potenciais ocasionados pelos dispositivos e pelos elementos individualizados.

8.7 - Sempre que aplicável, as instruções de utilização devem conter as seguintes informações:

8.7.1 - As indicações referidas no n.º 8.4, com excepção das constantes nas alíneas d) e e);

8.7.2 - A composição do produto reagente em termos da natureza e quantidade ou concentração do(s) ingrediente(s) activo(s) do(s) reagente(s) ou conjunto(s), bem como, quando aplicável, a indicação de que o dispositivo contém outros ingredientes que influenciem a medição;

8.7.3 - As condições de armazenamento e o prazo de validade após a primeira abertura da embalagem primária, bem como as condições de armazenamento e a estabilidade dos reagentes de trabalho;

8.7.4 - O comportamento funcional referido no n.º 3 da parte A;

8.7.5 - A indicação de qualquer material especial necessário, incluindo as informações necessárias para a sua identificação, com vista a uma utilização adequada;

8.7.6 - O tipo de amostra a utilizar, bem como eventuais condições especiais de recolha, pré-tratamento e, se necessário, armazenamento e instruções relativas à preparação do doente;

8.7.7 - A descrição pormenorizada do procedimento a adoptar aquando da utilização do dispositivo;

8.7.8 - O processo de medição a adoptar no que respeita ao dispositivo, incluindo, se aplicável:

- a) O princípio do método;

- b) As características específicas do comportamento funcional analítico, isto é, sensibilidade, especificidade, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, limites de detecção e intervalo de medição, incluindo as informações necessárias para o controlo das interferências conhecidas pertinentes, as limitações do método e dados sobre a utilização dos processos e materiais de medição de referência aplicados pelo utilizador;
  - c) A descrição de qualquer outro procedimento ou manuseamento necessário antes de o dispositivo poder ser utilizado, tais como reconstituição, incubação, diluição e verificações do instrumento;
  - d) A indicação da eventual necessidade de uma formação específica;
- 8.7.9 - A abordagem matemática com base na qual se efectua o cálculo do resultado analítico;
- 8.7.10 - As medidas a adoptar em caso de alteração do comportamento funcional analítico do dispositivo;
- 8.7.11 - As informações adequadas para o utilizador relativas:
- a) Ao controlo interno da qualidade, incluindo procedimentos específicos de validação;
  - b) À rastreabilidade das calibrações do dispositivo;
- 8.7.12 - Os intervalos de referência para as quantidades a analisar, incluindo uma descrição da população de referência considerada;
- 8.7.13 - Caso um dispositivo deva ser utilizado juntamente com, instalado ou ligado a outros dispositivos ou equipamentos médicos para funcionar de acordo com a finalidade prevista, os pormenores suficientes das suas características, de modo a permitir identificar os dispositivos ou os equipamentos que devem ser utilizados para que se obtenha uma combinação segura e adequada;
- 8.7.14 - Todas as indicações necessárias para verificar se um dispositivo se encontra bem instalado e pode funcionar correctamente e em completa segurança, bem como as informações relativas à natureza e frequência das operações de manutenção e calibração a efectuar, por forma a assegurar permanentemente o bom funcionamento e a segurança dos dispositivos e, ainda, indicações relativas à eliminação segura dos resíduos;
- 8.7.15 - Caso um dispositivo deva ser submetido a um tratamento ou operação adicional antes de ser utilizado, como, por exemplo, esterilização, montagem final, as indicações sobre esse tratamento ou operação;
- 8.7.16 - As instruções necessárias em caso de danificação da embalagem protectora e, se necessário, a indicação dos métodos adequados para se proceder a uma nova esterilização ou descontaminação;
- 8.7.17 - Caso o dispositivo seja reutilizável, informações sobre os processos de reutilização adequados, incluindo a limpeza, desinfecção, acondicionamento e, se for caso disso, o método de esterilização ou descontaminação, bem como quaisquer restrições quanto ao número possível de reutilizações;
- 8.7.18 - As precauções a adoptar no que respeita à exposição, em condições ambientais razoavelmente previsíveis, designadamente, a campos magnéticos, a influências eléctricas externas, a descargas electrostáticas, à pressão ou às variações de pressão, à aceleração e a fontes térmicas de ignição;
- 8.7.19 - As precauções a adoptar caso o dispositivo apresente um risco especial ou anormal no que respeita à sua utilização ou eliminação, incluindo medidas especiais de protecção; se o dispositivo contiver substâncias de origem humana ou animal, deve chamar-se a atenção para o seu potencial de infecção;

8.7.20 - Sempre que adequado, as instruções devem conter as seguintes especificações aplicáveis aos dispositivos para autodiagnóstico:

- a) Os resultados devem ser expressos e apresentados por forma a serem facilmente compreensíveis por um leigo; os dados devem ser acompanhados de conselhos aos utilizadores sobre as medidas a adoptar em caso de resultados positivos, negativos ou duvidosos, bem como de informações sobre a possível ocorrência de resultados falsamente positivos ou negativos;
- b) Poderão ser omitidas informações específicas, desde que as outras informações apresentadas pelo fabricante bastem para que o utilizador saiba como utilizar o dispositivo e compreenda o(s) resultado(s) por ele produzido(s);
- c) As informações fornecidas devem incluir uma menção clara que refira que o utilizador não deve adoptar nenhuma decisão de carácter médico sem primeiro consultar o seu médico;
- d) As informações devem igualmente tornar claro que, quando um dispositivo para autodiagnóstico é utilizado para fins de controlo de uma doença existente, o doente só deve adaptar o tratamento se tiver recebido a formação necessária para o efeito;

8.7.21 - A data de publicação ou da última revisão das instruções de utilização.

## ANEXO II

### Listas dos dispositivos referidos nas alíneas c) e d) do n.º 1 artigo 8.º

Os dispositivos, para efeitos do referido nas alíneas c) e d) do n.º 1 do artigo 8.º, agrupam-se nas seguintes listas:

#### Lista A

1 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para determinação dos seguintes grupos sanguíneos: sistema ABO, Rhesus (C, c, D, E, e), anti-Kell.

2 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para detecção, confirmação e quantificação, em amostras humanas, de marcadores da infecção por HIV (HIV 1 e 2), HTLV I e II, e hepatite B, C e D.

3 - Testes à variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ) para rastreio sanguíneo, diagnóstico e confirmação.

#### Lista B

1 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para determinação dos grupos sanguíneos anti-Duffy e anti-Kidd.

2 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para detecção de anticorpos irregulares antieritrocitários.

3 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para detecção e quantificação, em amostras humanas, das seguintes infecções congénitas: rubéola e toxoplasmose.

4 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para o diagnóstico da doença hereditária fenilcetonúria.

5 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para detecção das seguintes infeções humanas: citomegalovírus e clamídia.

6 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para determinação dos seguintes grupos tecidulares HLA: DR, A e B.

7 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, para detecção do marcador tumoral PSA.

8 - Reagentes e produtos reagentes, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração, bem como o suporte lógico, especificamente destinados à avaliação do risco da trissomia 21.

9 - O seguinte dispositivo para autodiagnóstico, incluindo os respectivos materiais de controlo e de calibração: dispositivo para medição da glucose no sangue.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 185/2012, de 9 de agosto. O texto original era o seguinte:

#### **Lista A**

1 - ...

2 - ...

#### **Lista B**

1 - ...

2 - ...

3 - ...

4 - ...

5 - ...

6 - ...

7 - ...

8 - ...

9 - ...

### **ANEXO III**

#### **Declaração «CE» de conformidade**

1 - A declaração «CE» de conformidade é o procedimento através do qual o fabricante ou o seu mandatário, que cumpre as obrigações previstas nos n.ºs 2 a 5, bem como, no que respeita aos dispositivos para autodiagnóstico, as obrigações previstas no n.º 6, garante e declara que os produtos em questão satisfazem as disposições do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis; o fabricante deve apor a marcação «CE» em conformidade com o disposto no artigo 7.º

2 - O fabricante deve elaborar a documentação técnica mencionada no n.º 3 e assegurar que o processo de fabrico cumpre os princípios de garantia da qualidade previstos no n.º 4.

3 - A documentação técnica deve permitir a avaliação da conformidade do dispositivo com os requisitos do presente decreto-lei e abranger, designadamente:

- a) Uma descrição genérica do produto, incluindo as variantes previstas;
- b) A documentação do sistema de qualidade;
- c) Dados relativos à concepção, incluindo a designação das características dos materiais de base, as características e as limitações em termos de comportamento funcional dos dispositivos, os métodos de fabrico e, no caso dos instrumentos, os diagramas de concepção, os diagramas dos componentes, dos subconjuntos e dos circuitos, entre outros;
- d) No caso dos dispositivos que contêm tecidos de origem humana ou substâncias derivadas de tais tecidos, dados sobre a origem e as condições de recolha desse material;
- e) As descrições e explicações necessárias à compreensão das características, dos diagramas e dos esquemas supracitados e do funcionamento do produto;
- f) Os resultados da análise de riscos, bem como, eventualmente, uma lista das normas referidas no artigo 6.º aplicadas integral ou parcialmente, e a descrição das soluções adoptadas para satisfazer os requisitos essenciais do presente decreto-lei, caso as normas referidas no artigo 6.º não tenham sido inteiramente aplicadas;
- g) No que respeita aos produtos esterilizados ou com um estado microbiológico ou de higiene especial, a descrição dos procedimentos adoptados;
- h) Os resultados dos cálculos de concepção e dos controlos efectuados, entre outros;
- i) Caso um dispositivo deva ser ligado a outro(s) dispositivo(s) para poder funcionar de acordo com a finalidade a que se destina, a comprovação de que ele satisfaz os requisitos essenciais quando combinado com qualquer desses dispositivos que tenha as características especificadas pelo fabricante;
- j) Os relatórios dos ensaios;
- k) Dados adequados sobre a avaliação do comportamento funcional, demonstrando o comportamento funcional reivindicado pelo fabricante, corroborados por um sistema de medição de referência, caso este se encontre disponível, com informações sobre os métodos de referência, os materiais de referência, os valores de referência conhecidos, a exactidão e as unidades de medição utilizadas; estes dados devem provir de estudos clínicos ou outros adequados ou resultar de referências bibliográficas pertinentes;
- l) O rótulo e as instruções de utilização;
- m) Os resultados dos estudos de estabilidade.

4 - O fabricante deve adoptar as medidas necessárias para assegurar que o processo de fabrico cumpre os princípios de garantia da qualidade adequados aos dispositivos fabricados. O sistema deve abranger:

- a) A estrutura organizativa e as responsabilidades;
- b) Os processos de fabrico e o controlo sistemático da qualidade da produção;
- c) Os meios de monitorização do comportamento funcional do sistema de qualidade.

5 - O fabricante deverá criar e manter actualizado um processo de análise sistemática da experiência adquirida com os dispositivos na fase pós-produção e desenvolver meios adequados de execução das acções correctivas necessárias, tendo em conta a natureza e os riscos relacionados com o dispositivo; deve igualmente notificar as autoridades competentes dos incidentes a seguir referidos, logo que deles tenha conhecimento:

- a) Qualquer disfunção, avaria ou deterioração das características e ou do comportamento funcional de um dispositivo, bem como qualquer inadequação na rotulagem ou nas instruções respeitantes a um dispositivo que, directa ou indirectamente, sejam susceptíveis de causar ou ter causado a morte ou a degradação grave do estado de saúde de um doente ou utilizador ou de qualquer outra pessoa;
- b) Qualquer motivo de ordem técnica ou médica relacionado com as características ou com o comportamento funcional de um dispositivo e que, pelas razões referidas na alínea anterior, tenha levado o fabricante à retirada sistemática do mercado dos dispositivos do mesmo tipo.

6 - No que respeita aos dispositivos para autodiagnóstico, o fabricante deve apresentar um requerimento com vista à análise da concepção junto de um organismo notificado.

6.1 - O requerimento deve possibilitar a compreensão da concepção do dispositivo, bem como a avaliação da conformidade com os requisitos relativos à concepção previstos no presente decreto-lei; o requerimento deve incluir:

- a) Relatórios de ensaio, incluindo, se aplicável, os resultados de estudos efectuados com leigos;
- b) Dados que comprovem a adequação do dispositivo à sua finalidade em termos de autodiagnóstico;
- c) Dados fornecidos no rótulo e instruções de utilização do dispositivo.

6.2 - O organismo notificado deve analisar o requerimento e, se a concepção estiver em conformidade com as disposições aplicáveis do presente decreto-lei, conceder ao requerente um certificado de exame «CE» de concepção.

O organismo notificado pode exigir que o requerimento seja completado pela execução de novos ensaios ou provas que permitam avaliar a conformidade com os requisitos relativos à concepção, constantes do presente decreto-lei. O certificado deve especificar as conclusões da análise, as condições de validade, os dados necessários para a identificação adequada da concepção aprovada e, se adequado, a descrição da finalidade do produto.

6.3 - O requerente deve comunicar ao organismo notificado que emitiu o certificado de exame «CE» de concepção quaisquer alterações significativas por si introduzidas na concepção aprovada, as quais devem ser aprovadas por aquele organismo, sempre que possam afectar a conformidade com os requisitos essenciais previstos no presente decreto-lei ou com as condições impostas para a utilização do produto; esta nova aprovação será apresentada sob a forma de suplemento ao certificado de exame «CE» de concepção.

## ANEXO IV

### Declaração «CE» de conformidade

(Sistema completo de garantia da qualidade)

1 - O fabricante deverá certificar-se de que é aplicado o sistema de qualidade aprovado para a concepção, o fabrico e o controlo final dos dispositivos em questão, tal como especificado nos n.ºs 3 a 6, ficando sujeito à verificação prevista no n.º 5 e à fiscalização «CE» prevista no n.º 8; o fabricante deve seguir os procedimentos estabelecidos nos n.ºs 7 e 9 para os dispositivos abrangidos pela lista A do anexo II.



2 - A declaração de conformidade é o procedimento através do qual o fabricante, que satisfaz as condições indicadas no n.º 1, garante e declara que os dispositivos em questão satisfazem as disposições do presente decreto-lei que lhe são aplicáveis.

2.1 - O fabricante deve apor a marcação «CE» nos termos do artigo 7.º, elaborar e conservar uma declaração de conformidade que abrangerá os dispositivos fabricados.

3 - Avaliação do sistema de qualidade:

3.1 - O fabricante deve apresentar a um organismo notificado um pedido de avaliação do seu sistema de qualidade, que deve incluir:

- a) O nome e o endereço do fabricante e de quaisquer outros locais de fabrico abrangidos pelo sistema de qualidade;
- b) Todas as informações relativas aos dispositivos ou à categoria de dispositivos a que o procedimento se aplica;
- c) Uma declaração escrita indicando não ter sido apresentado a nenhum outro organismo notificado um requerimento equivalente relativo ao mesmo sistema de qualidade;
- d) A documentação referente ao sistema de qualidade;
- e) O seu compromisso de cumprir as obrigações decorrentes do sistema de qualidade aprovado;
- f) O seu compromisso de manter adequado e eficaz o sistema de qualidade aprovado;
- g) O seu compromisso de criar e manter actualizado um processo de análise sistemática da experiência adquirida com os dispositivos na fase pós-produção e de desenvolver meios adequados de execução de todas as acções correctivas e das necessárias notificações, como referido no n.º 5 do anexo III.

3.2 - A aplicação do sistema de qualidade deve garantir a conformidade dos dispositivos com as disposições do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis em todas as fases, desde a concepção até à inspecção final.

3.2.1 - Todos os elementos, requisitos e disposições adoptados pelo fabricante relativamente ao seu sistema de qualidade devem constar de documentação organizada de modo sistemático e ordenado, sob a forma de orientações e procedimentos escritos, como, por exemplo, programas, planos, manuais e registos de qualidade; esta documentação deve incluir, em especial, uma descrição adequada:

3.2.1.1 - Dos objectivos de qualidade do fabricante;

3.2.1.2 - Da organização da empresa e, nomeadamente:

- a) Das estruturas organizativas, das responsabilidades dos quadros e da sua competência organizativa em matéria da qualidade da concepção e do fabrico dos dispositivos;
- b) Dos métodos que permitem controlar o funcionamento eficaz do sistema de qualidade e, designadamente, a sua capacidade para atingir a qualidade requerida no que se refere à concepção e aos produtos, incluindo o controlo dos dispositivos não conformes;

3.2.1.3 - Dos procedimentos para controlar e verificar a concepção dos dispositivos e, nomeadamente:

- a) Uma descrição geral do dispositivo, incluindo as variantes previstas;
- b) Toda a documentação referida nas alíneas c) a m) do n.º 3 do anexo III;
- c) No que respeita aos dispositivos para autodiagnóstico os dados referidos no n.º 6.1 do anexo III;
- d) As técnicas de controlo e verificação da concepção e dos procedimentos e as medidas que serão sistematicamente utilizadas na concepção dos dispositivos;

3.2.1.4 - Das técnicas de controlo e de garantia da qualidade a nível do fabrico e, nomeadamente:

- a) Os processos e procedimentos que serão utilizados, designadamente, em matéria de esterilização;
- b) Os procedimentos relacionados com as aquisições;
- c) Os procedimentos de identificação do produto, elaborados e actualizados a partir de desenhos, especificações ou outros documentos relevantes durante todas as fases do fabrico;

3.2.1.5 - Dos exames e dos ensaios apropriados que serão efectuados antes, durante e após o fabrico, da frequência com que os mesmos serão realizados e dos equipamentos de ensaio utilizados; deve ser assegurada de forma apropriada a rastreabilidade da calibração dos equipamentos de ensaio.

3.2.2 - O fabricante efectuará os controlos e ensaios necessários, de acordo com os últimos progressos da técnica; esses controlos e ensaios incidirão tanto sobre o processo de fabrico, incluindo a caracterização da matéria-prima, como sobre cada um dos produtos ou dos lotes fabricados.

3.2.2.1 - Para os dispositivos referidos na lista A do anexo II, o fabricante terá em conta os conhecimentos mais recentes, nomeadamente em matéria de complexidade e variabilidade biológica das amostras a ensaiar com o dispositivo de diagnóstico *in vitro*.

3.3 - O organismo notificado procederá a uma verificação do sistema de qualidade para determinar se o mesmo satisfaz os requisitos referidos no n.º 3.2 e presumirá o cumprimento desses requisitos, caso o sistema de qualidade aplique as normas harmonizadas pertinentes.

3.3.1 - A equipa auditora encarregada da avaliação deve ter experiência de avaliação da tecnologia em causa; o procedimento de avaliação deve incluir uma visita às instalações do fabricante e, em casos devidamente justificados, às instalações dos fornecedores e ou subcontratantes do fabricante, a fim de controlar os processos de fabrico.

3.3.2 - A decisão, contendo as conclusões da inspecção e uma avaliação fundamentada, deve ser notificada ao fabricante.

3.4 - O fabricante deve informar o organismo notificado que tiver aprovado o sistema de qualidade de qualquer projecto de alterações significativas do mesmo ou da gama de produtos abrangidos.

3.4.1 - O organismo notificado deve avaliar as alterações propostas e verificar se o sistema de qualidade assim alterado satisfaz, ainda, os requisitos referidos no n.º 3.2.1; deve comunicar ao fabricante a sua decisão, contendo as conclusões da inspecção e uma avaliação fundamentada.

4 - Exame da concepção do produto:

4.1 - No que se refere aos dispositivos abrangidos pela lista A do anexo II, para além das obrigações que lhe incumbem por força da aplicação do sistema de qualidade referido nos números anteriores, o fabricante deve apresentar ao organismo notificado um pedido de exame do dossier de concepção relativo ao dispositivo a fabricar, nos termos do n.º 3.2.1.3.

4.2 - O pedido deve descrever a concepção, o fabrico e o comportamento funcional do dispositivo em questão, incluindo os elementos necessários à avaliação da sua conformidade com os requisitos do presente decreto-lei, tal como referido no n.º 3.2.3.

4.3 - O organismo notificado deve examinar o pedido e, caso o produto esteja conforme com as disposições aplicáveis do presente decreto-lei, emite um certificado de exame «CE» de concepção.

4.3.1 - O organismo notificado pode exigir que o pedido seja completado por ensaios ou provas suplementares que permitam avaliar a conformidade com os requisitos do presente decreto-lei.

4.3.2 - O certificado deve conter as conclusões do exame, as condições da sua validade, os dados necessários à identificação da concepção aprovada e, se for caso disso, uma descrição da finalidade do dispositivo.

4.4 - As alterações introduzidas na concepção aprovada devem receber uma aprovação complementar por parte do organismo notificado que tiver emitido o certificado de exame «CE» de concepção, sempre que essas alterações possam afectar a conformidade com os requisitos essenciais do presente decreto-lei ou com as condições definidas para a utilização do dispositivo; o requerente deve informar o organismo notificado que tiver emitido o certificado de exame «CE» de concepção de qualquer alteração introduzida na concepção aprovada.

4.4.1 - A aprovação complementar deve ser dada sob a forma de um aditamento ao certificado de exame «CE» de concepção.

4.5 - O fabricante informará imediatamente o organismo notificado de quaisquer alterações do agente patogénico e dos marcadores de infecção a testar de que tenha conhecimento, resultantes, nomeadamente, da sua complexidade ou variabilidade biológica; neste contexto, o fabricante comunicará igualmente ao organismo notificado se essas alterações podem vir a ter efeitos no comportamento funcional do dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.

#### 5 - Fiscalização:

5.1 - O objectivo da fiscalização consiste em assegurar que o fabricante cumpre correctamente as obrigações decorrentes do sistema de qualidade aprovado.

5.2 - O fabricante deve autorizar o organismo notificado a efectuar todas as inspecções necessárias e fornecer-lhe todas as informações adequadas, em especial:

- a) A documentação relativa ao sistema de qualidade;
- b) Os dados referentes ao sistema de qualidade relativo à concepção, tais como os resultados de análises, cálculos, ensaios, entre outros;
- c) Os dados referentes ao sistema de qualidade relativos ao fabrico, tais como relatórios de inspecção e dados de ensaio, dados de calibração, relatórios de qualificação do pessoal envolvido, entre outros.

5.3 - O organismo notificado deve proceder periodicamente às inspecções e avaliações adequadas, a fim de se assegurar de que o fabricante aplica o sistema de qualidade aprovado, devendo entregar-lhe um relatório de avaliação.

5.4 - Além das inspecções periódicas, o organismo notificado pode efectuar visitas inesperadas ao fabricante, durante as quais, se necessário, pode efectuar, ou mandar efectuar, ensaios de verificação do bom funcionamento do sistema de qualidade, devendo entregar ao fabricante um relatório da inspecção e um relatório dos ensaios efectuados, caso se tenham realizado.

#### 6 - Verificação dos dispositivos referidos na lista A do anexo II:

6.1 - No que respeita a estes dispositivos, o fabricante transmitirá ao organismo notificado, imediatamente após a conclusão dos controlos ou ensaios, os protocolos dos controlos efectuados nos dispositivos ou em cada um dos lotes fabricados; além disso, deverá disponibilizar ao organismo notificado as amostras dos dispositivos fabricados ou dos lotes, de acordo com condições e modalidades previamente acordadas.

6.2 - O fabricante pode colocar os dispositivos no mercado, a menos que, dentro de um prazo acordado, não superior a 30 dias a contar da data de recepção das amostras, o organismo notificado lhe comunique qualquer decisão em contrário, incluindo, em especial, quaisquer condições de validade dos certificados emitidos.

## ANEXO V

### Exame «CE» de tipo

1 - O exame «CE» de tipo é um componente do procedimento através do qual o organismo notificado verifica e certifica que uma amostra representativa da produção prevista satisfaz os requisitos estabelecidos nas disposições do presente decreto-lei que lhe são aplicáveis.

2 - O pedido de exame «CE» de tipo deve ser apresentado ao organismo notificado pelo fabricante ou pelo seu mandatário estabelecido na Comunidade e deve incluir:

- a) O nome e endereço do fabricante e, se o pedido for apresentado pelo seu mandatário, o nome e endereço deste último;
- b) A documentação referida no n.º 3, necessária para a avaliação da conformidade da amostra representativa da produção prevista, a seguir denominada «tipo», com os requisitos previstos no presente decreto-lei; o requerente deve colocar um tipo à disposição do organismo notificado, que pode solicitar o número de amostras que considerar necessário;
- c) Uma declaração escrita afirmando que não foi apresentado nenhum pedido relativo ao mesmo tipo a outro organismo notificado.

3 - A documentação deve permitir compreender a concepção, o fabrico e o comportamento funcional do dispositivo e conter, designadamente, os seguintes elementos:

- a) Uma descrição geral do tipo, incluindo as variantes previstas;
- b) Toda a documentação referida no n.º 3 do anexo III;
- c) No que respeita aos dispositivos para autodiagnóstico, as informações referidas no n.º 6.1 do anexo III.

4 - O organismo notificado deve:

4.1 - Examinar e avaliar a documentação e verificar se o tipo foi fabricado em conformidade com a mesma, bem como registar os elementos que tenham sido concebidos de acordo com as disposições aplicáveis nas normas referidas no artigo 6.º, e ainda os elementos cuja concepção não se baseie nas disposições relevantes das referidas normas;

4.2 - Efectuar ou mandar efectuar os controlos adequados e os ensaios necessários para verificar se as soluções adoptadas pelo fabricante satisfazem os requisitos essenciais do presente decreto-lei, nos casos em que as normas previstas no artigo 6.º não tenham sido aplicadas;

4.2.1 - Caso um dispositivo tenha de ser ligado a outro(s) para poder funcionar de acordo com a respectiva finalidade, deve verificar a conformidade daquele, face aos requisitos essenciais aplicáveis, com as características especificadas pelo fabricante, quando ligado a dispositivos do tipo em questão;

4.3 - Efectuar ou mandar efectuar os controlos adequados e os ensaios necessários para verificar se as normas relevantes foram efectivamente aplicadas nos casos em que o fabricante opte pela sua aplicação;

4.4 - Acordar com o requerente qual o local em que serão realizadas as inspecções e os ensaios necessários.

5 - Se o tipo satisfizer as disposições do presente decreto-lei, o organismo notificado passará ao requerente o certificado de exame «CE» de tipo, que conterá o

nome e o endereço do fabricante, as conclusões da inspecção, as condições de validade e os dados necessários para a identificação do tipo aprovado; as partes relevantes da documentação devem ficar anexas ao certificado e o organismo notificado deve conservar uma cópia.

6 - O fabricante deve informar imediatamente o organismo notificado que tiver emitido o certificado de exame «CE» de tipo de quaisquer alterações do agente patogénico e dos marcadores das infecções a testar de que tenha conhecimento, resultantes, nomeadamente, da sua complexidade e variabilidade biológica, bem como se estas alterações são susceptíveis de afectar o comportamento funcional do dispositivo.

6.1 - As modificações do dispositivo aprovado devem receber uma aprovação complementar do organismo notificado que emitiu o certificado de exame «CE» de tipo sempre que possam pôr em causa a sua conformidade com os requisitos essenciais previstos no presente decreto-lei ou com as condições prescritas para a sua utilização.

6.1.1 - O fabricante deve informar o organismo notificado que tiver emitido o certificado de exame «CE» de tipo de qualquer alteração desta ordem introduzida no dispositivo aprovado.

6.1.2 - A nova aprovação reveste a forma de um aditamento ao certificado inicial de exame «CE» de tipo.

7 - Os outros organismos notificados podem obter uma cópia dos certificados de exame «CE» de tipo e ou dos seus aditamentos; os anexos dos certificados são colocados à disposição dos outros organismos notificados mediante pedido fundamentado e após informação do fabricante.

## ANEXO VI

### Verificação «CE»

1 - A verificação «CE» é o procedimento através do qual o fabricante ou o seu mandatário garante e declara que os dispositivos já submetidos aos procedimentos previstos no n.º 4 se encontram em conformidade com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e satisfazem os requisitos estabelecidos nas disposições do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis.

2 - O fabricante deve adoptar todas as medidas necessárias para que o processo de fabrico garanta a conformidade dos dispositivos com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e com os requisitos do presente decreto-lei que se lhes aplicam.

2.1- O fabricante deve, antes do fabrico, elaborar a documentação que defina os processos de fabrico, nomeadamente em matéria de esterilização e, se necessário, da adequação das matérias de base, bem como os procedimentos de ensaio, atendendo aos progressos da técnica; devem aplicar-se todas as disposições preestabelecidas e sistemáticas para garantir a homogeneidade da produção e a conformidade dos produtos com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e com os requisitos previstos no presente decreto-lei que lhes são aplicáveis.

2.2 - Se determinados aspectos dos controlos finais previstos no n.º 6.3 não forem adequados, o fabricante deve definir métodos apropriados de ensaio, monitorização e controlo durante o fabrico, os quais devem ser aprovados pelo organismo notificado. Aplicar-se-á o disposto no n.º 5 do anexo IV no que respeita aos citados procedimentos aprovados.

3 - O fabricante comprometer-se-á a criar e manter actualizado o processo de análise sistemática da experiência adquirida com os dispositivos na fase pós-produção e a desenvolver meios adequados para executar quaisquer acções de correcção e notificação necessárias, tal como referido no n.º 5 do anexo III.

4 - O organismo notificado efectuará os exames e ensaios adequados de acordo com o n.º 2.2 para verificar a conformidade do dispositivo com os requisitos previstos no presente decreto-lei através, quer do controlo e ensaio de cada dispositivo, como especificado no n.º 5, quer do controlo e ensaio dos dispositivos numa base estatística, como especificado no n.º 6, à escolha do fabricante.

4.1 - Ao efectuar a verificação estatística constante do n.º 6, o organismo notificado decidirá se deverão ser aplicados os processos estatísticos adequados à inspecção lote a lote, ou à inspecção de lotes isolados, devendo esta decisão ser tomada de acordo com o fabricante.

4.2 - Se a execução dos exames e ensaios numa base estatística for inadequada, devem os mesmos ser efectuados numa base aleatória, desde que esse procedimento, quando conjugado com as medidas adoptadas em conformidade com o n.º 2.2, assegure um grau de conformidade equivalente.

5 - Verificação através de exames e ensaios de cada produto:

5.1 - Todos os dispositivos serão examinados individualmente e efectuar-se-ão os ensaios adequados definidos na norma ou normas aplicáveis, previstas no artigo 6.º, ou ensaios equivalentes, para verificar a respectiva conformidade com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e com os requisitos do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis.

5.2 - O organismo notificado aporá, ou mandará apor, o seu número de identificação em cada dispositivo aprovado e elaborará um certificado de conformidade escrito relativamente aos ensaios efectuados.

6 - Verificação estatística:

6.1 - O fabricante deverá apresentar os produtos fabricados sob a forma de lotes homogéneos.

6.2 - Serão colhidas aleatoriamente uma ou mais amostras de cada lote; os dispositivos que constituem a amostra são analisados individualmente, efectuando-se os ensaios adequados definidos na norma ou normas aplicáveis mencionadas no artigo 6.º, ou ensaios equivalentes, para verificar a sua conformidade com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e com os requisitos do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis, a fim de se determinar se o lote deve ser aceite ou rejeitado.

6.3 - O controlo estatístico dos dispositivos será feito por atributos e ou variáveis, o que implica sistemas de amostragem que assegurem um alto nível de segurança de comportamento funcional de acordo com o progresso da técnica; o método de amostragem será determinado pelas normas harmonizadas referidas no artigo 6.º, atendendo à especificidade das categorias de dispositivos em questão.

6.4 - No caso de um lote ser aceite, o organismo notificado aporá ou mandará apor o seu número de identificação em todos os dispositivos e emitirá um certificado de conformidade, por escrito, relativamente aos ensaios efectuados; todos os dispositivos do lote podem ser colocados no mercado, com excepção dos dispositivos da amostra que se tenha verificado não estarem conformes.

6.4.1 - No caso de um lote ser rejeitado, o organismo notificado competente tomará as medidas necessárias para impedir a sua colocação no mercado; caso se verifique a rejeição frequente de lotes, o organismo notificado pode suspender a verificação estatística.

6.4.2 - O fabricante poderá, sob a responsabilidade do organismo notificado, apor o número de identificação deste último durante o processo de fabrico.

## ANEXO VII

### Declaração «CE» de conformidade

(Garantia da qualidade da produção)

1 - O fabricante deve certificar-se da aplicação do sistema de qualidade aprovado para o fabrico e efectuar a inspecção final dos dispositivos em questão, como especificado no n.º 3, ficando sujeito à fiscalização prevista no n.º 4.

2 - A declaração de conformidade é o procedimento através do qual o fabricante, que satisfaz as condições previstas no número anterior, garante e declara que os dispositivos em questão estão conformes com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e obedecem às disposições do presente decreto-lei que lhes são aplicáveis.

2.1 - O fabricante deve apor a marcação «CE» nos termos do artigo 7.º e elaborar uma declaração de conformidade, que abrangerá os dispositivos fabricados e será por ele conservada.

3 - Sistema de qualidade:

3.1 - O fabricante deve apresentar a um organismo notificado um pedido de avaliação do seu sistema de qualidade, que deve incluir:

- a) Toda a documentação e os compromissos referidos no n.º 3.1 do anexo IV;
- b) A documentação técnica relativa aos tipos aprovados e uma cópia dos certificados de exame «CE» de tipo.

3.2 - A aplicação do sistema de qualidade deve garantir a conformidade dos dispositivos com o tipo descrito no certificado de exame «CE» de tipo e com as disposições do presente decreto-lei que se lhes aplicam.

3.2.1 - Todos os elementos, requisitos e disposições adoptados pelo fabricante relativamente ao seu sistema de qualidade devem constar de documentação organizada de modo sistemático e ordenado, sob a forma de orientações e procedimentos escritos, como, por exemplo, programas, planos, manuais e registos da qualidade; a documentação do sistema de qualidade deve incluir, em especial, uma descrição adequada:

3.2.1.1 - Dos objectivos de qualidade do fabricante;

3.2.1.2 - Da organização da empresa e, nomeadamente:

- a) Das estruturas organizativas, das responsabilidades dos quadros e da sua competência organizativa em matéria de qualidade de fabrico dos dispositivos;
- b) Dos métodos que permitam controlar o funcionamento eficaz do sistema de qualidade e, designadamente, a sua capacidade para atingir a qualidade requerida dos dispositivos, incluindo o controlo dos dispositivos não conformes;

3.2.1.3 - Dos procedimentos de controlo e de garantia da qualidade a nível do fabrico e, nomeadamente:

- a) os processos e procedimentos que serão utilizados, designadamente em matéria de esterilização;
- b) Dos procedimentos relacionados com as compras;

- c) Dos processos de identificação do dispositivo, estabelecidos e actualizados a partir dos desenhos, especificações ou outros documentos relevantes para todas as fases do fabrico;

3.2.1.4 - Dos exames e ensaios apropriados que serão efectuados antes, durante e após o processo de fabrico, da frequência com que serão realizados e dos equipamentos de ensaio utilizados; deve ser assegurada de forma apropriada a rastreabilidade da calibração dos equipamentos de ensaio.

3.3 - O organismo notificado procederá a um controlo do sistema de qualidade para determinar se o mesmo satisfaz os requisitos referidos no n.º 3.2 e presumirá o cumprimento dos mesmos, no caso de os sistemas de qualidade estarem conformes com as normas harmonizadas pertinentes.

3.3.1 - A equipa encarregada do controlo deve ter experiência de avaliação da tecnologia em causa; o procedimento de avaliação deve incluir uma visita às instalações do fabricante e, em casos devidamente justificados, às instalações dos fornecedores do fabricante e ou dos seus subcontratantes, por forma a inspecionar os processos de fabrico.

3.3.2 - A decisão da equipa auditora deve ser notificada ao fabricante e conter as conclusões da inspecção, bem como uma avaliação fundamentada.

3.4 - O fabricante deve informar o organismo notificado que tiver aprovado o sistema da qualidade de qualquer projecto de alterações significativas do mesmo sistema; o organismo notificado deve avaliar as alterações propostas e verificar se o sistema de qualidade assim alterado continua a satisfazer os requisitos referidos no n.º 3.2 e comunicar ao fabricante a sua decisão com as conclusões da inspecção e uma avaliação fundamentada.

4 - Fiscalização:

4.1 - A fiscalização é feita de acordo com o disposto no n.º 5 do anexo IV.

5 - Verificação dos dispositivos referidos na lista A do anexo II:

5.1 - No que respeita a estes dispositivos, o fabricante transmitirá ao organismo notificado, imediatamente após a conclusão dos controlos ou ensaios, os protocolos dos controlos efectuados nos dispositivos ou em cada um dos lotes fabricados; além disso, deverá disponibilizar ao organismo notificado as amostras dos dispositivos fabricados ou dos lotes, de acordo com condições e modalidades pré-acordadas.

5.2 - O fabricante pode colocar os dispositivos no mercado, a menos que, dentro de um prazo acordado, não superior a 30 dias a contar da data de recepção das amostras, o organismo notificado lhe comunique qualquer decisão em contrário, incluindo, em especial, quaisquer condições de validade dos certificados emitidos.

## ANEXO VIII

### **Declaração e procedimentos relativos aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional**

1 - Em relação aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional, o fabricante ou o seu mandatário elaborará uma declaração que deverá incluir as informações especificadas no n.º 2 e deverá assegurar-se de que foram observadas as disposições aplicáveis do presente decreto-lei.

2 - A declaração compreenderá as seguintes informações:

2.1 - Dados que permitam identificar o dispositivo em questão;



2.2 - Um plano de avaliação que indique, nomeadamente, a finalidade, a motivação científica, técnica ou clínica, assim como o alcance da avaliação e o número de dispositivos em questão;

2.3 - A lista dos laboratórios e outras instituições que participem no estudo de avaliação dos comportamentos funcionais;

2.4 - A data de início e a duração provável da avaliação e, no caso dos dispositivos para autodiagnóstico, o local, assim como o número de leigos envolvidos;

2.5 - Uma declaração de que o dispositivo em questão está em conformidade com os requisitos previstos no presente decreto-lei, excepto no que respeita às questões abrangidas pela avaliação e aos pontos especificamente discriminados na declaração, e de que foram adoptadas todas as precauções necessárias para a protecção da saúde e segurança dos doentes, dos utilizadores e de quaisquer outras pessoas.

3 - O fabricante compromete-se, ainda, a manter à disposição das autoridades nacionais competentes documentação que permita compreender a concepção, o fabrico e o comportamento funcional do dispositivo, incluindo o comportamento funcional previsto, de modo a permitir a avaliação da sua conformidade com os requisitos estabelecidos no presente decreto-lei.

3.1 - A documentação deve ser conservada durante, pelo menos, cinco anos a contar da última avaliação do comportamento funcional.

3.2 - O fabricante tomará todas as medidas necessárias para que o processo de fabrico assegure a conformidade dos produtos fabricados com a documentação referida nos números anteriores.

4 - No que se refere aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional, são aplicáveis as disposições constantes dos n.ºs 1 e 2 do artigo 10.º, do artigo 11.º e do artigo 23.º

## ANEXO IX

### Critérios de designação dos organismos notificados

1 - O organismo notificado, o seu director e o pessoal encarregado da avaliação e controlo não podem:

1.1 - Ser autores da concepção, fabricantes, fornecedores, responsáveis pela instalação, utilizadores dos dispositivos que inspecionam, nem mandatários dessas pessoas;

1.2 - Intervir, nem directamente, nem como mandatários, na concepção, fabrico, comercialização ou manutenção dos dispositivos;

1.3 - Não é, no entanto, excluída a possibilidade de uma troca de informações técnicas entre o fabricante e o organismo notificado.

2 - O organismo notificado e o respectivo pessoal devem executar as operações de avaliação e verificação com a maior integridade profissional e dispor da necessária competência técnica em matéria de dispositivos médicos.

2.1 - O organismo notificado e o respectivo pessoal não devem estar sujeitos a quaisquer pressões ou incentivos, especialmente de ordem financeira, que possam influenciar o seu julgamento ou os resultados da inspecção, designadamente os provenientes de pessoas ou grupos de pessoas com interesses nos resultados dos controlos.

2.2 - Caso um organismo notificado confie a terceiros trabalhos específicos relativos ao apuramento e à verificação dos factos, deve certificar-se previamente de que aqueles satisfazem os requisitos estabelecidos no presente decreto-lei.

2.3 - O organismo notificado deve manter à disposição das autoridades nacionais os documentos pertinentes relativos à avaliação da competência do subcontratante e dos trabalhos por este efectuados no âmbito do presente decreto-lei.

3 - O organismo notificado deve poder assegurar a execução da totalidade das tarefas que lhe são atribuídas num dos anexos III a VII para as quais tenha sido notificado, quer essas tarefas sejam efectuadas pelo próprio organismo, quer sob a sua responsabilidade.

3.1 - Deve, nomeadamente, dispor do pessoal e possuir os meios necessários para executar de modo adequado as tarefas técnicas e administrativas ligadas às avaliações e controlos, o que implica que a organização disponha de pessoal científico suficiente com a experiência adequada e os conhecimentos necessários para avaliar a funcionalidade biológica e clínica e o comportamento funcional dos dispositivos de que foi notificada, em função dos requisitos estabelecidos no presente decreto-lei e, em especial, dos estabelecidos no anexo I.

3.2 - Deve, também, ter acesso ao equipamento necessário para as verificações exigidas.

4 - O pessoal encarregado das inspecções deve possuir:

- a) Uma boa formação profissional, incidindo sobre a totalidade das operações de avaliação e de verificação para as quais o organismo foi designado;
- b) Um conhecimento satisfatório das normas relativas às inspecções que efectuar e uma experiência adequada em relação às mesmas;
- c) A aptidão necessária para redigir os certificados, registos e relatórios que constituem a expressão material das inspecções efectuadas.

5 - Deve ser garantida a imparcialidade do pessoal encarregado das inspecções; a sua remuneração não deve ser feita em função, nem do número das inspecções que efectuar, nem dos resultados das mesmas.

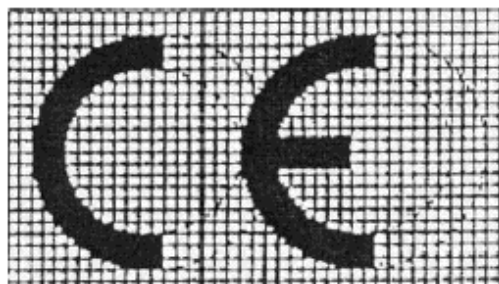
6 - O organismo notificado deve subscrever um seguro de responsabilidade civil, a menos que essa responsabilidade seja assumida pelo Estado com base no seu direito interno, ou que as inspecções sejam directamente efectuadas pelo Estado membro.

7 - O pessoal do organismo inspector é obrigado a segredo profissional, excepto perante as autoridades administrativas competentes do Estado em que exerce a sua actividade, no que se refere a todas as informações obtidas no exercício das suas funções, no âmbito do presente decreto-lei.

## ANEXO X

### Marcação «CE» de conformidade

1 - A marcação «CE» de conformidade é constituída pelas iniciais «CE» com o seguinte grafismo:



2 - Em caso de redução ou ampliação da marcação, devem ser respeitadas as proporções respeitantes do grafismo graduado acima reproduzido.

3 - Os diferentes elementos da marcação «CE» devem ter sensivelmente a mesma dimensão vertical, que não pode ser inferior a 5 mm.

4 - Quando a marcação for aposta em dispositivos de dimensões reduzidas, pode ser dispensada a observância do limite previsto no número anterior.

Alterado pelo Decreto-Lei n.º 311/2002, de 20 de Dezembro. O texto original era o seguinte:

1 - ...



2 - *Em caso de redução ou ampliação da marcação, devem ser respeitadas as proporções resultantes do grafismo graduado reproduzido no n.º 1.*

3 - ...

4 - ...



## **ANEXO B**

Artigo nº 8 do Anexo I do Decreto-Lei nº 189/2000



## **Artigo nº 8 do Anexo I do Decreto-Lei nº 189/2000**

### **B - Requisitos relativos à concepção e ao fabrico**

[...]

8 - Informações fornecidas pelo fabricante:

8.1 - Cada dispositivo deve ser acompanhado das informações necessárias para a sua correcta utilização em completa segurança e para a identificação do fabricante, tendo em conta a formação e os conhecimentos dos potenciais utilizadores, essas informações devem ser constituídas pelas indicações constantes da rotulagem e das instruções de utilização.

8.1.1 - Sempre que exequível e adequado, as informações necessárias para a utilização correcta e com segurança do dispositivo devem figurar no próprio dispositivo e ou, se for caso disso, na embalagem comercial; se os dispositivos não puderem ser rotulados individualmente, as informações devem constar da embalagem e ou das instruções que acompanhem um ou mais dispositivos.

8.1.2 - As instruções de utilização devem acompanhar ou ser incluídas na embalagem de um ou mais dispositivos.

8.1.3 - Em casos excepcionais e devidamente justificados, as instruções podem ser dispensadas desde que o dispositivo possa ser usado de forma correcta e segura sem elas.

8.1.4 - As instruções de utilização e o rótulo devem, obrigatoriamente, ser redigidos em língua portuguesa.

8.2 - Sempre que adequado, as informações deverão ser apresentadas sob a forma de símbolos, os quais, bem como as respectivas cores de identificação, devem estar em conformidade com as normas harmonizadas.

8.2.1 - Nas áreas em que não existam quaisquer normas, os símbolos e as cores usados devem ser descritos na documentação que acompanha o dispositivo.

8.3 - No caso de dispositivos que contenham substâncias ou preparações susceptíveis de ser perigosas, dadas a natureza e quantidade dos seus componentes e a forma de que se revestem, há que utilizar os símbolos de perigo e aplicar os requisitos de rotulagem previstos nos Decretos-Leis n.º 209/99, de 11 de Junho, e 189/99, de 2 de Junho.

8.3.1 - Se não houver espaço suficiente para apor todos estes dados no próprio dispositivo ou no seu rótulo, os símbolos de perigo relevantes devem ser colocados no

rótulo e os outros dados requeridos por estes decretos-leis mencionados nas instruções de utilização.

8.3.2 - Aplicar-se-á o disposto nestes diplomas para a ficha de segurança, a menos que todos os dados relevantes adequados constem já das instruções de utilização.

8.4 - O rótulo deve conter as seguintes informações, que, quando adequado, podem ser representadas por símbolos:

- a) O nome ou a designação comercial e o endereço do fabricante; relativamente aos dispositivos importados para serem distribuídos na Comunidade, o rótulo, a embalagem exterior ou as instruções de utilização deverão ainda incluir o nome e o endereço do mandatário do fabricante;
- b) As informações estritamente necessárias para que o utilizador possa identificar, de forma inequívoca, o dispositivo e o conteúdo da embalagem;
- c) Se aplicável, a menção «Esterilizado» ou a indicação de qualquer estado microbiológico ou de higiene especial;
- d) O código do lote, precedido da menção «Lote», ou o número de série;
- e) Se aplicável, a data limite de utilização segura do dispositivo ou dos seus elementos, sem degradação do seu comportamento funcional, expressa pela ordem do ano e mês e, se relevante, do dia;
- f) No que respeita aos dispositivos para avaliação do comportamento funcional, a menção «unicamente para avaliação do comportamento funcional»;
- g) Se aplicável, a indicação de que se trata de um dispositivo para utilização *in vitro*;
- h) Condições especiais de armazenamento e ou manuseamento;
- i) Se aplicável, instruções particulares de utilização;
- j) Advertências e ou precauções adequadas a adoptar;
- k) No caso de um dispositivo para autodiagnóstico, a menção clara desse facto.

8.5 - Caso a finalidade prevista de um dispositivo não seja evidente para o utilizador, o fabricante deve especificá-la claramente nas instruções e, se adequado, no rótulo.

8.6 - Na medida do possível, os dispositivos e os elementos individualizados devem ser identificados em termos de lotes, por forma a possibilitar a realização de acções destinadas a detectar riscos potenciais ocasionados pelos dispositivos e pelos elementos individualizados.

8.7 - Sempre que aplicável, as instruções de utilização devem conter as seguintes informações:

8.7.1 - As indicações referidas no n.º 8.4, com excepção das constantes nas alíneas d) e e);

8.7.2 - A composição do produto reagente em termos da natureza e quantidade ou concentração do(s) ingrediente(s) activo(s) do(s) reagente(s) ou conjunto(s), bem como, quando aplicável, a indicação de que o dispositivo contém outros ingredientes que influenciem a medição;

8.7.3 - As condições de armazenamento e o prazo de validade após a primeira abertura da embalagem primária, bem como as condições de armazenamento e a estabilidade dos reagentes de trabalho;



8.7.4 - O comportamento funcional referido no n.º 3 da parte A;

8.7.5 - A indicação de qualquer material especial necessário, incluindo as informações necessárias para a sua identificação, com vista a uma utilização adequada;

8.7.6 - O tipo de amostra a utilizar, bem como eventuais condições especiais de recolha, pré-tratamento e, se necessário, armazenamento e instruções relativas à preparação do doente;

8.7.7 - A descrição pormenorizada do procedimento a adoptar aquando da utilização do dispositivo;

8.7.8 - O processo de medição a adoptar no que respeita ao dispositivo, incluindo, se aplicável:

a) O princípio do método;

b) As características específicas do comportamento funcional analítico, isto é, sensibilidade, especificidade, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, limites de detecção e intervalo de medição, incluindo as informações necessárias para o controlo das interferências conhecidas pertinentes, as limitações do método e dados sobre a utilização dos processos e materiais de medição de referência aplicados pelo utilizador;

c) A descrição de qualquer outro procedimento ou manuseamento necessário antes de o dispositivo poder ser utilizado, tais como reconstituição, incubação, diluição e verificações do instrumento;

d) A indicação da eventual necessidade de uma formação específica;

8.7.9 - A abordagem matemática com base na qual se efectua o cálculo do resultado analítico;

8.7.10 - As medidas a adoptar em caso de alteração do comportamento funcional analítico do dispositivo;

8.7.11 - As informações adequadas para o utilizador relativas:

a) Ao controlo interno da qualidade, incluindo procedimentos específicos de validação;

b) À rastreabilidade das calibrações do dispositivo;

8.7.12 - Os intervalos de referência para as quantidades a analisar, incluindo uma descrição da população de referência considerada;

8.7.13 - Caso um dispositivo deva ser utilizado juntamente com, instalado ou ligado a outros dispositivos ou equipamentos médicos para funcionar de acordo com a finalidade prevista, os pormenores suficientes das suas características, de modo a permitir identificar os dispositivos ou os equipamentos que devem ser utilizados para que se obtenha uma combinação segura e adequada;

8.7.14 - Todas as indicações necessárias para verificar se um dispositivo se encontra bem instalado e pode funcionar correctamente e em completa segurança, bem como as informações relativas à natureza e frequência das operações de manutenção e calibração a efectuar, por forma a assegurar permanentemente o bom funcionamento e a segurança dos dispositivos e, ainda, indicações relativas à eliminação segura dos resíduos;

8.7.15 - Caso um dispositivo deva ser submetido a um tratamento ou operação adicional antes de ser utilizado, como, por exemplo, esterilização, montagem final, as indicações sobre esse tratamento ou operação;

8.7.16 - As instruções necessárias em caso de danificação da embalagem protectora e, se necessário, a indicação dos métodos adequados para se proceder a uma nova esterilização ou descontaminação;

8.7.17 - Caso o dispositivo seja reutilizável, informações sobre os processos de reutilização adequados, incluindo a limpeza, desinfecção, acondicionamento e, se for caso disso, o método de esterilização ou descontaminação, bem como quaisquer restrições quanto ao número possível de reutilizações;

8.7.18 - As precauções a adoptar no que respeita à exposição, em condições ambientais razoavelmente previsíveis, designadamente, a campos magnéticos, a influências eléctricas externas, a descargas electrostáticas, à pressão ou às variações de pressão, à aceleração e a fontes térmicas de ignição;

8.7.19 - As precauções a adoptar caso o dispositivo apresente um risco especial ou anormal no que respeita à sua utilização ou eliminação, incluindo medidas especiais de protecção; se o dispositivo contiver substâncias de origem humana ou animal, deve chamar-se a atenção para o seu potencial de infecção;

8.7.20 - Sempre que adequado, as instruções devem conter as seguintes especificações aplicáveis aos dispositivos para autodiagnóstico:

- a) Os resultados devem ser expressos e apresentados por forma a serem facilmente compreensíveis por um leigo; os dados devem ser acompanhados de conselhos aos utilizadores sobre as medidas a adoptar em caso de resultados positivos, negativos ou duvidosos, bem como de informações sobre a possível ocorrência de resultados falsamente positivos ou negativos;
- b) Poderão ser omitidas informações específicas, desde que as outras informações apresentadas pelo fabricante bastem para que o utilizador saiba como utilizar o dispositivo e compreenda o(s) resultado(s) por ele produzido(s);
- c) As informações fornecidas devem incluir uma menção clara que refira que o utilizador não deve adoptar nenhuma decisão de carácter médico sem primeiro consultar o seu médico;
- d) As informações devem igualmente tornar claro que, quando um dispositivo para autodiagnóstico é utilizado para fins de controlo de uma doença existente, o doente só deve adaptar o tratamento se tiver recebido a formação necessária para o efeito;

8.7.21 - A data de publicação ou da última revisão das instruções de utilização.

[...]

## **ANEXO C**

Resposta do INFARMED



# RE: 13657- ID4678 FW: Esclarecimento sobre reagentes destinados exclusivamente para a investigação

Vanda Araujo <[vanda.araujo@infarmed.pt](mailto:vanda.araujo@infarmed.pt)>

qua 10-07-2013 11:55

Para:Sara Silva <[sara.raquel.silva@ua.pt](mailto:sara.raquel.silva@ua.pt)>;

Cc:CIMI <[centro.informacao@infarmed.pt](mailto:centro.informacao@infarmed.pt)>; judite neves <[judite.neves@infarmed.pt](mailto:judite.neves@infarmed.pt)>; daps <[daps@infarmed.pt](mailto:daps@infarmed.pt)>; lilia louzeiro <[lilia.louzeiro@infarmed.pt](mailto:lilia.louzeiro@infarmed.pt)>;

Exma. Sra. Sara Silva,

Em resposta ao pedido de esclarecimento endereçado no dia 08 de julho 2013, somos a informar que:

De acordo com a Diretiva 98/79/EC, os produtos usados exclusivamente para investigação (*research use only*) são referidos no seu preâmbulo como “*whereas instruments, apparatus, appliances materials or other articles, including the software which are intended to be used for research purposes, without any medical objective are not regarded as devices for performance evaluation*”. É ainda referido que os reagentes produzidos nos laboratórios das instituições de saúde para serem utilizados neste mesmo ambiente e não envolvidos em transacções comerciais não são abrangidos pela presente directiva.

Adicionalmente, a *guideline* MEDDEV. 2.14/2 rev.1 - IVD GUIDANCE : Research Use Only products publicada no *site* da Comissão Europeia sumariza o conceito de produtos exclusivamente para investigação sublinhando que para um produto ser categorizado como RUO, não poderá ter uma finalidade ou um objetivo médico.

Assim, a Diretiva 98/79/EC e o Decreto-Lei nº 189/2000 que a transpõe para a legislação nacional, relativos aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, não se aplica aos RUO, pelo que não existe obrigatoriedade de tradução em língua portuguesa do respetivo folheto informativo ao abrigo destes diplomas. Mais informamos que não estando abrangidos pela legislação anteriormente mencionada, o Infarmed não tem competência sobre esta matéria.

Ao dispor para informação adicional.

Com os melhores cumprimentos,

**Vanda Araújo**

Direção de Produtos de Saúde

Health Products Directorate

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

*National Authority of Medicines and Health Products, I.P.*

Portugal

Tel.: +351 21 7987235;

E-mail: [vanda.araujo@infarmed.pt](mailto:vanda.araujo@infarmed.pt)

---

**From:** Sara Silva[SMTP:SARA.RAQUEL.SILVA@UA.PT]

**Sent:** Monday, July 08, 2013 2:06:43 PM

**To:** Infarmed

**Subject:** Esclarecimento sobre reagentes destinados exclusivamente para a investigação

**Auto forwarded by a Rule**

Exmos. Senhores,  
Boa tarde,

O meu nome é Sara da Silva e sou aluna da Universidade de Aveiro. Neste momento estou a finalizar o meu projeto para a obtenção de Mestrado em Tradução Especializada, nas áreas da Saúde e Ciências da Vida. Este trabalho consiste na tradução e revisão de protocolos no domínio da Bioquímica. Alguns dos protocolos, sobre os quais estou a trabalhar, são os folhetos informativos de reagentes destinados exclusivamente para a investigação.

Estou a contactar-vos, pois preciso de esclarecimentos sobre a legislação para este tipo de dispositivos médicos. Durante a minha pesquisa, tomei conhecimento que os dispositivos médicos para diagnósticos *in vitro* têm legislação própria e uma das suas particularidades recai sobre a obrigatoriedade de tradução dos folhetos para a língua portuguesa. O meu trabalho centra-se nessa obrigatoriedade, no entanto até ao momento não fui capaz de esclarecer se os folhetos de reagentes destinados exclusivamente para a investigação seguem as mesmas normas comparativamente àqueles que se destinam ao diagnóstico.

Agradecia a V/ ajuda para esse esclarecimento.

Cumprimentos académicos.

Sara da Silva

## **ANEXO D**

Guia de Segurança do Departamento de Química da Universidade de Aveiro







Departamento de Química  
Universidade de Aveiro

# **GUIA DE SEGURANÇA**

**Pedro Domingues ♦ Mário Simões**

## **Prefácio**

A saúde, segurança e bem estar de todos nós, bem como a segurança dos bens do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (DQUA) tem que constituir a nossa maior preocupação e condicionar o nosso comportamento, enquanto membros desta comunidade. O Departamento de Química pode ser um local de trabalho potencialmente perigoso e adverso para a nossa saúde, no entanto, se todos cumprirmos um certo número de regras de conduta, diminuir-se-á o risco de o vir a ser.

Desde há uns anos que o assunto segurança tem merecido grande atenção e interesse pelos membros do DQUA: i) a partir de 1993 tem havido um docente doutorado responsável por esta área; ii) ao longo dos anos têm-se feito diversas acções de formação sobre o tema e iii) o comportamento de todos nós tem vindo a adaptar-se às exigências das normas estabelecidas pelo grupo responsável pela área da segurança. No entanto, esta preocupação tem de ser crescente e mais rigorosa. É neste espírito que surge este “Guia de Segurança”, consequência do trabalho desenvolvido pelos anteriores responsáveis pela segurança e levado a cabo pelos actuais.

Com este guia de segurança pretende-se consolidar as boas práticas de conduta e procedimento dos membros do DQUA, corrigir as que não são apropriadas e instituir as normas para os novos membros, que chegam cada vez em maior número e com diferentes formações.

Para finalizar, espero que este guia de segurança contribua para tornar o DQUA mais seguro e menos adverso para a nossa saúde e que as boas práticas aqui instituídas possam servir de modelo para outros.

Aveiro, Dezembro de 2001

Artur Manuel Soares da Silva  
Professor Catedrático  
(Presidente do Conselho Directivo)

## **Agradecimentos**

Este guia de segurança é o fruto do trabalho desenvolvido por muitas pessoas, especialmente o actual e os antigos Presidentes do Conselho Directivo do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e os antigos responsáveis pela segurança do Departamento.

Na elaboração deste guia foram utilizadas, com pequenas alterações, algumas normas e formulários instituídos por estes anteriores responsáveis.

Algumas secções deste guia de segurança foram escritas pelos Doutores Francisco Amado e Valdemar Esteves.

# Índice

Prefácio .....	1
Agradecimentos .....	2
Gestão/Controlo de Riscos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro .....	5
1. Procedimentos em caso de emergência .....	7
1.1 Acidentes pessoais que põem em risco a integridade física de indivíduos .....	7
1.2 Acidentes que põem em risco o edifício e/ou a integridade física de todas as pessoas do edifício.....	7
1.3 Evacuação do edifício.....	8
1.3.1 Plano de evacuação do Departamento de Química .....	8
1.4 Instrumentos de combate a incêndios .....	9
2. Primeiros Socorros .....	12
2.1 Comunicação de acidentes.....	12
2.2 Caixas de primeiros socorros.....	12
2.3 Acidentes com os olhos .....	12
2.4 Acidentes com gás .....	13
2.5 Queimaduras pelo calor .....	13
2.6 Queimaduras com produtos corrosivos .....	13
2.7 Choque eléctrico .....	13
2.8 Pequenos cortes com sangramento .....	14
2.9 Sangramento de uma artéria .....	14
2.10 Estado de choque .....	14
3. Identificação, Classificação e Procedimentos no Manuseamento de Substâncias Perigosas ....	15
3.1 Avaliação de riscos/Identificação de substâncias perigosas .....	16
3.1.1 Passos para a identificação de substâncias perigosas .....	17
3.1.2 Ficha de segurança de produto ou Material Safety Data Sheet (MSDS).....	17
3.2 Procedimentos padrão para trabalho com substâncias perigosas .....	18
3.2.1 Aquisição de substâncias perigosas .....	18
3.2.2 Armazenamento de substâncias perigosas.....	19
3.2.3 Manuseamento de substâncias perigosas.....	21
3.2.4 Eliminação de resíduos.....	23
3.3 Procedimentos padrão para trabalho com produtos carcinogéneos.....	26
3.4 Procedimentos padrão para trabalho com produtos embriotóxicos.....	27
3.5 Procedimentos padrão para trabalho com produtos especialmente tóxicos (PETs) .....	28
3.6 Procedimentos padrão para trabalho com produtos potencialmente explosivos .....	30
3.7 Produtos químicos incompatíveis.....	33
3.8 Considerações finais/responsabilidades .....	34
4. Substâncias Inflamáveis e Solventes Orgânicos.....	36
4.1 Introdução .....	36
4.2 Transporte de solventes .....	37
4.3 Armazenamento no laboratório .....	38
4.4 Peróxidos .....	38
4.5 Destilação .....	39
4.6 Quantidades de armazenamento .....	40
5. Gases.....	41
5.1 Potenciais perigos associados aos gases comprimidos.....	41
5.2 Identificação das garrafas de gases comprimidos por cores.....	41
5.3 Regras básicas para armazenar e utilizar os gases com segurança.....	42
5.4 Líquidos criogénicos e dióxido de carbono sólido .....	43

6. Equipamento de Laboratório .....	45
6.1 Equipamento de funcionamento em regime contínuo .....	45
6.2 Equipamento de funcionamento ocasional fora do horário normal.....	45
6.3 Funcionamento do equipamento de laboratório. ....	45
7. Acesso ao Edifício e aos Laboratórios .....	49
7.1 Horário normal de funcionamento.....	49
7.2 Trabalho fora do horário normal de funcionamento.....	49
7.3 Regulamentação para trabalho que decorra fora do horário normal de funcionamento.....	49
7.4 Experiências que decorrem sem acompanhamento .....	50
8. Regras Adicionais e Informações .....	51
8.1 Pasta de segurança do laboratório .....	51
8.2 Campo magnético dos espectrómetros de RMN .....	51
8.3 Contaminação com mercúrio metálico .....	51
8.4 Selecção de luvas.....	52
9. Referências .....	54
10. Anexos .....	56
Anexo 1. Classificação de substâncias perigosas e simbologia.....	57
Anexo 2. Lista de frases de risco e segurança usadas com substâncias perigosas .....	60
Anexo 3. Exemplo de um MSDS .....	64
<i>Etiquetas de acordo com as Directivas da CE</i> .....	67
Anexo 4. Etiquetas.....	68
Anexo 5. Formulário de identificação dos produtos a destruir.....	69
Anexo 6. Guia de Segurança do laboratório de aulas.....	70
Anexo 7. Lista de substâncias carcinogéneas.....	73
Anexo 8. Requisição para utilização de substâncias carcinogéneas, embriotóxicas e especialmente tóxicas. ....	81
Anexo 9. Localização e transporte das garrafas de gases no DQUA .....	83
Anexo 10. Normas de Utilização da rede de Acetileno.....	84
Anexo 11. Normas de Utilização da rede de Hidrogénio .....	87
Anexo 12. Requisição para utilização de equipamento científico em regime contínuo.....	91
Anexo 13. Formulário para equipamento ou experiência que decorra sem acompanhamento .	92
Anexo 14. Informações úteis .....	93
Números de telefone importantes .....	93
Contactos do Departamento em caso de emergência .....	93
Coordenadores de segurança dos grupos de investigação .....	93

## **Gestão/Controlo de Riscos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro**

A segurança e a saúde dos membros, alunos e visitantes do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (DQUA) são uma preocupação primária da instituição. Por se considerar fundamental a existência de um ambiente de trabalho saudável e seguro, é dada a maior prioridade para a implementação de meios e mecanismos de modo a minimizar os riscos que decorrem da normal actividade do ensino e da investigação em química. Desta forma, tem vindo a ser desenvolvido um programa de modo a minimizar a possibilidade de ocorrerem problemas de saúde, acidentes e danos a pessoas e eventuais danos à propriedade da Universidade de Aveiro.

A responsabilidade do estabelecimento, implantação e monitorização de um programa de gestão/controlo de riscos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro é, em última análise, do Presidente do Conselho Directivo do Departamento de Química. Este programa é de âmbito alargado e tem como objectivos essenciais:

1. Providenciar um ambiente saudável para os alunos, funcionários e visitantes do Departamento de Química, assim como da comunidade em geral.
2. Cumprir as leis e regulamentos vigentes no Estado Português.

O programa de gestão/controlo de riscos no Departamento de Química da Universidade de Aveiro compreende mais especificamente a identificação, avaliação, controlo e correcção de procedimentos incorrectos ou omissos por parte de alunos e funcionários do Departamento de Química e das condições físicas do departamento passíveis de causar risco. Este programa deve incidir nas seguintes áreas:

1. Gestão de normas conducentes à implementação de sistemas de segurança de pessoas e bens.
2. Aperfeiçoamento de meios e sistemas de segurança nos laboratórios de aulas e de investigação.
3. Implementação de mecanismos e procedimentos apropriados de forma a melhorar a segurança na manipulação de produtos químicos.
4. Controlo regular do sistema eléctrico e de combate a incêndios.
5. Segurança do edifício.

Este programa tem subjacente o facto de todos os interessados concordarem com a necessidade, sempre premente, de se melhorarem as condições de trabalho e de se minimizar o

risco envolvido nas actividades diárias do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelo que se espera a colaboração activa de todos.

## **1. Procedimentos em caso de emergência**

Podem considerar-se dois tipos básicos de situações de emergência: acidentes pessoais que põem em risco a integridade física de indivíduos (queimadura, choque, envenenamento) e as que põem em risco o edifício e/ou a integridade física de todas as pessoas do edifício. Em qualquer dos casos deverá solicitar auxílio imediatamente.

### **1.1 Acidentes pessoais que põem em risco a integridade física de indivíduos**

No caso de ocorrerem acidentes pessoais sérios deverá actuar da seguinte forma:

- a. Não deverá mover o acidentado, excepto quando absolutamente necessário.
- b. Caso seja necessário, inicie os primeiros socorros (ver capítulo 2).
- c. Peça ajuda:
  - Telefone para os serviços de emergência (**112**) e, caso esteja a trabalhar fora do período normal de trabalho,
  - Telefone para os serviços de segurança da Universidade (**234 370 945 ou 22 244 ou 919 727 747**).

#### **Comunicação de acidentes:**

Todos os acidentes pessoais que exijam a deslocação ao hospital devem ser **IMEDIATAMENTE** comunicados ao Presidente do Conselho Directivo do DQUA ou a um dos responsáveis pela segurança.

### **1.2 Acidentes que põem em risco o edifício e/ou a integridade física de todas as pessoas do edifício.**

No caso de ocorrer uma emergência séria que ponha em risco o edifício e/ou a integridade física de todas as pessoas do edifício, como um incêndio ou perigo eminente de incêndio, explosão ou libertação de um gás perigoso, o edifício deverá ser evacuado. Neste caso e se o alarme não tiver sido activado automaticamente, **ACTIVE O ALARME** premindo uma das botoneiras. Caso o alarme tenha sido activado proceda como indicado em 1.3.

Resumindo, em caso de acidente que ponha em risco o edifício e/ou a integridade física de todas as pessoas do edifício deverá actuar do seguinte modo:

1. Active o alarme premindo uma das botoneiras.
2. Telefone para os bombeiros (**234 429 979 ou 234 422 133**) e/ou para os serviços de emergência (**112**).



3. Telefone para os serviços de segurança da Universidade (**234 370 945 ou 22 244 ou 919 727 747**).
4. Saia do edifício.

### **1.3 Evacuação do edifício**

Sempre que soar o alarme é OBRIGATÓRIA a evacuação do edifício. Existe sinalização afixada nas paredes que indica a via de evacuação que deverá seguir. O plano de evacuação do edifício será apresentado seguidamente. Todas as pessoas que trabalham no Departamento de Química deverão estar familiarizadas com a via de evacuação correcta, assim como dos procedimentos que deverão executar.

Serão efectuados exercícios de evacuação duas vezes por ano (no início do 1º e do 2º semestres). Nestes exercícios é obrigatória a evacuação total do edifício.

Poderão ocorrer ainda ensaios ao sistema de alarme, em que todos os funcionários serão devidamente notificados.

#### **1.3.1 Plano de evacuação do Departamento de Química**

Sempre que soar o alarme é OBRIGATÓRIA a evacuação do edifício. A evacuação deverá ocorrer da seguinte forma:

- a) Desligue todos os equipamentos eléctricos e feche todas as garrafas contendo gases inflamáveis. Certifique-se que a experiência que estiver a realizar é deixada em segurança (desligar aquecimento, sistemas de vazio ou pressão, etc.).
- b) Quando sair do laboratório ou gabinete feche as portas deixando-as, no entanto, destrancadas. Serão destacadas duas pessoas por piso (coordenadores de segurança) que terão a missão de verificar se a evacuação foi completa.
- c) Dirija-se calmamente para a rua seguindo a sinalização de segurança que se encontra afixada. O edifício do DQUA possui duas portas de saída, este e oeste. Nunca utilize os elevadores. É provável que ocorra um corte de energia eléctrica.
- d) Dirija-se para o local de encontro (saída oeste, perto do bar do Departamento) de forma a que se possa verificar que todos estão presentes.
- e) Os docentes que estejam a leccionar aulas práticas deverão indicar aos alunos que se dirijam calmamente para o local de encontro, sendo o docente o responsável por deixar em segurança todas as experiências que estejam a realizar-se.

- f) Não reentre no edifício sem que um elemento da Comissão de Segurança diga que é seguro fazê-lo.

#### **1.4 Instrumentos de combate a incêndios**

**ATENÇÃO:** NÃO É OBRIGAÇÃO DE NENHUM FUNCIONÁRIO OU ALUNO COMBATER UM INCÊNDIO. Se tiver a menor dúvida acerca da sua capacidade para dominar um incêndio não o tente fazer.

Utilize a seguinte tabela de decisão para avaliar se deve fugir ou se pode combater o incêndio. Só deverá ser efectuada uma tentativa se ocorrerem TODAS as premissas seguintes:

- √1. O alarme foi accionado.
- √2. O incêndio é de dimensões reduzidas, está contido e não está a alastrar para além do seu ponto de partida.
- √3. Existe uma via segura de fuga, não existe perigo eminente e pode combater o incêndio de costas voltadas para a saída.
- √4. Não há perigo de intoxicação por fumo.
- √5. O extintor apropriado encontra-se acessível.
- √6. Sabe utilizar o extintor.

**SE ALGUMA DESTAS PREMISSAS NÃO FOR CUMPRIDA, NÃO TENDE COMBATER O INCÊNDIO. ACCIONE O ALARME, SOLICITE AJUDA E ABANDONE A ÁREA.**

Todos os laboratórios estão equipados com extintores de combate a incêndios. De igual forma, todos os laboratórios estão equipados com mantas e baldes de areia de combate a incêndios. Espera-se que todos os alunos e funcionários conheçam a sua localização e modo de funcionamento. Existem ainda várias mangueiras de combate a incêndios, para uso exclusivo por pessoal formado e/ou por profissionais.

Os extintores devem estar em perfeito estado de funcionamento. O departamento assegura a sua inspecção periódica, no entanto, CASO O PRAZO DE VALIDADE DE ALGUM EXTINTOR TENHA SIDO ULTRAPASSADO DEVE AVISAR IMEDIATAMENTE O RESPONSÁVEL PELA SEGURANÇA. Os modelos recarregáveis devem voltar a ser cheios pelo fabricante, após cada utilização. O extintor é considerado um equipamento de primeira intervenção, sendo um instrumento simples de manusear, portátil e eficiente. Se bem que de

dimensões reduzidas e capacidades limitadas, o extintor é de extrema importância quando manipulado correctamente no início do incêndio.

A utilização de cada tipo de extintor depende da situação. Em primeiro lugar, deve-se reconhecer qual o tipo de incêndio que está a ocorrer. Existem basicamente quatro classes de incêndios:

**Classe A:** Envolve **materiais comuns** como papel, plástico, madeira, etc.

**Classe B:** Envolve **materiais inflamáveis ou combustíveis** como a gasolina ou a maioria dos solventes orgânicos utilizados nos laboratórios.

**Classe C:** Envolve **equipamentos eléctricos** como interruptores, instrumentação de laboratórios, etc. Nunca usar água.

**Classe D:** Envolve **metais combustíveis** como magnésio, titânio, potássio ou sódio, assim como reagentes organometálicos como alquil-lítio, reagentes de Grignard ou dietilzinco. Estes materiais ardem a altas temperaturas e reagem violentamente na presença de água, ar e/ou outros produtos químicos.

Quanto ao tipo de agente extintor, os extintores podem ser:

Extintores de água (não existentes no DQUA);

Extintores de espuma (não existentes no DQUA);

Extintores de pó-químico;

Extintores de anidrido carbónico (neve carbónica).

Tipo de incêndio	Água	Pó Químico	Neve carbónica	Observações
<b>A</b>	Eficiente	O melhor	Pouco Eficiente	
<b>B</b>	Proibido	O melhor	Eficiente	
<b>C</b>	Proibido	O melhor	Eficiente	
<b>D</b>	Proibido	Proibido	Proibido	Usar areia
Comentários	Nunca usar no laboratório	Deixam uma camada de material não inflamável no material extinto o que evita reacendimentos. Pode danificar instrumentação sensível, pois deixa resíduo.	É limpo, todavia existe o perigo de reacendimento. É o mais indicado para instrumentação sensível. Não é eficiente em ambiente aberto ou muito ventilado.	

Como deve utilizar um extintor:

1. Transportá-lo na posição vertical, segurando no manípulo;
2. Retirar o selo ou a cavilha de segurança;

3. Premir a alavanca, permitindo sob o efeito de uma pressão interna libertar o agente extintor;
4. Dirigir o jacto para a base das chamas;
5. Varrer devagar toda a superfície.

Existem ainda, distribuídas em todos os laboratórios, de aulas e de investigação, mantas anti-fogo que possuem uma capacidade de extinção de fogo por abafamento. Estas mantas estão indicadas para extinção de fogo em vestuário de pessoas ou em equipamento, onde por abafamento se consiga a extinção.

Os chuveiros de segurança localizados nos laboratórios destinam-se a socorrer vítimas de incêndios ou de derrame de produtos corrosivos ou inflamáveis. Estes chuveiros devem ser usados, não só nos casos de roupa em chamas, mas também como medida preventiva, nos casos em que as roupas tenham ficado embebidas com solventes inflamáveis, portanto em perigo de se inflamarem.

**NO CASO DAS SUAS ROUPAS SE INCENDIAREM, PARE, DEITE-SE E ROLE SOBRE SI MESMO DE FORMA A APAGAR O FOGO.**

**SE ESTIVER PERTO DE UMA MANTA ANTI-FOGO OU DE UM CHUVEIRO, UTILIZE-OS.**

Todavia, se estes se encontrarem longe, proceda como se indica inicialmente.

## **2. Primeiros Socorros**

Os princípios gerais que se apresentam a seguir devem ser observados no caso de acidentes sérios ou potencialmente sérios.

A primeira coisa a fazer em caso de acidente é pedir ajuda imediatamente, seguindo os procedimentos estabelecidos no ponto 1.

Contudo, no que diz respeito a acidentes com produtos químicos, a intervenção rápida no local do acidente é muitas vezes essencial, mesmo antes da chegada de apoio especializado.

No caso de ocorrerem acidentes pessoais sérios deverá actuar da seguinte forma:

- a. Não deverá mover o acidentado, excepto caso seja absolutamente necessário.
- b. Caso seja necessário, inicie os primeiros socorros.
- c. Peça ajuda:

Telefone para os serviços de emergência (**112**) e,

caso esteja a trabalhar fora do período normal de trabalho,

telefone também para os serviços de segurança da Universidade (**234 370 945 ou 22 244 ou 919 727 747**).

### **2.1 Comunicação de acidentes**

Todos os acidentes pessoais que exijam a deslocação ao hospital devem ser **IMEDIATAMENTE** comunicados ao Presidente do Conselho Directivo do DQUA ou a um dos responsáveis pela segurança.

### **2.2 Caixas de primeiros socorros**

Os produtos que se encontram nas caixas de primeiros socorros (localizadas nos pisos 1, 2 e 3) destinam-se a ser usados **APENAS NO CASO DE PRIMEIROS SOCORROS**. Por favor, notifique os responsáveis pela segurança caso tenha retirado algum produto, de forma a este ser substituído.

### **2.3 Acidentes com os olhos**

Em caso de lesão ocular com salpicos para o interior dos olhos, deve lavá-los imediata e abundantemente com água limpa, da torneira ou das garrafas de água destilada que existem em qualquer laboratório ou ainda com solução de limpeza ocular existente nas caixas de primeiros socorros.

Não deve tentar mexer nos olhos ou remover qualquer partícula, uma vez que isso requer a intervenção de pessoal especializado.

#### **2.4 Acidentes com gás**

Em caso de intoxicação com gases, é essencial remover a pessoa gaseada rapidamente para um local não contaminado. **Cuidado para não se tornar também uma vítima.**

Desapertar as roupas à volta do pescoço e cintura e manter a vítima aquecida.

Se a vítima deixar de respirar, deve iniciar imediatamente a respiração artificial.

Se a intoxicação foi provocada por vapores de solventes, a roupa poderá estar contaminada e, nesse caso, deverá ser removida.

#### **2.5 Queimaduras pelo calor**

A área afectada deve ser lavada imediatamente com água fria e/ou gelo. Em seguida cobrir a área afectada com gaze, para proteger de possível infecção.

Se se tratar de queimadura extensa, prevenir a entrada em estado de choque (ver adiante) e chamar ajuda especializada.

#### **2.6 Queimaduras com produtos corrosivos**

A área afectada deve ser lavada imediata e abundantemente com soro fisiológico ou com água limpa durante 15 minutos, pelo menos.

As pequenas queimaduras com ácido ou com bromo devem ser posteriormente lavadas com uma solução de carbonato de sódio a 5%. As pequenas queimaduras com base devem ser posteriormente lavadas com uma solução de ácido acético a 5%. Em seguida cobrir a área afectada com gaze, sem apertar.

No caso de queimaduras extensas ou de maior gravidade, como em queimaduras com ácido fluorídrico ou fenol, pedir sempre assistência médica especializada.

#### **2.7 Choque eléctrico**

Desligar imediatamente a corrente eléctrica retirando a ficha da tomada. Se não puder alcançar a tomada, desligue o quadro eléctrico.

Não utilize o interruptor do equipamento. A causa do acidente pode ter sido uma avaria do próprio interruptor. Na impossibilidade de cortar a energia, coloque debaixo dos pés material isolante, por exemplo, uma espessa camada de jornais. Não toque na vítima com as mãos. Afaste

os membros da vítima da fonte de energia utilizando um cabo de vassoura ou uma cadeira de madeira. Não utilize objectos húmidos ou metálicos.

Se a vítima estiver inconsciente e em paragem respiratória, inicie imediatamente a respiração artificial.

Se a vítima perdeu a consciência, sofreu queimaduras ou se sente mal, telefone para os serviços de emergência (112) e, caso esteja a trabalhar fora do período normal de trabalho, telefone também para os serviços de segurança da Universidade (234 370 945 ou 22 244 ou 919 727 747).

## **2.8 Pequenos cortes com sangramento**

Lavar abundantemente a ferida com água limpa. Aplicar um anti-séptico e tapar convenientemente a ferida.

## **2.9 Sangramento de uma artéria**

O sangramento de uma artéria é facilmente reconhecido pelo vermelho vivo do sangue e pelo facto de jorrar em esguicho. O sangramento deve ser imediatamente controlado por pressão num ponto apropriado da artéria entre a ferida e o coração. Telefone para os serviços de emergência (112) e, caso esteja a trabalhar fora do período normal de trabalho, telefone também para os serviços de segurança da Universidade (234 370 945 ou 22 244 ou 919 727 747).

## **2.10 Estado de choque**

O estado de choque pode resultar de lesão física ou de distúrbio emocional. Os sintomas poderão incluir prostração, palidez, pele húmida e fria, debilidade, tonturas, ansiedade e problemas de visão.

A vítima deve ser colocada em posição horizontal, com os pés ligeiramente levantados, ao mesmo tempo que se deve tranquilizá-la e tentar diminuir a sua ansiedade, até ser possível transportá-la para o hospital.

### 3. Identificação, Classificação e Procedimentos no Manuseamento de Substâncias Perigosas

Muitas das substâncias encontradas no laboratório de química possuem propriedades que as tornam perigosas. Estas substâncias podem ser tóxicas, inflamáveis, explosivas, carcinogéneas, hipersensibilizantes ou possuírem efeitos fisiológicos desconhecidos. Desta forma, dever-se-á assumir sempre que todos os produtos químicos com que trabalhamos são potencialmente perigosos e, desta forma, trabalhar de forma a evitar a inalação e o contacto com a pele, o fogo ou uma explosão.

Segundo a Directiva do Conselho da União Europeia de 27 de Junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas (67/548/CEE), são «perigosas» as substâncias e preparações:

- a) Explosivas: substâncias e preparações que podem explodir sob o efeito da chama ou que são mais sensíveis aos choques ou às fricções do que o dinitrobenzeno;
- b) Comburentes: substâncias e preparações que, em contacto com outras substâncias, nomeadamente com substâncias inflamáveis, apresentam uma reacção fortemente exotérmica;
- c) Facilmente inflamáveis; substâncias e preparações:
  - que podem aquecer e finalmente inflamar-se em contacto com o ar a uma temperatura normal sem fornecimento de energia, ou
  - sólidas, que podem inflamar-se facilmente por uma breve acção de uma fonte de ignição e que continuam a arder ou a consumir-se após o afastamento desta fonte, ou
  - no estado líquido, cujo ponto de ignição é inferior a 21 °C, ou
  - gasosas, inflamáveis em contacto com o ar à pressão normal ou
  - que, em contacto com a água ou o ar húmido, desenvolvem gases facilmente inflamáveis em quantidades perigosas;
- d) Inflamáveis: substâncias e preparações líquidas, cujo ponto de ignição se situa entre 21 °C e 55 °C;
- e) Tóxicas: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos graves, agudos ou crónicos, e mesmo a morte;
- f) Nocivas: substâncias e preparações que, por inalação, ingestão ou penetração cutânea, podem implicar riscos de gravidade limitada;



g) Corrosivas: substâncias e preparações que, em contacto com tecidos vivos, podem exercer uma acção destrutiva sobre estes últimos;

h) Irritantes: substâncias e preparações não corrosivas que, por contacto imediato, prolongado ou repetido com a pele ou as mucosas, podem provocar uma reacção inflamatória.

Existem assim nove classes de substâncias perigosas (ver **anexo 1**), classificadas da seguinte forma:

Classe 1: Explosivos;

Classe 2: Gases;

Classe 3: Líquidos inflamáveis;

Classe 4: Sólidos inflamáveis, substâncias combustíveis espontaneamente e substâncias perigosas quando molhadas;

Classe 5: Agentes oxidantes e peróxidos orgânicos;

Classe 6: Substâncias tóxicas e infecciosas;

Classe 7: Substâncias radioactivas;

Classe 8: Substâncias corrosivas;

Classe 9: Bens perigosos diversos.

### **3.1 Avaliação de riscos/Identificação de substâncias perigosas**

A base do processo decisório sob a melhor forma de trabalhar no laboratório consiste na identificação das substâncias perigosas com que iremos lidar. Conhecendo as propriedades dessas substâncias, será possível:

1. Informar e treinar os alunos de forma a que usem os produtos químicos com segurança;
2. Adequar o local de trabalho e os procedimentos de forma a minimizar o risco de exposição;
3. Utilizar o material protector adequado;
4. Implementar os procedimentos adequados em caso de derrames ou outras emergências;
5. Reconhecer sinais de exposição e providenciar os primeiros socorros, caso sejam necessários.

Desta forma, **É OBRIGATÓRIA A AVALIAÇÃO DE TODOS OS PRODUTOS QUÍMICOS QUE SE UTILIZARÃO DURANTE O TRABALHO DE FORMA A PERMITIR A IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS.**

É obrigação do docente responsável assegurar-se que o aluno cumpre esta norma.

### **3.1.1 Passos para a identificação de substâncias perigosas**

1. Identifique todos os produtos químicos que utilizará no seu trabalho.
2. Identifique possíveis produtos de reacções que se possam formar.
3. Leia cuidadosamente a informação fornecida pelo fabricante dos produtos que irá utilizar. Consulte no **anexo 2** a lista de frases de risco e segurança usadas com substâncias perigosas.
4. Imprima e leia atentamente as fichas de segurança (MSDS).

**TODA A INFORMAÇÃO RECOLHIDA DEVERÁ SER REGISTADA NO CADERNO DE LABORATÓRIO.**

**Este caderno deverá manter-se sempre no laboratório, em local acessível.**

### **3.1.2 Ficha de segurança de produto ou Material Safety Data Sheet (MSDS)**

As MSDS são documentos produzidos pelos fabricantes de forma a fornecer informação acerca da segurança dos produtos químicos aos seus utilizadores. As MSDS fornecem muito mais informação do que os rótulos das embalagens. O tipo de informação e o seu detalhe são padronizados, apesar de existirem algumas diferenças entre a UE e os EUA. Poderá consultar no **anexo 3** um exemplo de uma MSDS.

Segundo a directiva 91/155/CEE da UE, a ficha de segurança deve conter as seguintes rubricas obrigatórias:

1. Identificação da substância/preparação e da sociedade/empresa;
2. Composição/informação sobre os componentes;
3. Identificação de perigos;
4. Primeiros socorros;
5. Medidas de combate a incêndios;
6. Medidas a tomar em caso de fugas acidentais;

7. Manuseamento e armazenagem;
8. Controlo da exposição/protecção individual;
9. Propriedades físicas e químicas;
10. Estabilidade e reactividade;
11. Informação toxicológica;
12. Informação ecológica;
13. Questões relativas à eliminação;
14. Informações relativas ao transporte;
15. Informação sobre regulamentação;
16. Outras informações.

**Antes de iniciar o trabalho no laboratório é obrigatória a aquisição de MSDS de TODOS os produtos químicos com que irá trabalhar. Deverá guardar no seu caderno de laboratório uma cópia e outra cópia deverá ser arquivada, caso ainda não exista, na pasta de segurança do seu laboratório.**

Existem diversas formas de adquirir as MSDS:

1. Pesquisa na Internet, por exemplo em:  
<http://chemdat.merck.de>  
<http://www.ilpi.com/msds/index.html>  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/>  
<http://hazard.com/msds/index.php>  
<http://www.sigma-aldrich.com/msds>  
<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/>
2. Consulta ao docente responsável ou ao coordenador de segurança do grupo de investigação;
3. Consulta aos responsáveis pela segurança;
4. Pedido directo ao fabricante.

## **3.2 Procedimentos padrão para trabalho com substâncias perigosas**

### **3.2.1 Aquisição de substâncias perigosas**

De forma a reduzir ao mínimo a duplicação de produtos químicos perigosos nos diversos grupos de investigação do DQ, dever-se-á encorajar a utilização de produtos já existentes no inventário do grupo (ver secção 3.2.2). De igual forma, deve-se encorajar, sempre que possível, a utilização de produtos existentes nos inventários de outros grupos de investigação. O objectivo desta política é o de reduzir ao mínimo a quantidade de produtos químicos existentes nos laboratórios. Aceita-se, no entanto, que os produtos químicos já existentes possam não ser apropriados para a investigação em curso.

1. A decisão de adquirir um produto químico deverá constituir um compromisso de boa utilização deste a sua recepção até à sua eliminação. Este compromisso implica a aquisição e leitura atenta da MSDS do produto a adquirir.
2. Antes da aquisição de um produto químico, o requerente deverá assegurar-se que esse produto não existe no seu laboratório nem, sempre que tal seja possível, noutros laboratórios de investigação. Todos os alunos e funcionários do Departamento de Química têm a obrigação de reduzir a presença e a exposição a produtos perigosos no laboratório ao mínimo possível.
3. A aquisição de qualquer produto químico deverá ser efectuada via armazém, utilizando o impresso apropriado existente no armazém. A requisição de produtos existentes no armazém deverá ser efectuada por computador.
4. Na altura de recepção do produto químico deverá ser inscrita na embalagem a data de recepção e, posteriormente, a data de abertura do recipiente.

### **3.2.2 Armazenamento de substâncias perigosas**

1. Todos os produtos químicos requisitados deverão ser imediatamente transportados para o local de armazenamento do grupo de investigação ou do laboratório de aulas. Os recipientes de vidro com volume superior a 500 ml deverão ser transportados em carrinhos apropriados existentes no armazém.
2. A quantidade de produtos químicos existentes nas bancadas do laboratório deverá ser a mínima possível.
3. Sempre que possível, os locais de armazenamento deverão ser ventilados e possuir sistemas de recolha de derrames, devendo garantir a segurança dos utilizadores.
4. Todos os produtos existentes no local de armazenamento/laboratório deverão estar inventariados em ficheiro de Access, Excel, ou equivalente.

- a. A manutenção do inventário é da responsabilidade do coordenador de segurança do grupo de investigação.
  - b. No inventário deverão estar indicados o nome, o número CAS, a quantidade e a localização de cada produto, além de outras informações consideradas úteis pelo grupo de investigação.
  - c. Neste inventário deverão estar ainda indicados os produtos que, previsivelmente, não voltem a ser necessários.
5. O coordenador de segurança do grupo de investigação tem ainda a obrigação de proceder, anualmente, à inspeção visual de todos os produtos de forma a identificar possíveis derrames, deteriorações e a integridade dos recipientes. Deverá ainda proceder mensalmente à inspeção do laboratório para identificação de produtos que se encontrem fora do local de armazenamento. Todos os produtos que não se encontrem em utilização deverão voltar para a área de armazenamento.
  6. Todos os produtos deverão ser segregados tal como se indica em **3.2.2.1**.
  7. **TODOS** os produtos sintetizados no laboratório deverão ser devidamente **ETIQUETADOS** (nome do composto ou código, desde que o processo de síntese esteja bem identificado no caderno de laboratório, data, nome do operador, docente responsável). Poderá requisitar no armazém etiquetas apropriadas para este fim (ver **anexo 4**). Estes produtos deverão estar armazenados no local de armazenamento de produtos químicos, seguindo as regras de segregação.

#### **3.2.2.1 Segregação de substâncias incompatíveis**

8. Todos os produtos químicos deverão ser armazenados tendo em conta as informações constantes na sua folha MSDS e consoante a sua classificação de risco e compatibilidade tal como se indica na tabela 1.
9. Todos os produtos especialmente tóxicos, carcinogéneos e embriogéneos deverão ser armazenados em recipientes inquebráveis e em locais de acesso restrito.

**Tabela 1: Tipos de isolamento necessário no armazenamento das diversas classes de substâncias.**

Classe	2.1	2.2	3 PG I e II	3 PG III	4.1	4.2	4.3	5.1	5.2	6.1	8	9
2.1	NA	NA	SF	SF	SF	<b>NP</b>	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SF	SG
2.2	NA	NA	SG	SG	SG	SF	SG	SG	SF	SG	SG	SG
3 PG I e II	SF	SG	NA	NA	SF	SF	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SG	SG
3 PG III	SF	SG	NA	NA	SG	SF	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SG	SG
4.1	SF	SG	SF	SG	NA	SF	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SG	SG
4.2	<b>NP</b>	SF	SF	SF	SF	NA	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SG	SG
4.3	SF	SG	SF	SF	SF	SF	NA	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	SF	SG
5.1	<b>NP</b>	SG	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	NA	SF	SF	SF	SF
5.2	<b>NP</b>	SF	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	<b>NP</b>	SF	NA	<b>NP</b>	SF	SF
6.1	SF	SG	SF	SF	SF	SF	SF	SF	<b>NP</b>	NA	SG	SG
8	SF	SG	SG	SG	SG	SG	SF	SF	SF	SG	NA	SG
9	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SF	SF	SG	SG	NA

**Nota:** Esta tabela é meramente indicativa. Para cada composto em particular consulte sempre a sua MSDS ou outras fontes que considere necessárias.

- **NA** significa **N**ão **A**plicável e as duas classes de compostos podem ser armazenadas na mesma área.
- **SG** significa que as duas classes devem ser **SeG**regadas, i.e., afastadas por uma distância mínima de três metros.
- **SF** significa que as duas classes devem estar **S**eparadas de fontes de **F**ogo. Esta separação deverá consistir em paredes que forneçam, pelo menos, quatro horas de resistência a incêndios ou separados por uma distância mínima de cinco metros. Certifique-se se não é necessário o armazenamento em áreas distintas.
- **NP** significa que **N**ão é **P**ermitido o armazenamento das duas classes de compostos na mesma área de armazenamento. As duas classes de compostos só podem ser armazenadas a uma distância mínima de, pelo menos, 10 metros.

### 3.2.3 Manuseamento de substâncias perigosas

Todos os que trabalham no laboratório têm a obrigação de adoptar e implementar práticas seguras de trabalho, de forma a não se colocarem em risco nem colocarem em risco os seus

colegas. O supervisor/docente responsável tem a obrigação de fornecer treino e todos os recursos possíveis de forma a garantir a utilização dessas práticas seguras de trabalho.

Quando se lida com compostos perigosos, existem algumas precauções gerais que todos têm a obrigação de cumprir, de forma a minimizar o risco de exposição:

1. A inalação, o contacto com a pele e a ingestão acidental de compostos perigosos deverão ser evitados.
2. É obrigação de todos manter a sua área de trabalho limpa e desimpedida. A área de trabalho deverá ser periodicamente limpa e todo o material e equipamento deverão estar limpos e arrumados.
3. É obrigatório o uso de bata, óculos de segurança e, sempre que necessário, outro equipamento de protecção pessoal apropriado.
  - a. Os óculos de segurança poderão ser adquiridos no armazém do DQUA.
  - b. Deve usar sempre luvas de protecção apropriadas (ver cap. 8) quando manusear substâncias agressivas para a pele ou que sejam absorvidas por via cutânea. **DESCALCE** apropriadamente as luvas sempre que sair do laboratório, antes de mexer em portas, torneiras e outros dispositivos de uso comum de forma a evitar a contaminação de pessoas e outras áreas do laboratório. As luvas podem ser requisitadas no armazém.
4. Antes de abandonar o laboratório deve retirar a bata e lavar as áreas da pele que eventualmente estiveram expostas a substâncias tóxicas.
5. É expressamente proibido fumar em todo o edifício do Departamento de Química com excepção do bar e da área adjacente.
6. Não é permitido comer ou beber nos laboratórios.
7. É proibido o uso de frigoríficos e de outro material de laboratório para armazenar ou depositar alimentos destinados a consumo humano.
8. Todos os que trabalham no laboratório têm a obrigação de conhecer a perigosidade dos produtos com que lidam e de actuar de acordo com as instruções inscritas nas suas folhas de segurança (MSDS). Deverão dar especial atenção às precauções a tomar de forma a evitar a exposição a essas substâncias perigosas.
9. Todas as substâncias ou misturas de substâncias cuja perigosidade seja desconhecida deverão ser manipuladas como se se tratassem de substâncias perigosas.
10. Não é permitida a presença de recipientes não rotulados nos laboratórios.

- a. Caso o conteúdo do recipiente seja utilizado no próprio dia o rótulo deverá incluir o nome do conteúdo ou o seu código, desde que este esteja devidamente identificado no caderno de laboratório.
  - b. Caso o conteúdo do recipiente seja utilizado num período curto, o rótulo deverá incluir ainda a data e o nome do utilizador.
  - c. Caso não se preveja a utilização do conteúdo do recipiente num futuro próximo, o rótulo deverá incluir o nome do composto ou código, desde que o processo de síntese esteja bem identificado no caderno de laboratório, data, nome do operador e o nome do docente responsável.
  - d. O cumprimento destas normas de etiquetagem devem ser investigadas pelo coordenador de segurança do grupo de investigação.
11. Na manipulação de substâncias inflamáveis, deverão ter em consideração que estas são a causa mais frequente de acidentes no laboratório (ver cap. 4).
- a. As substâncias inflamáveis deverão ser utilizadas longe de fontes de ignição.
  - b. A ventilação é uma das formas mais eficientes de evitar a formação de misturas gasosas inflamáveis. Deverá, sempre que possível, usar os nichos para trabalhar com substâncias inflamáveis. Caso esteja a trabalhar com volumes consideráveis de substâncias inflamáveis, deverá utilizar sempre os nichos.
12. Os cilindros de gás comprimido possuem perigosidade especial e deverão ser tratados como potencialmente explosivos (ver cap. 5).
- a. Os cilindros de gás comprimido deverão estar sempre fixos a uma parede, excepto quanto estiverem a ser transportados.
  - b. A utilização de um cilindro de gás comprimido exige o conhecimento prévio da sua folha MSDS.
13. Todo o equipamento de laboratório só deverá ser utilizado para o fim que foi previsto e de acordo com as instruções do respectivo manual (ver cap. 7).
14. Nos laboratórios de aulas deverão ser implementadas as normas que se apresentam no **anexo 6** (Guia de Segurança dos laboratórios de aulas).

### 3.2.4 Eliminação de resíduos

Conforme se afirmou no início deste guia, é objectivo do programa de gestão/controlo de riscos no Departamento de Química da U.A. providenciar um ambiente saudável para os alunos,



funcionários e visitantes do Departamento de Química, assim como da comunidade em geral e cumprir as leis e regulamentos vigentes no Estado Português. Um dos aspectos chave deste programa relaciona-se com a eliminação apropriada de resíduos químicos.

Como regra, **NÃO É PERMITIDA A ELIMINAÇÃO INTENCIONAL PARA O MEIO AMBIENTE DE RESÍDUOS QUÍMICOS OU DE SUBSTÂNCIAS PERIGOSAS.**

Esta restrição inclui a eliminação de resíduos por qualquer método, como por exemplo a eliminação pelos esgotos, através dos caixotes de lixo ou a evaporação no nicho. O Departamento de Química providenciará a eliminação correcta de todos os resíduos químicos, nomeadamente por contrato com empresas especializadas nessa tarefa.

De forma a atingir os objectivos a que nos propomos, é essencial a adopção de uma política de minimização da produção de resíduos, quer nas actividades de investigação, quer nas actividades de ensino da química. A aplicação de boas práticas de prevenção da poluição ambiental desenvolverá em todos a consciencialização para a gestão correcta de resíduos, facto que certamente todos consideramos de extrema importância.

#### **3.2.4.1 Procedimentos para eliminação de resíduos**

1. Identifique a categoria a que pertencem os resíduos que pretende eliminar.
2. Armazene os resíduos em contentores apropriados. Os contentores deverão ser estanques, de pequeno volume e apropriados para o resíduo em causa. Os solventes deverão ser guardados em recipientes plásticos próprios para solventes e de volume inferior a 5 litros. Dever-se-á evitar a utilização de contentores metálicos.
3. **TODOS** os recipientes contendo resíduos deverão ser devidamente **ETIQUETADOS** (data de início de armazenamento, conteúdo e laboratório). Poderá requisitar no armazém as etiquetas apropriadas para este fim (ver **anexo 4**). A etiqueta da utilização anterior deverá ser completamente removida ou estar completamente ilegível.
4. Os solventes halogenados deverão ser segregados dos solventes não halogenados. Os restantes resíduos líquidos deverão ser segregados destes dois tipos de solventes. Estes solventes deverão ser acondicionados em recipientes plásticos apropriados, devidamente etiquetados. Poderá requisitar no armazém as etiquetas apropriadas para este fim (ver **anexo 4**).
5. O Departamento de Química recicla os seguintes solventes: acetona, clorofórmio, diclorometano, éter de petróleo, etanol, éter etílico e tolueno. Estes solventes, **desde que estejam em condições de ser reciclados**, deverão ser armazenados em recipientes

- apropriados e etiquetados com etiquetas apropriadas (ver **anexo 4**), que poderão ser requisitadas no armazém. Posteriormente, deverão ser entregues na sala de destilações.
6. Existem resíduos químicos que, devido à sua reactividade ou toxicidade não poderão ser eliminados com os solventes. Estes resíduos (sólidos ou líquidos) deverão ser segregados de outros produtos incompatíveis e armazenados até à sua eliminação. Muitas vezes, um tratamento químico apropriado destes resíduos reactivos ou tóxicos poderá resultar na diminuição ou eliminação da sua reactividade e/ou toxicidade. Para instruções mais rigorosas consulte o livro *Prudent Practices for Handling Chemicals in Laboratories* (<http://www.nap.edu/books/0309052297/html/>). Seguidamente apresentam-se alguns exemplos de substâncias não recicláveis que deverão ser segregadas para se proceder à sua eliminação posterior. Esta lista é meramente indicativa. Estude o seu caso particular de forma a encontrar a melhor solução de armazenamento temporário dos seus resíduos. As categorias apresentadas foram designadas de A a K. No entanto, deve haver o cuidado de segregar substâncias diferentes que, sendo da mesma categoria, possam reagir entre elas.
- Contendor A:** Solventes orgânicos não halogenados e soluções de substâncias orgânicas não halogenadas;
- Contendor B:** Solventes orgânicos halogenados e soluções de substâncias orgânicas halogenadas;
- Contendor C:** Resíduos sólidos de compostos orgânicos;
- Contendor D:** Soluções aquosas neutralizadas a pH entre 6-8;
- Contendor E:** Resíduos inorgânicos tóxicos e sais de metais pesados e respectivas soluções;
- Contendor F:** Substâncias tóxicas inflamáveis;
- Contendor G:** Mercúrio e resíduos de sais de mercúrio;
- Contendor H:** Resíduos de metais. Cada metal deve ser acondicionado separadamente;
- Contendor I:** Resíduos sólidos de compostos inorgânicos;
- Contendor K:** Recolha selectiva de vidro, metal e plástico;
7. Estes produtos deverão estar armazenados, seguindo as regras de armazenamento dos produtos químicos (ver **3.2.2**), incluindo as regras de segregação.
8. Devido ao reduzido espaço de armazenamento para estes resíduos no armazém, estes deverão, na medida do possível, ser armazenados nos laboratórios. Excluem-se os

solventes, que poderão ser entregues no armazém. O Conselho Directivo enviará estes resíduos para serem eliminados pelo menos duas vezes por ano (no final do primeiro e do segundo semestre). Caso se justifique, organizar-se-ão outros processos de eliminação.

9. Aquando da entrega dos produtos para destruição, deverá ser entregue no armazém o formulário apropriado devidamente preenchido (**anexo 5**), identificando a natureza dos produtos a destruir.
10. É obrigação de todos usar a menor quantidade possível de substâncias perigosas e de gerar a menor quantidade possível de resíduos perigosos.

### **3.3 Procedimentos padrão para trabalho com produtos carcinogéneos**

#### **a) Identificação e classificação**

Um produto químico é considerado carcinogéneo se:

1. Foi avaliado pela Agência Internacional para Pesquisa do Cancro (International Agency for Research on Cancer, IARC) tendo sido classificado como carcinogéneo ou potencialmente carcinogéneo, ou se
2. A sua folha de segurança (MSDS) assim o indicar.

O IARC avalia o risco carcinogéneo de diversas substâncias em humanos. A lista apresentada no **anexo 7** foi compilada pela IARC e encontra-se dividida em três grupos; grupo 1, Agentes Carcinogéneos: matérias conhecidas como carcinogéneas para humanos (87); grupo 2A, matérias que são prováveis agentes carcinogéneos para humanos (63); grupo 2B, matérias que são possíveis agentes carcinogéneos para humanos (235). Para uma listagem completa e actualizada consulte <http://193.51.164.11/monoeval/grlist.html>. Poderão ainda ser encontradas monografias de alguns destes compostos em <http://193.51.164.11/monoeval/allmonos.html>. Poderá ainda procurar em <http://drambuie.lanl.gov/~esh5/outsidein/Cat1List.html>.

#### **b) Procedimentos no manuseamento**

Actualmente, o Departamento de Química da Universidade de Aveiro não possui instalações apropriadas para o manuseio de substâncias carcinogéneas pelo que, como regra, **NÃO É PERMITIDA A UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS CLASSIFICADOS NO GRUPO 1, AGENTES CARCINOGENOS OU MATÉRIAS CONHECIDAS COMO CARCINOGENAS PARA HUMANOS E NO GRUPO 2A, MATÉRIAS QUE SÃO PROVÁVEIS AGENTES CARCINOGENOS PARA HUMANOS.**

Os docentes que pretendam trabalhar com estas substâncias deverão discutir esta utilização, **previamente à aquisição da referida substância**, com a comissão de segurança. Para o efeito, encontra-se em anexo um formulário (**anexo 8**) que deverá ser completamente preenchido e entregue à comissão de segurança. As normas para utilização destes compostos serão descritas conjuntamente com as substâncias especialmente tóxicas (ver **3.5**).

As substâncias classificadas como **Grupo 2B** apenas poderão ser manuseadas no nicho, devendo o operador proteger-se utilizando o equipamento protector adequado. Estas substâncias deverão ser armazenadas em locais bem ventilados. Qualquer derrame deverá ser imediatamente comunicado ao coordenador de segurança do grupo a que pertence. Apesar de não ser necessária autorização para trabalhar com estes compostos, os alunos deverão preencher **COMPLETAMENTE** o formulário de pedido de autorização para cada produto (sim, incluindo o clorofórmio) e entregá-lo à comissão de segurança.

### **3.4 Procedimentos padrão para trabalho com produtos embriotóxicos**

Seguidamente apresenta-se uma lista parcial de compostos embriotóxicos que se poderão encontrar num laboratório de química. Esta lista é meramente indicativa. É obrigação dos alunos, em conjunto com o docente responsável, avaliar as condições particulares e as substâncias que fazem parte do seu trabalho.

#### **Lista parcial de compostos embriotóxicos**

---

acrylic acid	aniline	benzene
cadmium	carbon disulfide	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
dimethylformamide	dimethyl sulfoxide	diphenylamine
formaldehyde	formamide	glycol ethers
hexachlorobenzene	iodoacetic acid	lead compounds
mercury compounds	nitrobenzene	nitrous oxide
phenol	toluene	vinyl chloride
xylene		

---

Os compostos embriotóxicos deverão ser manuseadas de acordo com as normas indicadas em **3.5**. Por razões óbvias não é permitido a grávidas, em nenhuma circunstância, trabalhar com estes compostos.

### 3.5 Procedimentos padrão para trabalho com produtos especialmente tóxicos (PETs)

Para efeitos deste manual consideram-se tóxicas e muito tóxicas as substâncias nas seguintes doses:

<b>Via de exposição</b>	<b>Tóxica</b>	<b>Muito tóxica</b>
<b>Oral</b> LD <sub>50</sub> (ratos albinos)	50-500 mg/kg	<50 mg/kg
<b>Contacto com a pele</b> LD <sub>50</sub> (coelhos albinos)	200-1000 mg/kg	<200 mg/kg
<b>Inalação</b> LD <sub>50</sub> (ratos albinos)	200-2000 ppm/ar	<200 ppm/ar

Nesta designação incluem-se ainda todas as **substâncias radioactivas** e **material biológico que possa estar contaminado com vírus, fungos ou bactérias patogénicas**.

Seguidamente, apresenta-se uma lista parcial de compostos especialmente tóxicos que se poderão encontrar num laboratório de química. Esta lista é meramente indicativa. É obrigação dos alunos, em conjunto com o docente responsável, avaliar as condições particulares e as substâncias que fazem parte do seu trabalho.

#### **Lista parcial de compostos especialmente tóxicos**

acrolein	acrylic acid	acrylonitrile
allyl alcohol	allylamine	bromine
chlorine	diazomethane	diborane (gas)
1,2-dibromoethane	dimethyl sulfate	ethylene oxide
hydrazine	hydrogen cyanide	hydrogen fluoride
hydrogen sulfide	methyl fluorosulfonate	methyl iodide
nickel carbonyl	nitrogen dioxide	osmium tetroxide
ozone	phosgene	sodium azide
cyanide salts		

Adicionalmente às indicações fornecidas na secção **3.2** para o manuseio de substâncias perigosas, todos aqueles que manuseiem pequenas quantidades de substâncias especialmente perigosas, incluindo substâncias carcinogénicas, deverão cumprir as normas que se seguem. Devido ao facto do DQUA não possuir instalações apropriadas para o manuseio destas substâncias, em caso algum será autorizada a sua utilização em quantidades maiores.

- 1. A utilização de PETs no Departamento de Química da Universidade de Aveiro só será permitida após autorização do Presidente do Conselho Directivo.**

2. Antes de proceder à aquisição de PETs, os docentes que pretendam trabalhar com estas substâncias deverão discutir a sua utilização com a comissão de segurança. Para o efeito, existe em anexo um formulário (**anexo 8**) que deverá ser completamente preenchido e entregue à comissão de segurança.  
Este formulário deverá ser preenchido mesmo no caso de estas substâncias já terem sido adquiridas e/ou já terem sido utilizadas em ocasiões anteriores.
3. Antes de proceder à aquisição de PETs, deverá consultar atentamente a sua MSDS e outra literatura apropriada de forma a informar-se das suas propriedades e cuidados especiais a ter no seu manuseio.
4. A manipulação de PETs deverá, sempre que possível, ser efectuada numa câmara de fluxo laminar vertical possuindo os filtros apropriados e em sala de acesso restrito.
5. Caso tal não seja possível, no caso de manipulação de quantidades muito reduzidas, poderá ser excepcionalmente autorizada a sua utilização em nichos ou, caso se justifique, caixas de luvas.
  - a. Neste caso, deverá ser escolhido um nicho que se encontre num local pouco movimentado.
  - b. Durante a realização experimental e até à descontaminação da área (utilizando os procedimentos adequados), este nicho será utilizado **EXCLUSIVAMENTE** para este trabalho.
  - c. Deverá ser afixado na área de trabalho com PETs um dístico com informação da natureza do trabalho a ser realizado.
6. Apenas poderão trabalhar com PETs as pessoas indicadas no formulário de pedido de autorização.
7. Durante a manipulação de PETs dever-se-á actuar de forma a evitar derrames e outros acidentes. A superfície de trabalho deve ser revestida com um material não absorvente que permita a sua limpeza de forma eficiente. Dever-se-á trabalhar sempre com a mínima quantidade possível de PETs.
8. Todos os que trabalham com PETs deverão ter cuidado adicional com a limpeza da área de trabalho e com a sua higiene pessoal.
9. Todos os resíduos de PETs deverão ser convenientemente acondicionados, colocados em recipientes secundários inquebráveis e rotulados contendo a seguinte informação “**PRODUTO ESPECIALMENTE TÓXICO**”.

10. Todos os PETs deverão ser convenientemente acondicionados, colocados em recipientes secundários inquebráveis e armazenados em locais de acesso restrito.

### **3.6 Procedimentos padrão para trabalho com produtos potencialmente explosivos**

Produtos potencialmente explosivos são substâncias que se decompõem com libertação de grandes quantidades de gases e calor quando sujeitos a condições de choque mecânico, elevação de temperatura ou acção química. São necessárias precauções especiais para a utilização, em segurança, de produtos potencialmente explosivos. É obrigação dos alunos, em conjunto com o docente responsável, avaliar as condições particulares e as substâncias que fazem parte do seu trabalho, assim como desenvolver e adoptar os procedimentos padrão adequados para o trabalho envolvendo produtos potencialmente explosivos. Geralmente, o trabalho com estes compostos exige a utilização de equipamento de protecção pessoal especial.

Os peróxidos orgânicos encontram-se entre as substâncias mais perigosas que são manuseadas nos laboratórios de investigação. Como classe, estes compostos são explosivos de pequeno poder de projecção, mas perigosos, uma vez que são muito sensíveis ao choque, faíscas e até à fricção. Os cuidados a observar com esta classe de compostos serão tratados no Cap. 4. Seguidamente apresentam-se algumas situações que, mais amiúde, originam explosões em laboratórios de investigação:

1. Compostos acetilénicos, explosivos em misturas de 2,5-80% com o ar. A pressões superiores a 2 atmosferas o acetileno, quando sujeito a descargas eléctricas ou a temperaturas elevadas decompõe-se com violência. Os acetiletos, quando secos, podem decompor-se com violência ao menor choque. Muitos acetiletos são explosivos sensíveis ao choque.
2. O cloreto de alumínio deverá ser considerado uma substância potencialmente perigosa. Em contacto com a humidade poderá ocorrer decomposição suficiente (gerando HCl) para gerar uma pressão considerável. Se um recipiente estiver aberto há muito tempo, deverá ser reaberto apenas depois de o envolver numa toalha.
3. O amoníaco reage com o iodo dando origem ao triiodeto de azoto, que é explosivo. Reage ainda com os hipocloritos dando origem a cloro. As misturas de amoníaco com haletos orgânicos reagem, por vezes violentamente, quando aquecidos sob pressão.
4. O peróxido de benzoílo seco pode sofrer ignição facilmente e é sensível ao choque podendo decompor-se espontaneamente a temperaturas acima dos 50°C.

5. O dissulfureto de carbono é muito tóxico e muito inflamável. Quando misturado com o ar, os seus vapores podem incendiar-se com um banho de vapor, uma placa quente ou uma lâmpada acesa.
6. O cloro pode reagir violentamente quando em contacto com hidrogénio ou com hidrocarbonetos, quando exposto à luz solar.
7. O diazometano e compostos relacionados deverão ser manipulados com extrema cautela. São compostos muito tóxicos e os seus gases ou soluções podem explodir espontaneamente. Segundo este ponto de vista, as soluções etéreas são mais seguras.
8. O dimetilsulfóxido decompõe-se violentamente quando em contacto com uma variedade de compostos halogenados. Também têm sido assinaladas explosões quando em contacto com hidretos metálicos.
9. Os etéres dietílico, diisopropílico e outros (em especial os ramificados) poderão explodir durante o aquecimento ou quando em refluxo devido à presença de peróxidos (ver cap. 4).
10. Foram assinaladas explosões quando se aqueceu óxido de etileno em recipientes fechados. Experiências em que se utilize o óxido de etileno sob pressão necessitam de autorização prévia da comissão de segurança.
11. Os compostos halogenados como clorofórmio, tetracloreto de carbono e outros solventes halogenados não deverão ser secos com sódio, potássio ou outros metais, uma vez que, nestas condições, geralmente ocorrem explosões violentas.
12. O peróxido de hidrogénio em concentrações superiores a 3% pode ser perigoso; em contacto com a pele poderá causar queimaduras graves. O peróxido de hidrogénio em concentrações superiores a 30% poderá decompor-se violentamente quando em presença de ferro, cobre, crómio ou outros metais ou os seus sais.
13. As “traps” de azoto líquido abertas para a atmosfera condensam rapidamente o ar. Quando o azoto é retirado, ocorre um aumento da pressão, ocorrendo normalmente uma explosão com violência suficiente para estilhaçar vidro. Apenas recipientes selados ou sob vazio deverão ser arrefecidos.
14. O hidreto de lítio e alumínio não deverá ser utilizado para desidratar ésteres metálicos ou tetra-hidrofurano uma vez que muito frequentemente este procedimento ocasiona incêndios. Existem registos de que os produtos de reacção do hidreto de lítio e alumínio com o dióxido de carbono são explosivos. Os incêndios causados por esta substância deverão ser extintos com areia.



15. Já resultaram explosões devido ao contacto de oxigénio sob elevada pressão com óleo lubrificante. Nunca use qualquer lubrificante nas conexões a uma garrafa de oxigénio.
16. O ozono é um gás muito reactivo e tóxico. Forma-se por acção da luz ultravioleta sobre o oxigénio (ar) e, desta forma, poderá ser necessário trabalhar no nicho com algumas fontes de luz ultravioleta. O ozono na forma líquida ou sólida é explosivo.
17. O paládio ou a platina em carbono, o óxido de platina, o níquel “Raney” e outros catalisadores deverão ser filtrados com muito cuidado das misturas provenientes das reacções de hidrogenação catalítica. O catalisador recuperado encontra-se normalmente saturado com hidrogénio sendo muito reactivo e pode incendiar-se espontaneamente quando em contacto com o ar. Outro perigo envolvido no trabalho com estes catalisadores ocorre quando se adiciona mais catalisador a um recipiente que já contém hidrogénio.
18. O uso de percloratos deverá ser evitado, sempre que possível. Estes não deverão ser utilizados como agentes desidratantes sempre que houver o perigo de contacto com compostos orgânicos, ou na presença de ácidos desidratantes com força suficiente para concentrar o ácido perclórico a valores superiores a 70%. O ácido perclórico poderá ser aquecido, com segurança, a temperaturas na ordem dos 200°C; no entanto, o contacto do ácido em ebulição ou do seu vapor com matéria orgânica, ou mesmo com matéria inorgânica facilmente oxidável originará explosões violentas. Nunca se deve colocar o ácido perclórico em contacto com substâncias oxidáveis. Deve-se utilizar sempre o ácido perclórico no nicho. Este deverá ser limpo semanalmente (incluindo o tubo de ventilação) para evitar a ocorrência de explosões espontâneas.
19. Os permanganatos são explosivos quando em contacto com ácido sulfúrico.
20. Os peróxidos de bário, sódio e potássio, quando em contacto com material combustível, são explosivos de fácil ignição.
21. O fósforo (branco e vermelho) forma misturas explosivas quando em contacto com agentes oxidantes. O fósforo branco deverá ser armazenado imerso em água, uma vez que é espontaneamente inflamável quando exposto ao ar. A reacção do fósforo com hidróxidos aquosos dá origem à fosfina que poderá explodir ou incendiar-se espontaneamente quando exposta ao ar.
22. O tricloreto de fósforo reage com a água para dar origem ao ácido fosforoso que, sob aquecimento, se decompõe em fosfina que poderá explodir ou incendiar-se. Dever-se-á

- ter muito cuidado quando se abrem recipientes contendo tricloreto de fósforo. As amostras que possam ter estado expostas à humidade não deverão ser aquecidas.
23. Os resíduos resultantes da destilação sob vácuo poderão explodir quando o sistema é trazido à pressão atmosférica. Estas explosões poderão ser evitadas utilizando azoto para o efeito ou deixando o sistema arrefecer antes de o trazer à pressão atmosférica ou ainda fazendo-o muito lentamente.
24. O sódio metálico deverá ser guardado mergulhado em óleo mineral ou tolueno. Pequenos resíduos de Na ou K deverão ser destruídos por reacção com o álcool butílico ou metanol (informe-se sobre o procedimento apropriado). Dever-se-á evitar o contacto do Na com a água uma vez que este, nestas condições, reage violentamente quando exposta ao ar
25. O potássio metálico é normalmente mais reactivo do que o sódio, entrando rapidamente em ignição quando exposto ao ar húmido e, portanto, deverá ser manipulado mergulhado em óleo mineral ou tolueno. Apenas deve cortar este metal com superfícies livres de agentes oxidáveis, pois poderão ocorrer explosões.
26. O ácido *m*-cloroperbenzóico deverá ser sempre armazenado em recipientes plásticos apropriados. Quando puro e armazenado em recipientes de vidro, poderá explodir.

### 3.7 Produtos químicos incompatíveis

Como se indicou em 3.2.2.1, no laboratório existem produtos químicos que são incompatíveis, não podendo por isso ser transportados, utilizados, armazenados ou eliminados em conjunto. Estas substâncias, quando em contacto, poderão originar explosões sérias ou a formação de substâncias altamente tóxicas e/ou inflamáveis. Seguidamente apresenta-se uma lista de incompatibilidades com maior probabilidade de existirem no laboratório. Esta lista é meramente indicativa. Os MSDS de cada substância apresentarão as incompatibilidades para cada caso específico.

#### Lista parcial de reagentes incompatíveis

Acetileno	cloro, bromo, cobre, prata, flúor e mercúrio.
Acetona (propanona)	misturas de ácido nítrico e sulfúrico concentrados.
Ácido acético ou anidrido acético	ácidos crómico, nítrico, perclórico, peróxidos e permanganatos.
Ácido cianídrico	ácido nítrico, bases.

Ácido crómico e óxido de crómio (VI)	ácido acético, naftaleno, glicerol, álcoois e outros líquidos inflamáveis.
Amónia	mercúrio, cloro, hipoclorito de cálcio, iodo, bromo e ácido fluorídrico.
Anilina	ácido nítrico, peróxido de hidrogénio.
Bromo	amónia, acetileno, butadienos, butano, benzeno e metais finamente divididos.
Carvão activado	hipoclorito de cálcio.
Cloratos	sais de amónio, ácidos, pós metálicos, enxofre, compostos orgânicos finamente divididos.
Cloro	amónia, acetileno, butadienos, butano e outros gases de petróleo, hidrogénio, benzeno e metais finamente divididos.
Cobre	acetileno, peróxido de hidrogénio.
Flúor	isolar de tudo.
Hidrazina	peróxido de hidrogénio, ácido nítrico e outros oxidantes.
Metais alcalinos e alcalinoterrosos	dióxido de carbono, tetracloreto de carbono e outros organoclorados. (Evite também o uso de água, espumas ou pó químico seco no combate a fogos provocados por estes compostos - deve-se usar areia seca).
Nitrato de amónio	ácidos, metais em pó, líquidos inflamáveis, cloratos, nitritos, enxofre, compostos orgânicos finamente divididos.
Óxido de cálcio	água.
Óxido de cloro	amónia, metano, fosfina e sulfeto de hidrogénio.

### 3.8 Considerações finais/responsabilidades

1. O supervisor e/ou o investigador principal devem certificar-se que todos os que trabalham no laboratório conhecem e cumprem as disposições que constam deste guia.
2. Todos os que trabalham no laboratório devem manter-se vigilantes relativamente a práticas ou condições inseguras no laboratório. Todas as anormalidades deverão ser transmitidas imediatamente ao supervisor e/ou ao investigador principal. O supervisor e/ou o investigador principal deverão corrigir imediatamente estas situações.
3. O coordenador de segurança do grupo de investigação tem a obrigação de:
  - a. Assegurar-se que todos os que trabalham nos laboratórios do seu grupo de investigação receberam as informações que constam deste guia.
  - b. Assegurar-se que todos os dispositivos de segurança funcionam correctamente.
  - c. Realizar inspecções periódicas à área de armazenamento do grupo.
  - d. Supervisionar a correcta eliminação dos resíduos dos laboratórios.
4. Todos os que trabalham em laboratórios de investigação do Departamento de Química têm a obrigação de:

- a. se informar sobre as práticas operacionais seguras em laboratórios de química.
- b. cumprir as normas operacionais de segurança em laboratórios de química.
- c. evitar a contaminação de qualquer área do edifício com substâncias perigosas.

## 4. Substâncias Inflamáveis e Solventes Orgânicos

### 4.1 Introdução

Das substâncias perigosas encontradas nos nossos laboratórios, sem dúvida que as inflamáveis estão entre as mais comuns. Substâncias inflamáveis são materiais que pegam fogo facilmente e ardem ao ar. No entanto, um líquido inflamável não arde; são os vapores do líquido que ardem. A proporção de vapores inflamáveis que os diferentes líquidos produzem depende da sua pressão de vapor, que aumenta com a temperatura. O grau do perigo de incêndio também depende da capacidade de formação de misturas combustíveis ou explosivas com o ar, da facilidade de ignição dessas misturas, da densidade do líquido relativamente à água, assim como do gás em relação ao ar.

Um frasco de éter etílico aberto em cima da bancada e colocado ao lado de um bico de Bunsen inflama, enquanto um frasco de ftalato de dietilo nas mesmas condições, não inflama. Esta diferença de comportamento deve-se ao facto do éter etílico ter um ponto de ignição muito mais baixo. O ponto de ignição é a temperatura mais baixa, determinada por testes padrão, à qual um líquido dá origem ao vapor em concentração suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar, junto à superfície do líquido dentro do tubo de teste.

Como se pode ver pela tabela seguinte, muitos produtos químicos comuns apresentam pontos de ignição inferiores à temperatura ambiente, o que os torna potencialmente perigosos.

Solvente	Ponto de Ignição (°C)	Solvente	Ponto de Ignição (°C)
Acetato de etilo	-4	Éter etílico	-45
Acetona	-18	Hexano	-22
Benzeno	-11	Metanol	11
Ciclo-hexano	-20	Pentano	-49
Dissulfureto de carbono	-30	THF	-21
Etanol	13	Tolueno	4

No manuseamento de substâncias inflamáveis, deverão ser seguidas as seguintes precauções básicas:

1. As substâncias inflamáveis devem ser manuseadas apenas em áreas livres de fontes de ignição. Além da chama, as fontes de ignição incluem equipamento eléctrico (motores,

em particular), electricidade estática e, para determinados materiais (como o dissulfureto de carbono), mesmo superfícies aquecidas.

2. Nunca aquecer uma substância inflamável com uma chama.
3. A ventilação é uma das formas mais efectivas para prevenir a formação de misturas inflamáveis. Qualquer transferência, aquecimento em contentores abertos ou qualquer outro manuseamento de substâncias inflamáveis, devem ser feitos dentro de nichos com exaustão adequada.

Em geral, quando se fala do perigo associado aos solventes orgânicos, a inflamabilidade e/ou a toxicidade são as propriedades mais evidenciadas. Mas muitos solventes também são extremamente irritantes para a pele e para as mucosas. Na tabela seguinte estão resumidas algumas das propriedades mais importantes de alguns solventes comuns.

Nome	p.e. (°C)	Inflamabilidade	Toxicidade
Acetato de etilo	77	alta	baixa
Acetona	57	muito alta	baixa
Acetonitrilo	82	muito alta	alta
Ácido acético	118	baixa	baixa
Água	100	-	-
Benzeno	80	muito alta	muito alta
Clorofórmio	61	muito alta	alta
Diclorometano	40	muito alta	média
DMF	153	média	alta
DMSO	189	baixa	baixa
Etanol	79	alta	baixa
Éter de petróleo	40-60	muito alta	baixa
Éter etílico	35	muito alta	média
Metanol	65	alta	alta
Piridina	115	média	muito alta
Tetracloroeto de carbono	77	muito alta	alta
Tolueno	110	muito alta	muito alta

## 4.2 Transporte de solventes

Todos os solventes devem ser transportados nos carrinhos disponíveis no Departamento de Química.

### 4.3 Armazenamento no laboratório

Obrigatoriamente, todos os frascos de solventes presentes no laboratório devem estar rotulados, sem esquecer a data de chegada ao laboratório e de abertura do frasco (ver 3.2.2). Este procedimento é especialmente importante no caso de solventes que formem peróxidos (ver 4.4).

**Os solventes devem ser armazenados nos armários** disponíveis para esse fim, em cada laboratório. Sempre que existam armários à prova de fogo, devem ser usados para o armazenamento dos solventes dentro do laboratório. Os solventes não devem ser armazenados nos armários por baixo dos nichos. Os éteres não devem ser armazenados no laboratório durante períodos longos (ver 4.5).

Alguns solventes, como o benzeno e o tetracloreto de carbono, são muito tóxicos (ver tabela anterior) e, portanto, deverão ser manuseados como se indica em 3.3.

### 4.4 Peróxidos

Muitos solventes e reagentes comuns são conhecidos por formar peróxidos quando expostos ao ar. As classes de compostos conhecidas por formar peróxidos por auto-oxidação incluem:

1. Aldeídos, incluindo o acetaldeído e o benzaldeído.
2. Éteres com grupos alquilo primários e/ou secundários (éter dietílico, éter diisopropílico, dioxano, THF, por exemplo). O álcool isopropílico também pode dar origem à formação de peróxidos durante o armazenamento.
3. Hidrocarbonetos com hidrogénios alílicos, benzílicos ou propargílicos. Como exemplos desta classe de precursores de peróxidos podem citar-se o ciclo-hexeno, o cicloocteno, o metilacetileno (propino), o isopropilbenzeno (cumeno) e a tetralina (tetra-hidronaftaleno).
4. Compostos com ligações duplas e triplas conjugadas, dos quais o butadieno e o divinilacetileno são exemplos particularmente perigosos.
5. Hidrocarbonetos saturados com hidrogénios terciários como a decalina (deca-hidronaftaleno) e o 2,5-dimetil-hexano.

Os compostos pertencentes às classes apresentadas não dão origem à formação de peróxidos sem a presença de oxigénio (ou outros oxidantes). Logo, ao guardar estes materiais é aconselhável encher o contentor com um gás inerte como azoto ou árgon antes de o selar.

Os peróxidos orgânicos devem ser segregados de todas as outras classes de compostos, especialmente materiais combustíveis inflamáveis. Regra geral, os peróxidos não devem ser armazenados durante períodos longos.

Alguns dos peróxidos usados no Departamento de Química da UA são compostos comercialmente disponíveis, como os ácidos *m*-cloroperoxibenzóico e peroxiacético, o peróxido de hidrogénio ou o hidroperóxido de *t*-butilo.

Os peróxidos, em geral, são irritantes para o tracto respiratório, pele e olhos. As soluções de peróxido de hidrogénio a 30%, frequentemente usadas no laboratório, raramente apresentam problemas de inalação. Além disso, não apresentam perigo de explosão, mas a contaminação destas soluções ou de soluções mais concentradas pode iniciar a sua decomposição violenta.

Os éteres reagem lentamente com o oxigénio com formação de peróxidos explosivos. A exposição ao ar e à luz acelera o processo. Nunca se deve tentar abrir frascos contendo éteres líquidos (i.e. éter diisopropílico) que apresentem material cristalizado. Os cristais de peróxido podem acumular-se no fundo do contentor, nas paredes de vidro, no gargalo e a evaporação pode mesmo causar acumulação de peróxidos no exterior da tampa ou da rolha de vidro do contentor.

Os peróxidos são menos voláteis do que os éteres, facto que faz com que a destilação ou evaporação do éter possa resultar na concentração dos peróxidos. Se a destilação for demasiado extensa, pode daí resultar uma explosão. A presença de peróxidos pode ser testada por agitação de uma amostra do éter com uma solução acidificada de KI. Na presença de peróxidos, forma-se iodo, facilmente detectável na presença de amido.

Os peróxidos podem ser eliminados por agitação com uma solução de sulfato ferroso ou de sulfito de sódio. A adição de sódio metálico ao contentor previne a acumulação de peróxidos. Em certos casos poderá ser mais apropriado adicionar ao contentor um inibidor da reacção de oxidação como a hidroquinona ou o BHT (2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol). Os contentores devem ser sempre devidamente selados e datados.

#### **4.5 Destilação**

A presença de peróxidos deve ser testada em solventes velhos e em éteres (sugestão: usar papel indicador de amido-KI) antes de estes serem destilados. É importante saber que, ao remover os estabilizadores dos solventes por destilação, a formação de peróxidos durante o armazenamento destes será mais rápida. A destilação de uma substância com a qual não está familiarizado deve ser experimentada primeiro numa pequena quantidade. Nunca destile essa substância até à secura.



Certifique-se que a montagem não fica completamente fechada. Tenha cuidado quando destilar substâncias que solidificam próximo da temperatura ambiente de modo a que o condensador e eventualmente as ligações ao sistema de vácuo não fiquem obstruídas.

No caso de destilação ou evaporação a pressão reduzida, faça primeiro o vácuo e verifique eventuais fugas antes de dar início ao aquecimento. Não use chamas como fonte de calor. Nunca sujeite a montagem a mudanças bruscas de pressão. No fim da destilação deixe primeiro arrefecer antes de admitir, suavemente, ar para o sistema. Não use balões de fundo plano na destilação a pressão reduzida.

#### **4.6 Quantidades de armazenamento**

Dentro do laboratório, a quantidade de frascos contendo solventes deve ser reduzida ao mínimo. Como se indicou em **4.3**, os frascos de solvente devem estar **sempre** armazenados nos armários disponíveis para o efeito (e não no nicho, bancada ou armários por debaixo da bancada). Desta forma, **o limite de armazenamento de solventes orgânicos no laboratório será a capacidade de armazenamento destes armários.**

## 5. Gases

Existem três estados físicos associados aos gases que encontramos em garrafa, a que correspondem os gases comprimidos (não liquefeitos), os gases liquefeitos e os gases dissolvidos.

**GASES COMPRIMIDOS (NÃO LIQUEFEITOS):** Um gás comprimido não liquefeito é um gás que se encontra completamente no estado gasoso a 21 °C, à pressão de carga da garrafa. Azoto, Oxigénio, Ar, Hélio e Hidrogénio são exemplos de gases comprimidos não liquefeitos.

**GASES LIQUEFEITOS:** Um gás liquefeito é um gás parcialmente líquido a 21 °C, à pressão de carga da garrafa. O dióxido de carbono é um exemplo de gás comprimido liquefeito.

**GASES DISSOLVIDOS:** Um gás dissolvido é um gás dissolvido num solvente. O único exemplo actual é o acetileno, geralmente dissolvido em acetona, uma vez que é instável sem um solvente. Os cilindros de acetileno contêm uma matéria porosa impregnada com acetona e na qual o acetileno está dissolvido.

### 5.1 Potenciais perigos associados aos gases comprimidos

**PRESSÃO:** Embora a falência do próprio cilindro de gás seja possível, normalmente os cilindros sofrem ruptura devido a técnicas de enchimento impróprias, à corrosão ou a um incêndio. Quando manipulados convenientemente, a probabilidade de ruptura de cilindros de origem reconhecida é extremamente pequena. No entanto, todos os gases comprimidos devem ser considerados potencialmente perigosos devido à pressão.

**INFLAMABILIDADE:** Hidrogénio, acetileno, metano, são exemplos de gases inflamáveis.

**TOXICIDADE:** A toxicidade dos gases varia entre a toxicidade extrema (causando morte ou danos graves após contacto breve) e a toxicidade ligeira (causando irritação). Cianeto de hidrogénio e fosfénio são dois exemplos de gases tóxicos.

**ASFIXIA:** A asfixia ocorre quando um gás substitui o ar e reduz a concentração de oxigénio respirável. Os gases que colocam maiores riscos de asfixia incluem o azoto e o argón.

**OXIDANTES:** Os gases oxidantes são aqueles que suportam a combustão, normalmente com intensidade muito superior do que acontece ao ar. Oxigénio, óxido nitroso e cloro são exemplos de gases oxidantes.

### 5.2 Identificação das garrafas de gases comprimidos por cores

As cores das ogivas das garrafas de gás fornecidas pela SPAL (Sociedade Portuguesa do Ar Líquido) eram definidas pelas normas francesas NFX 08-106 e NFX 08-107. As novas cores

das ogivas das garrafas de gás estão definidas pela Norma EN 1089-3: 1997. Esta norma estabelece um novo sistema de cores para identificação do risco associado ao conteúdo da garrafa de gás. A aplicação desta norma far-se-á ao longo de 10 anos até Maio de 2006 e, durante estes 10 anos, as novas cores coexistirão com as antigas. As principais cores de perigo constantes desta norma europeia são:

AMARELO: Tóxico e/ou corrosivo.

VERMELHO: Inflamável.

AZUL: Oxidante.

VERDE: Inerte.

Os gases com cores específicas são: azoto, oxigénio, árgon, hélio, dióxido de carbono, hidrogénio, acetileno. Na tabela seguinte estão exemplificadas as cores de algumas ogivas de garrafas de gás. As cores antigas exemplificadas na tabela dizem respeito às utilizadas pela SPAL.

Gás	Cor antiga (possível até 2006)	Cor nova (única a partir de 2006)
Acetileno	Castanho-Avermelhado	Castanho-Avermelhado
Amoníaco	Verde	Amarelo
CO <sub>2</sub>	Cinzento	Cinzento
Árgon	Amarelo	Verde escuro
AR	Branco e Preto	Verde
AR medicinal	Branco e Preto	Branco e Preto (garrafa branca)
N <sub>2</sub>	Preto	Preto
O <sub>2</sub>	Branco	Branco
H <sub>2</sub>	Vermelho	Vermelho
He	Castanho	Castanho

### 5.3 Regras básicas para armazenar e utilizar os gases com segurança

No armazenamento e utilização de garrafas de gases devem observar-se algumas regras importantes:

- A localização, abertura e transporte das garrafas de gases no DQUA deverá seguir as normas indicadas no **anexo 9**.
- As normas de utilização das redes de acetileno e de hidrogénio encontram-se descritas nos **anexos 10 e 11**, respectivamente.
- Armazenar apenas o número de garrafas necessário para o funcionamento contínuo, sem quebras, dos trabalhos a decorrer no DQ,

- d) Armazenar os gases num local fresco, arejado e de acesso restrito,
- e) Amarrar todas as garrafas à parede, de modo firme,
- f) Retirar o selo da válvula apenas na altura de utilização,
- g) Usar apenas os equipamentos aprovados pelo fornecedor. Usar materiais compatíveis com o gás,
- h) Segregar as garrafas vazias das cheias,
- i) Tratar as garrafas vazias como se estivessem cheias. Não esquecer que uma garrafa vazia nunca está completamente vazia,
- j) Nunca usar óleo ou outra gordura nas ligações ou equipamentos para gases,
- k) Nunca usar adaptadores,
- l) Usar um sistema eficaz de detecção de fugas,
- m) Não esquecer que as válvulas devem ser fechadas, mesmo para as garrafas vazias,
- n) Nunca retirar o capacete de uma garrafa, porque ele protege a válvula,
- o) As válvulas foram concebidas para ser manobradas à mão, nunca com uma chave,
- p) Nunca reapertar uma ligação sob pressão,
- q) Na abertura de uma garrafa, o operador deve colocar-se sempre fora da trajectória de ejeção do manoredutor,
- r) Deve sempre consultar a ficha de segurança do produto.

#### **5.4 Líquidos criogénicos e dióxido de carbono sólido**

Existem vários riscos associados à manipulação de substâncias criogénicas, nomeadamente azoto, árgon, hélio, oxigénio e dióxido de carbono, gases liquefeitos. No Departamento de Química utilizam-se actualmente azoto, hélio e dióxido de carbono e são esses que merecerão especial atenção neste documento.

O azoto e o hélio (gases liquefeitos refrigerados) podem originar:

**ASFIXIA** por substituição do oxigénio do ar. Os sintomas podem incluir perda de conhecimento e motricidade. A vítima pode não ter percepção da asfixia. Ventile imediatamente a área e retire a vítima da área contaminada, caso não corra o risco de também se tornar uma vítima. Mantenha a vítima quente e em repouso e num local ventilado. Peça assistência médica. Aplique a respiração artificial se a vítima parar de respirar.

**QUEIMADURAS** por contacto do líquido com a pele. Lave a área afectada imediata e abundantemente com água durante pelo menos 15 minutos e contacte a assistência médica.

ENREGELAMENTO devido à temperatura do material, cerca de  $-200^{\circ}\text{C}$ . Molhe a área afectada com água, pelo menos durante 15 minutos e coloque uma compressa esterilizada. Contacte a assistência médica.

Em caso de fuga accidental, deve evacuar a área, usar roupa de protecção, utilizar equipamento de respiração autónoma quando entrar na área, assegurar adequada ventilação, tentar eliminar a fuga ou derrame, impedir a entrada do produto em esgotos, fossas, caves ou qualquer outro lugar onde a sua acumulação possa ser perigosa.

O dióxido de carbono (gás liquefeito) pode originar:

INTOXICAÇÃO em atmosfera com mais de 2% de  $\text{CO}_2$ , ocorrendo desmaio em atmosfera a partir de 7% de dióxido de carbono. Os sintomas podem incluir perda de conhecimento e motricidade. A vítima pode não ter percepção da asfixia. Ventile imediatamente a área e retire a vítima da área contaminada, caso não corra o risco de também se tornar uma vítima. Mantenha a vítima quente e em repouso e num local ventilado. Peça assistência médica. Aplique a respiração artificial se a vítima parar de respirar.

QUEIMADURAS por contacto do líquido ou do sólido com a pele. Lave imediata e abundantemente com água, durante pelo menos 15 minutos. Contacte a assistência médica.

Em caso de fuga accidental, deve evacuar a área, utilizar equipamento de respiração autónoma quando entrar na área, assegurar adequada ventilação, tentar eliminar a fuga ou derrame, impedir a entrada do produto em esgotos, fossas, caves ou qualquer outro lugar onde a sua acumulação possa ser perigosa.

## **6. Equipamento de Laboratório**

### **6.1 Equipamento de funcionamento em regime contínuo**

Todo o equipamento (científico ou outro) que necessite de ficar ligado permanentemente ou por períodos prolongados sem assistência necessita de permissão apropriada. Esta deve ser solicitada à comissão de segurança utilizando o formulário apropriado (**anexo 12**). Este procedimento tem como objectivo o registo das pessoas responsáveis pelo funcionamento do equipamento de forma a poderem ser contactadas em caso de acidente. Esta permissão deverá ser renovada caso seja necessário alterar alguma da informação que conste no registo.

Existe outro tipo de equipamentos que, pela sua natureza, se subentende que funcionam em contínuo. Neste grupo engloba-se outro equipamento de natureza não específica como frigoríficos, arcas congeladoras, máquinas de gelo, faxes e computadores. Todos os equipamentos deste tipo têm permissão para estar ligados em contínuo. No entanto, caso seja necessário efectuar algum procedimento específico ou alertar alguém em particular no caso de avaria ou acidente, poderá preencher também o formulário.

### **6.2 Equipamento de funcionamento ocasional fora do horário normal**

Neste item inclui-se o equipamento que, ocasionalmente, seja necessário deixar ligado fora do horário normal de funcionamento do Departamento de Química, como liofilizadores, sistemas de destilação, desionizadores e bombas de vácuo. Como norma, o seu funcionamento sem a presença do operador deverá ser evitado. Contudo, em caso de necessidade, a sua utilização será permitida após autorização por escrito do docente responsável. O funcionamento dos equipamentos referidos neste item deve ser assinalado através de um aviso (**anexo 13**) colocado em local visível junto ao equipamento. O formulário apropriado encontra-se também na pasta de segurança do laboratório.

### **6.3 Funcionamento do equipamento de laboratório.**

Todo o equipamento de laboratório só deverá ser utilizado para o fim que foi previsto e de acordo com as instruções do respectivo manual. Este facto pressupõe que os utilizadores possuem os conhecimentos necessários sobre o equipamento que vão operar. Seguidamente apresentam-se algumas instruções sobre o modo de funcionamento de algum equipamento que se poderá encontrar num laboratório de química. Estas instruções são meramente indicativas. É

obrigação dos alunos, em conjunto com o docente responsável, avaliar as condições particulares de funcionamento dos equipamentos que fazem parte do seu trabalho.

### **Centrífugas**

As centrífugas são equipamentos que podem facilmente sofrer danos se não forem operados correctamente. Nunca tente parar uma centrífuga com a mão. Contrabalance sempre o mais rigorosamente possível a carga na centrífuga para evitar vibrações que podem pôr em perigo o rotor e a segurança do utilizador. Deixe a centrífuga limpa; a corrosão pode danificar seriamente o rotor.

### **Frigoríficos**

Os reagentes e amostras mantidos em frigoríficos devem estar bem rolhados e etiquetados de modo indelével como se indica em **3.2.2**.

Não guarde no frigorífico compostos que se possam incendiar ou explodir por acção de faíscas.

Em nenhuma circunstância se devem guardar alimentos ou bebidas para consumo humano nos frigoríficos dos laboratórios.

### **Estufas**

Nos laboratórios de investigação e ensino existem estufas específicas para secagem de material e para reagentes. As estufas para secagem de material identificam-se pela porta totalmente em vidro e só devem ser usadas para material previamente limpo. A temperatura destas estufas ronda os 50°C e não deve ser aumentada pois o material graduado de vidro sofre alterações drásticas acima desta temperatura.

Os reagentes e amostras colocadas em estufas devem estar bem acondicionados e identificados de maneira clara, indicando o conteúdo, o nome do investigador e a data.

Nunca altere a temperatura de uma estufa sem antes se certificar que isso não vai afectar outras amostras que lá se encontrem. Não coloque na estufa produtos que possam contaminar outros que já lá se encontrem ou que possam danificar o revestimento interno daquela ou, ainda, que libertem vapores tóxicos ou desagradáveis. Quando em dúvida consulte o seu supervisor. Lembre-se que uma estufa não é um armário, por isso não guarde aí indefinidamente as suas amostras.

### **Mantas de aquecimento**

Quando trabalhar com uma manta de aquecimento **NUNCA:**

- encha um balão com ele inserido na manta,
- coloque ou retire o balão enquanto a manta estiver ligada,
- toque no equipamento ou no balão enquanto estiver em operação,
- cubra a manta com ela ligada,
- use recipientes que sejam condutores eléctricos.

No caso de quebra do balão ou se se espalhar o seu conteúdo, **NÃO** toque na manta. Desligue imediatamente da corrente e espere que arrefeça. A manta deve ser meticulosamente limpa e seca antes de ser reutilizada.

### **Sistemas de vácuo**

Todos os sistemas de vácuo devem ser considerados fontes de risco devido ao perigo de implosão. Os recipientes de vidro sujeitos ao vácuo devem estar protegidos por um ecrã, fita adesiva envolvente ou rede plástica. Todo o material de vidro a ser sujeito a vácuo deve ser meticulosamente inspeccionado relativamente a defeitos ou rachas que possam pôr em causa a sua resistência.

Evite mudanças bruscas de pressão.

Ao usar exsiccadores não os assente em superfícies duras; use sempre uma toalha para esse fim.

Use uma “trap” nos sistemas de vácuo. Se a fonte de vácuo for uma bomba, use uma “trap” arrefecida que deve ser esvaziada depois de usada e antes de atingir a temperatura ambiente. Tenha em atenção o perigo de explosão nas “traps” arrefecidas contendo gases condensados (ar e ozono).

### **Equipamento de vidro**

Todo o equipamento de vidro deverá ser meticulosamente inspeccionado antes de ser utilizado de forma a identificar possíveis falhas. Esta inspecção é sobretudo importante no caso do equipamento ser sujeito a aquecimento ou a variações de pressão. Neste caso, todo o equipamento que apresente deficiências deverá ser rejeitado. No caso de se sujeitar o equipamento de vidro a variações de pressão é importante revesti-lo com fita isoladora de forma



a conter os fragmentos de vidro no caso de ocorrer uma implosão. O equipamento de vidro partido deverá ser colocado em recipientes apropriados para esse fim. Caso o equipamento seja recuperável, deverá ser minuciosamente lavado antes de o entregar na oficina de vidro.

## 7. Acesso ao Edifício e aos Laboratórios

### 7.1 Horário normal de funcionamento

Para efeitos de regulamentação de segurança, o **horário normal** de funcionamento do Departamento de Química é das **9.00 às 18.00 horas** de segunda a sexta-feira. No entanto, as aulas teóricas ou práticas que se realizem fora deste horário serão consideradas como funcionando no horário normal de funcionamento. Não é autorizada a presença de alunos de pós-graduação no Departamento de Química, sem a presença de um docente, após as 24:00 horas.

### 7.2 Trabalho fora do horário normal de funcionamento

O trabalho a realizar fora do horário normal de funcionamento deverá ser classificado pelo aluno, conjuntamente com o docente responsável, em uma de três categorias:

- a) Categoria 1- Leitura, escrita ou utilização de instrumentos que se considerem não colocar em risco o seu operador (por exemplo, UV, IR, GC, polarímetro, medidor pH, espectrómetro de massa, RMN, instrumentação electroquímica, etc).
- a) Categoria 2- Qualquer trabalho de laboratório que não envolva a utilização de substâncias tóxicas ou potencialmente explosivas nem grandes quantidades de solventes orgânicos. Sempre que tiver dúvidas consulte o seu supervisor.
- b) Categoria 3- Qualquer trabalho de laboratório que envolva a utilização de substâncias tóxicas ou potencialmente explosivas ou grandes quantidades de solventes orgânicos.

O trabalho de categoria 1 poderá ser realizado a qualquer hora pois não representa qualquer risco.

O trabalho de categoria 2 poderá ser realizado até às 23:30 horas, recomendando-se, no entanto, que esteja terminado antes das 22:00 horas.

O trabalho de categoria 3 não poderá, sob nenhuma circunstância, ser realizado fora do horário normal de funcionamento. Qualquer excepção a esta norma deverá ser previamente discutida com o docente responsável e com a comissão de segurança.

### 7.3 Regulamentação para trabalho que decorra fora do horário normal de funcionamento

- a) Após as **20:00 horas**, **todos** os elementos que entrem ou se encontrem no interior do Departamento de Química **devem registar a sua presença** no livro que se encontra

junto ao gabinete do fiel de armazém, na entrada Este do departamento, escrevendo o seu nome, hora de entrada e o local onde se encontram ou dirigem, bem como assinar e registar a hora de saída.

- b) Quando o trabalho decorre fora do horário normal de funcionamento e é de categoria 2, é obrigatória a presença de, pelo menos, mais uma pessoa no departamento, que de preferência se encontre perto do laboratório onde decorre a experiência. Esta pessoa deverá ser devidamente alertada para a ocorrência de experiências fora de horas no departamento e deverá notificar, antes de sair, o elemento que se encontra a trabalhar.
- c) Toda e qualquer operação laboratorial tem que ser registada no caderno de laboratório para que, em caso de acidente e/ou impedimento do responsável pela experiência, qualquer outra pessoa possa, fácil e rapidamente, saber quais os produtos químicos envolvidos.

#### **7.4 Experiências que decorrem sem acompanhamento**

- a) Apenas experiências classificadas como categoria 1 ou 2 poderão ser realizadas sem acompanhamento, desde que o docente responsável assim o autorize.
- b) Todas as experiências que decorrem sem acompanhamento deverão ser realizadas nos nichos onde deverá ser afixado um aviso com nome, contacto, detalhes da experiência e assinatura legível de um docente (**anexo 13**). Este formulário deverá ser arquivado no caderno de segurança do laboratório.
- c) Apenas as experiências de categoria 1 poderão, caso seja necessário, ser realizadas fora do nicho. Também para estas experiências deverá ser afixado um aviso, tal com se indica em b).
- d) As inundações são, na maior parte das ocasiões, evitáveis. Todas as ligações com tubos deverão ser fixas (com braçadeira ou fitas próprias de plástico). Os tubos deverão ainda estar bem fixos nos lavatórios.

## **8. Regras Adicionais e Informações**

### **8.1 Pasta de segurança do laboratório**

Nas salas de apoio aos laboratórios de aulas e de investigação existe uma pasta de segurança do laboratório. Nesta pasta encontra um exemplar do guia de segurança e todos os formulários de segurança. Adicionalmente, como se indicou em **3.1.2**, deverão ser anexadas as MSDS de **TODAS** as substâncias que se encontram no laboratório. A manutenção desta pasta é da responsabilidade do coordenador de segurança do grupo de investigação e de aulas.

### **8.2 Campo magnético dos espectrómetros de RMN**

Todas as pessoas que possuam “pacemakers” ou próteses metálicas deverão estar afastadas, pelo menos, 4,6 m dos magnetes dos RMN.

### **8.3 Contaminação com mercúrio metálico**

O mercúrio é considerado uma substância muito tóxica. Os vapores de mercúrio, uma vez inalados, depositam-se nos pulmões, passando depois para a corrente sanguínea e sendo transportados para diversos órgãos do corpo humano. A sua acção tóxica faz-se sentir, predominantemente, no sistema nervoso central, apesar de os rins, fígado e outros órgãos também poderem sofrer da sua acção tóxica. Uma vez que o mercúrio é um metal pesado, quando contamina o ambiente, a sua acção faz-se sentir por longos períodos de tempo uma vez que continuará a vaporizar-se. Quando a temperatura ambiente diminui, condensa-se formando uma superfície invisível. Deve-se notar que não é necessário o derrame de grande quantidade de mercúrio para que se ultrapasse os valores máximos admitidos para a concentração atmosférica. Devido a este facto, é importante ter todo o cuidado de forma a evitar o derrame de mercúrio, principalmente proveniente de termómetros partidos.

Em caso de derrame de mercúrio, por quebra de um termómetro ou por outra razão, proceda do seguinte modo:

1. Tente reduzir o derrame ao mínimo. É importante evitar que o mercúrio contamine o chão e/ou as bancadas do laboratório.
2. Utilizando uma pipeta Pasteur, aspire o máximo possível de mercúrio.
3. Contacte a Dr.<sup>a</sup> Dulce Helena (tel. 23518) que, utilizando um Kit apropriado, procederá à descontaminação da área afectada e providenciará a correcta eliminação dos resíduos.

#### 8.4 Selecco de luvas

A selecco apropriada de luvas para as tarefas a realizar no laboratório é um factor importante para a segurança pessoal. O uso de luvas apropriadas providencia a proteco de substâncias químicas prejudiciais, mas uma escolha incorrecta do material com que  manufacturada a luva poderá promover uma falsa sensao de segurança. Os produtos químicos podem atravessar as luvas como resultado de um dano aparente das luvas mas também poderão difundir-se através delas sem a existência de qualquer dano aparente. A utilizao de luvas permeáveis aos químicos em utilizao poderá agravar o risco de acidente pois, neste caso, a luva prolongar o contacto com a pele além de a humidade e calor aumentarem a permeabilidade da pele.

De uma forma geral, pode-se indicar o seguinte tipo de luvas consoante o grupo de compostos químicos a manipular:

- Neopreno: Resistente a ácidos minerais, ácidos orgânicos, substâncias cáusticas, álcoois e solventes apolares.
- Nitrilo: Resistente a cetonas, álcoois, substâncias cáusticas e ácidos orgânicos.
- Borracha Natural: Resistente a cetonas, álcoois, substâncias cáusticas e ácidos orgânicos.
- PVC: Resistente a ácidos minerais, substâncias cáusticas, ácidos orgânicos e álcoois.
- PVA: Resistente a solventes clorados, solventes apolares e aromáticos.

Seguidamente apresenta-se uma tabela com alguns produtos químicos e os tipos de luvas a utilizar. Esta tabela é meramente indicativa. Estude o seu caso particular e consulte o fornecedor das luvas, uma vez que as suas características variam consoante o fabricante.

<b>Chemical</b>	<b>Neoprene</b>	<b>Latex or rubber</b>	<b>Butyl</b>	<b>Nitrile latex</b>
Acetic acid	VG	VG	VG	VG
*Acetone	G	VG	VG	P
Ammonium hydroxide	VG	VG	VG	VG
Aniline	G	F	F	P
*Benzaldehyde	F	F	G	G
*Benzene	P	P	P	F
Carbon disulfide	F	F	F	F

*Carbon tetrachloride	F	P	P	G
*Chloroform	G	P	P	P
Chromic acid (50%)	F	P	F	F
Citric acid (10%)	VG	VG	VG	VG
*Dichloromethane	P	P	P	P
Dimethylformamide	F	F	G	G
*Ethyl acetate	G	F	G	F
Ethyl alcohol	VG	VG	VG	VG
*Ethyl ether	VG	G	VG	G
Formaldehyde	VG	VG	VG	VG
Formic acid	VG	VG	VG	VG
Hexane	F	P	P	G
Hydrochloric acid	VG	G	G	G
Hydrofluoric acid (48%)	VG	G	G	G
Hydrogen peroxide (30%)	G	G	G	G
Ketones	G	VG	VG	P
Maleic acid	VG	VG	VG	VG
Methyl alcohol	VG	VG	VG	VG
Naphthalene	G	F	F	G
*Nitric acid	G	F	F	F
Nitric acid, red and white fuming	P	P	P	P
Oxalic acid	VG	VG	VG	VG
Perchloric acid (60%)	VG	F	G	G
Phenol	VG	F	G	F
Phosphoric acid	VG	G	VG	VG
Potassium hydroxide	VG	VG	VG	VG
Sodium hydroxide	VG	VG	VG	VG
Sulfuric acid	G	G	G	G
Tetrahydrofuran	P	F	F	F
*Toluene	F	P	P	F
*Xylene	P	P	P	F

\*Limited Service

VG = Very Good; G = Good; F = Fair; P = Poor (not recommended)

## 9. Referências

Este manual foi escrito recorrendo a material divulgado na Internet. Existem inúmeros locais que possuem informação de óptima qualidade e que deverão ser consultados sempre que surgir qualquer dúvida. Apresenta-se seguidamente uma listagem dos locais mais utilizados na elaboração deste manual. Estas moradas poderão ser também consultadas na página do Departamento de Química da Universidade de Aveiro ([www.dq.ua.pt](http://www.dq.ua.pt)) em páginas com interesse ([www.dq.ua.pt/index\\_pag.htm](http://www.dq.ua.pt/index_pag.htm)).

Guias de segurança de outras Universidades:

<http://www.chem.sc.edu/faculty/morgan/safety/> University of South Carolina Department of Chemistry & Biochemistry Safety Information

<http://www.tlchm.bris.ac.uk/safety/safehome.htm> School of Chemistry, University of Bristol Safety Manual

<http://www.chem.yale.edu/safety/safetymanual.html> Chemistry Safety Manual - Yale University

<http://www.chem.duke.edu/safety/> Department of Chemistry Lab Safety Manual, Duke University

<http://www.stanford.edu/dept/EHS/> Department of Environmental Health and Safety, Stanford University

<http://www.carleton.ca/ehs/lsm1.htm> Laboratory Health and Safety Manual, Carleton University

<http://www.orcbs.msu.edu/> Office of Radiation, Chemical & Biological Safety, Michigan State University

<http://www.inform.umd.edu/CampusInfo/Departments/EnvirSafety/> Environmental Safety, University of Maryland

<http://crystal.biol.csufresno.edu:8080/~joyce/safety/manual/manual.htm> Chemistry department Health and Safety Manual, California State University, Fresno

<http://ehs.ucdavis.edu/chem/> University of California, Davis, EH&S Chemical-Laboratory Safety

<http://www.montana.edu/wwwsrn/chem.html> Montana State University - Bozeman

Bases de dados com informação relativa a segurança:

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/> SIS, National Library of Medicine Chemical Structure Searching Server

<http://toxnet.nlm.nih.gov/> TOXNET (Toxicology Data Network)

<http://www.atsdr.cdc.gov/hazdat.html> Agency for Toxic Substances and Disease Registry Database

MSDS:

[http://dir.yahoo.com/Health/Workplace/Material\\_Safety\\_Data\\_Sheets\\_\\_MSDS\\_/](http://dir.yahoo.com/Health/Workplace/Material_Safety_Data_Sheets__MSDS_/) Yahoo! Health Workplace Material Safety Data Sheets (MSDS)

<http://www.yale.edu/oehs/msds.htm> Material Safety Data Sheets (MSDS) on the WWW

<http://www.ilpi.com/msds/index.html> Where to find MSDS on the Internet

Organizações:

<http://www.absa.org/> American Biological Safety organization

<http://www.nohsc.gov.au/> National Occupational Health & Safety Commission, Commonwealth Australia

<http://osha.eu.int/ew2001/> European Agency for Safety and Health at Work

<http://www.pp.okstate.edu/ehs/> OSU Environmental Health and Safety

<http://tis.eh.doe.gov/> Environmental, Safety and Health Information Portal

<http://www.atsdr.cdc.gov/cx.html> Agency for Toxic Substances and Disease Registry

<http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/> International Labour Organization

Locais comerciais, mas com informação relevante:

<http://www.bandj.com/Home.html> Honeywell Burdick & Jackson

<http://www.c-f-c.com/charts/chemchart.htm> Incompatibility Chart of Common Laboratory Chemicals

Seleção de Luvas:

<http://www.ehs.cornell.edu/ochs/toptengloves.htm> Glove selection at Cornell University

[http://tis.eh.doe.gov/docs/osh\\_tr/ch5c.html](http://tis.eh.doe.gov/docs/osh_tr/ch5c.html) Department of energy(DOE) OSH

Outros:

<http://www.nap.edu/books/0309052297/html/> Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals

<http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/glossary.html> Chemical Safety Information – Glossary

[http://www.idict.gov.pt/\\_frames/legislfrseg.htm](http://www.idict.gov.pt/_frames/legislfrseg.htm) Instituto de Desenvolvimento e Inspeção das Condições de Trabalho – legislação

<http://cc.ysu.edu/eohs/bulletins/index.htm> Safety bulletins- Youngstown State University

Links:

<http://biochemlinks.com/bclinks/safety.cfm> BioChemLinks Lab Safety

<http://www.absa.org/resources/resource.htm> Biosafety Resources on the Internet

[http://www.chemsafety.gov/chemlinks/post.cfm?drill\\_down=1&group1=30](http://www.chemsafety.gov/chemlinks/post.cfm?drill_down=1&group1=30) CSB - Chemlinks

<http://www.pp.okstate.edu/ehs/links/labchem.htm> OSU Environmental Health and Safety, Laboratory and Chemical Safety



## 10. Anexos

## Anexo 1. Classificação de substâncias perigosas e simbologia.

<b>Classe 1 - Explosivos</b>		
	descrição	exemplos
1.1	Perigo de explosão maciça.	TNT, Nitroglicerina.
1.2	Perigo de explosão com projecção.	
1.3	Perigo de incêndio e explosão, mas com pequena projecção.	
1.4	Substâncias que apresentam pequeno perigo de explosão	
1.5	Substâncias que apresentam perigo de explosão, mas que são pouco sensíveis.	
<b>Classe 2 Gases</b>		
subclasse	descrição	exemplos
2.1	<b>Gases inflamáveis</b> , que estão comprimidos, liquefeitos ou dissolvidos sob pressão.	Acetileno, hidrogénio, metano
2.2	<b>Gases não tóxicos e não inflamáveis.</b>	Azoto, dióxido de carbono, hélio Óxido nítrico comprimido, Oxigénio comprimido.
2.2 (e risco 5.1)	<b>Gases oxidantes.</b>	
2.3	<b>Gases tóxicos.</b>	Dióxido de enxofre, cloro.
<b>Classe 3 Líquidos inflamáveis</b>		
subclasse	descrição	exemplos
3PG I & II	<b>Líquidos muito inflamáveis</b> Líquidos com pontos de ignição <21 °C	Acetona, éter etílico.  Anisol, cumeno, etilenodiamina.  Nitrobenzeno, ciclo--hexanona, acetofenona, álcool benzílico. Glicerina.
3PG III	<b>Líquidos inflamáveis</b> Líquidos com pontos de ignição entre 21 °C e 55 °C	
C1	<b>Líquidos combustíveis</b> com pontos de ignição entre 55 °C e 150 °C	
C2	<b>Líquidos combustíveis</b> com pontos de ignição acima de 150 °C	
<b>Classe 4 Sólidos inflamáveis, substâncias combustíveis espontaneamente e substâncias perigosas quando molhadas.</b>		
subclasse	descrição	exemplos
4.1	Sólidos inflamáveis.	Magnésio, alumínio.
4.2	Substâncias passíveis de combustão espontânea.	Fósforo branco, sódio metálico.
4.3	Substâncias que, em contacto com a água, emitem gases inflamáveis.	Zinco em pó, sódio metálico.

**Classe 5 Agentes oxidantes e peróxidos orgânicos**

subclasse	descrição	exemplos
5.1	Substâncias oxidantes	Hipoclorito de cálcio, peróxido de hidrogénio, cloro.
5.2	Peróxidos orgânicos	Peróxido de <i>t</i> -butilo, peróxido de benzoílo.

**Classe 6 Substâncias tóxicas e infecciosas.**

subclasse	descrição	exemplos
6.1	Produtos venenosos ou tóxicos que podem causar danos graves ou morte por inalação, deglutição ou contacto com a pele.	Cianeto de potássio, Isocianatos, pesticidas.
6.2	Substâncias infecciosas	Algumas vacinas, culturas de células patogénicas, vírus.



**Classe 7 Substâncias radioactivas.****Classe 8 Corrosivos.**

	descrição	exemplos
	Corrosivos (ácidos)	Ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico.
	Corrosivos (bases)	Hidróxido de sódio, amoníaco.

**Classe 9 Bens perigosos diversos.**

	descrição	exemplos
	Produtos diversos de baixo risco	Gelo seco

Símbolos e indicadores de perigo aprovados pela UE (1999)

<p><b>E</b></p>  <p>Explosivo</p>	<p><b>O</b></p>  <p>Oxidante</p>
<p><b>F</b></p>  <p>Muito inflamável</p>	<p><b>F+</b></p>  <p>Extremamente inflamável</p>
<p><b>T</b></p>  <p>Tóxico</p>	<p><b>T+</b></p>  <p>Muito tóxico</p>
<p><b>Xn</b></p>  <p>Nocivo</p>	<p><b>Xi</b></p>  <p>Irritante</p>
<p><b>C</b></p>  <p>Corrosivo</p>	<p><b>N</b></p>  <p>Perigoso para o ambiente</p>

## Anexo 2. Lista de frases de risco e segurança usadas com substâncias perigosas

As frases seguintes foram adoptadas pela directiva do Conselho da Comunidade Europeia 67/548/EC e pela Portaria n.º 732-A/96

### SÍMBOLOS E INDICAÇÕES DE PERIGO DAS SUBSTÂNCIAS E PREPARAÇÕES PERIGOSAS

Natureza dos riscos específicos atribuídos às substâncias e preparações perigosas:

- R 1 Explosivo no estado seco.
- R 2 Risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
- R 3 Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição.
- R 4 Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis.
- R 5 Perigo de explosão sob a acção do calor.
- R 6 Perigo de explosão com ou sem contacto com o ar.
- R 7 Pode provocar incêndio.
- R 8 Favorece a inflamação de matérias combustíveis.
- R 9 Pode explodir quando misturado com matérias combustíveis.
- R 10 Inflamável.
- R 11 Facilmente inflamável.
- R 12 Extremamente inflamável.
- R 14 Reage violentamente em contacto com a água.
- R 15 Em contacto com a água liberta gases extremamente inflamáveis.
- R 16 Explosivo quando misturado com substâncias comburentes.
- R 17 Espontaneamente inflamável ao ar.
- R 18 Pode formar mistura vapor-ar explosiva/inflamável durante a utilização.
- R 19 Pode formar peróxidos explosivos.
- R 20 Nocivo por inalação.
- R 21 Nocivo em contacto com a pele.
- R 22 Nocivo por ingestão.
- R 23 Tóxico por inalação.
- R 24 Tóxico em contacto com a pele.
- R 25 Tóxico por ingestão.
- R 26 Muito tóxico por inalação.
- R 27 Muito tóxico em contacto com a pele.
- R 28 Muito tóxico por ingestão.
- R 29 Em contacto com a água liberta gases tóxicos.
- R 30 Pode-se tornar facilmente inflamável durante o uso.
- R 31 Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.
- R 32 Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.
- R 33 Perigo de efeitos cumulativos.
- R 34 Provoca queimaduras.
- R 35 Provoca queimaduras graves.
- R 36 Irritante para os olhos.
- R 37 Irritante para as vias respiratórias.
- R 38 Irritante para a pele.
- R 39 Perigos de efeitos irreversíveis muito graves.
- R 40 Possibilidades de efeitos irreversíveis.
- R 41 Risco de graves lesões oculares.
- R 42 Pode causar sensibilização por inalação.
- R 43 Pode causar sensibilização em contacto com a pele.
- R 44 Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado.
- R 45 Pode causar cancro.
- R 46 Pode causar alterações genéticas hereditárias.
- R 48 Riscos de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada.
- R 49 Pode causar cancro por inalação.
- R 50 Muito tóxico para os organismos aquáticos.
- R 51 Tóxico para os organismos aquáticos.
- R 52 Nocivo para os organismos aquáticos.

R 53 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

R 54 Tóxico para a flora.

R 55 Tóxico para a fauna.

R 56 Tóxico para os organismos do solo.

R 57 Tóxico para as abelhas.

R 58 Pode causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente.

R 59 Perigoso para a camada de ozono.

R 60 Pode comprometer a fertilidade.

R 61 Risco durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.

R 62 Possíveis riscos de comprometer a fertilidade.

R 63 Possíveis riscos durante a gravidez de efeitos indesejáveis na descendência.

R 64 Pode causar danos nas crianças alimentadas com leite materno.

Combinação das frases R

R 14/15 Reage violentamente com a água libertando gases extremamente inflamáveis.

R 15/29 Em contacto com a água liberta gases tóxicos e extremamente inflamáveis.

R 20/21 Nocivo por inalação e em contacto com a pele.

R 20/22 Nocivo por inalação e ingestão.

R 20/21/22 Nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 21/22 Nocivo em contacto com a pele e por ingestão.

R 23/24 Tóxico por inalação e em contacto com a pele.

R 23/25 Tóxico por inalação e ingestão.

R 23/24/25 Tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 24/25 Tóxico em contacto com a pele e por ingestão.

R 26/27 Muito tóxico por inalação e em contacto com a pele.

R 26/28 Muito tóxico por inalação e ingestão.

R 26/27/28 Muito tóxico por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 27/28 Muito tóxico em contacto com a pele e por ingestão.

R 36/37 Irritante para os olhos e vias respiratórias.

R 36/38 Irritante para os olhos e pele.

R 36/37/38 Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele.

R 37/38 Irritante para as vias respiratórias e pele.

R 39/23 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação.

R 39/24 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele.

R 39/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por ingestão.

R 39/23/24 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e em contacto com a pele.

R 39/23/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e ingestão.

R 39/24/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele e por ingestão.

R 39/23/24/25 Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 39/26 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação.

R 39/27 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele.

R 39/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por ingestão.

R 39/26/27 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e em contacto com a pele.

R 39/26/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação e ingestão.

R 39/27/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves em contacto com a pele e por ingestão.

R 39/26/27/28 Muito tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 40/20 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação.

R 40/21 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis em contacto com a pele.

R 40/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por ingestão.

R 40/20/21 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação e em contacto com a pele.

R 40/20/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação e ingestão.

R 40/21/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis em contacto com a pele e por ingestão.

R 40/20/21/22 Nocivo: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.

R 42/43 Pode causar sensibilização por inalação e em contacto com a pele.

R 48/20 Nocivo: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.

R 48/21 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele.

R 48/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por ingestão.

R 48/20/21 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e em contacto com a pele.

R 48/20/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.  
R 48/21/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele e por ingestão.  
R 48/20/21/22 Nocivo: risco de efeitos para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 48/23 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação.  
R 48/24 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele.  
R 48/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por ingestão.  
R 48/23/24 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e em contacto com a pele.  
R 48/23/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.  
R 48/24/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada em contacto com a pele e por ingestão.  
R 48/23/24/25 Tóxico: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação, em contacto com a pele e por ingestão.  
R 50/53 Muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.  
R 51/53 Tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.  
R 52/53 Nocivo para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático.

Conselhos de prudência relativos a substâncias e preparações perigosas:

S 1 Guardar fechado à chave.  
S 2 Manter fora do alcance das crianças.  
S 3 Guardar em lugar fresco.  
S 4 Manter fora de qualquer zona de habitação.  
S 5 Manter sob ...(líquido apropriado a especificar pelo produtor).  
S 6 Manter sob ...(gás inerte a especificar pelo produtor).  
S 7 Manter o recipiente bem fechado.  
S 8 Manter o recipiente ao abrigo da humidade.  
S 9 Manter o recipiente num local bem ventilado.  
S 12 Não fechar o recipiente hermeticamente.  
S 13 Manter afastado de alimentos e bebidas, incluindo os dos animais.  
S 14 Manter ao abrigo de...(matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).  
S 15 Manter afastado do calor.  
S 16 Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - não fumar.  
S 17 Manter afastado de matérias combustíveis.  
S 18 Manipular e abrir o recipiente com prudência.  
S 20 Não comer nem beber durante a utilização.  
S 21 Não fumar durante a utilização.  
S 22 Não respirar as poeiras.  
S 23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis [termo(s) apropriado(s) a indicar pelo produtor].  
S 24 Evitar o contacto com a pele.  
S 25 Evitar o contacto com os olhos.  
S 26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.  
S 27 Retirar imediatamente todo o vestuário contaminado.  
S 28 Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com...(produtos adequados a indicar pelo produtor).  
S 29 Não deitar os resíduos no esgoto.  
S 30 Nunca adicionar água a este produto.  
S 33 Evitar acumulação de cargas electrostáticas.  
S 35 Não se desfazer deste produto e do seu recipiente sem tomar as precauções de segurança devidas.  
S 36 Usar vestuário de protecção adequado.  
S 37 Usar luvas adequadas.  
S 38 Em caso de ventilação insuficiente, usar equipamento respiratório adequado.  
S 39 Usar um equipamento protector para a vista/face.  
S 40 Para limpeza do chão e objectos contaminados por este produto, utilizar...(a especificar pelo produtor).  
S 41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos.

S 42 Durante as fumigações/pulverizações usar equipamento adequado [termo(s) adequado(s) a indicar pelo produtor].

S 43 Em caso de incêndio, utilizar...(meios de extinção a especificar pelo produtor. Se a água aumentar os riscos, acrescentar «Nunca utilizar água»).

S 45 Em casos de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

S 46 Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.

S 47 Conservar a uma temperatura que não exceda...°C (a especificar pelo produtor).

S 48 Manter húmido com...(material adequado a especificar pelo produtor).

S 49 Conservar unicamente no recipiente de origem.

S 50 Não misturar com...(a especificar pelo produtor).

S 51 Utilizar somente em locais bem ventilados.

S 52 Não utilizar em grandes superfícies nos locais habitados.

S 53 Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.

S 56 Eliminar este produto e o seu recipiente, enviando-os para local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.

S 57 Utilizar um recipiente adequado para evitar a contaminação do ambiente.

S 59 Solicitar ao produtor/fornecedor informações relativas à sua recuperação/reciclagem.

S 60 Este produto e o seu recipiente devem ser eliminados como resíduos perigosos.

S 61 Evitar a libertação para o ambiente. Obter instruções específicas/fichas de segurança.

S 62 Em caso de ingestão, não provocar o vómito. Consultar imediatamente um médico e mostrar-lhe a embalagem ou o rótulo.

Combinação das frases S

S 1/2 Guardar fechado à chave e fora do alcance das crianças.

S 3/7 Conservar em recipiente bem fechado em lugar fresco.

S 3/9/14 Conservar em lugar fresco e bem ventilado ao abrigo de...(matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).

S 3/9/14/49 Conservar unicamente no recipiente de origem, em lugar fresco e bem ventilado ao abrigo de ... (matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).

S 3/9/49 Conservar unicamente no recipiente de origem, em lugar fresco e bem ventilado.

S 3/14 Conservar em lugar fresco ao abrigo de...(matérias incompatíveis a indicar pelo produtor).

S 7/8 Conservar o recipiente bem fechado e ao abrigo da humidade.

S 7/9 Manter o recipiente bem fechado em local bem ventilado.

S 7/47 Manter o recipiente bem fechado e conservar a uma temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor).

S 20/21 Não comer, beber ou fumar durante a utilização.

S 24/25 Evitar o contacto com a pele e os olhos.

S 29/56 Não deitar os resíduos no esgoto, eliminar este produto e o seu recipiente, enviando-os para local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.

S 36/37 Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.

S 36/37/39 Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para a vista/face adequados.

S 36/39 Usar vestuário de protecção e equipamento protector para a vista/face adequados.

S 37/39 Usar luvas e equipamento protector para a vista/face adequados.

S 47/49 Conservar unicamente no recipiente de origem a temperatura que não exceda ...°C (a especificar pelo produtor).



## Anexo 3. Exemplo de um MSDS

# Ficha de segurança

De acordo com a directiva EC 91/155/EEC  
02.2001 do CD-ROM 2001/1 P Data da emissão: 14.11.2000

### 1. Identificação da substância/preparação e da sociedade/empresa

*Identificação da substância/preparação*

No. de catálogo: 102431

Nome do produto: Clorofórmio puríss. DAB 9

*Identificação da sociedade/empresa*

Empresa: Merck KGaA \* 64271 Darmstadt \* Germany \* Tel: +49 6151 72-2440

No.Telefone de Emergência: INEM, Centro de Informação Anti-Venenos, Rua Infante D. Pedro, 8

1749-075 Lisboa \* Tel.(01)79501 43/44/46

### 2. Composição/informação sobre os componentes

No.-CAS: 67-66-3 No.-Index-CE: 602-006-00-4

Massa molar: 119.38 g/mol No.-CE: 200-663-8

Fórmula molecular:

(Hill)

CHCl<sub>3</sub>

### 3. Identificação dos perigos

Nocivo por ingestão. Irritante para a pele. Possibilidades de efeitos irreversíveis. Nocivo: risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.

### 4. Primeiros socorros

Após a inspiração: Exposição ao ar fresco. Eventualmente, respiração artificial ou ventilação com aparelhagem apropriada. Manter livres as vias respiratórias.

Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.

Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, mantendo a pálpebra aberta (durante pelo menos 10 minutos). Chamar um oftalmologista.

Depois de engolir: Cuidado em caso de vômito. Perigo de aspiração!

Laxante: Sulfato de sódio (1 colher de sopa / 1/4 litro de água). Administração posterior de: Carvão activado (20-40 g, numa suspensão a 10 %). Chamar um médico.

Indicações para o médico: Lavagem gástrica.

### 5. Medidas de combate a incêndios

Meios adequados de extinção:

Adaptar ao meio ambiente.

Riscos especiais:

Não combustível. Possibilidade de formação de fumos perigosos em case de incêndio nas zonas próximas. Em caso de incêndio pode formar-se: cloreto de hidrogénio.

Equipamento especial de protecção para o combate ao incêndio:

Permanência na área de perigo só com roupa de protecção apropriada e com uma máscara de oxigénio independente do ar ambiente.

Outras informações:

Precipitar com água os vapores que se libertem. Evitar a infiltração da água de extinção nas águas superficiais ou nas águas subterrâneas.

### 6. Medidas a tomar em caso de fugas acidentais

Medidas de protecção para os pessoas:

Não inalar os vapores/aerossóis. Evitar o contacto com a substância. Garantir a ventilação com ar fresco em recintos fechados.

Medidas de protecção do meio ambiente:

Não deixar escapar para a canalização de águas residuais.

Método de limpeza / absorção:

Absorver com um agente higroscópico, p.ex., Chemizorb.. Proceder à eliminação de resíduos.

Limpeza posterior.

## 7. Manuseamento e armazenagem

*Manuseamento:*

Trabalhar com chaminé. Não inalar a substância.

Evitar a formação de vapores/aerossóis.

*Armazenagem:*

Hermeticamente fechado. Em local bem ventilado. À +15°C a +25°C. Acesso permitido só aos técnicos competentes.

## 8. Controlo da exposição/protecção individual

*Parâmetros específicos de controlo*

EC

Nome Clorofórmio

Valor 2 ml/m<sup>3</sup>

10 mg/m<sup>3</sup>

Carcinogénico Categoria C:3 ( substância que causa preocupação para o homem possuindo possíveis efeitos carcinogénicos)

*Regulamento alemão*

MAK Alemanha (máx. conc. para o local de trabalho)

Nome Clorofórmio

Valor 0.5 ml/m<sup>3</sup>

2.5 mg/m<sup>3</sup>

Limite máximo II,1 substancia de reabsorção, classe 2

Carcinogénico cat. 4 sem efeito desde que se observe o valor TLV

Embriotóxico cat. C não se prevê risco mantendo o TLV

Reabsorção da pele Perigo de absorção pela pele

*Equipamento de protecção individual:*

As características dos meios de protecção para o corpo devem ser seleccionadas em função da concentração e da quantidade das substâncias tóxicas de acordo com as condições específicas do local de trabalho. A resistência dos meios de protecção aos agentes químicos deve ser esclarecida junto dos fornecedores.

Protecção respiratória: necessário em caso de formação de vapores/aerossóis. Filtro AX (EN 371).

Protecção dos olhos: necessário

Protecção das mãos: necessário.

Higiene industrial:

Mudar imediatamente a roupa contaminada. Profilaxia cutânea. Depois de terminar o trabalho, lavar as mãos e a cara.

## 9. Propriedades físico-químicas

Forma: líquido

Côr: incolor

Odor: característico

Valor de pH não disponível

Viscosidade dinâmico (20 °C) 0.56 mPa\*s

Temperatura de fusão -63 °C

Temperatura de ebulição ~ 61 °C

Temperatura de ignição não disponível

Ponto de inflamação não disponível

Limites de explosão inferior não disponível  
superior não disponível

Pressão de vapor (20 °C) 211 hPa

Densidade de vapor relativo 4.25

Densidade (20 °C) 1.48 g/cm<sup>3</sup>

Solubilidade em

água (20 °C) 8 g/l

log P(oct): (25 °C) 2 (experimental)

## 10. Estabilidade e reactividade

### *Condições a serem evitadas*

Forte aquecimento.

### *Substâncias a serem evitadas*

metais alcalinos, metais alcalino-terrosos, metais (em forma de pó), compostos peroxidados, flúor, alcoolatos, soluções fortes de hidróxidos alcalinos, cetonas / soluções de hidróxidos alcalinos, hidróxidos alcalinos / álcoois, nitro-compostos orgânicos, amidas alcalinas, oxigénio, oxigénio /soluções de hidróxidos alcalinos, óxido nítrico, compostos hidrogénio/não-metais, bis-(dimetilamino)-dimetil-estanho.

### *Produtos de decomposição perigosa*

em caso de incêndio: vide o capítulo 5°.

### *Estabilizante*

etanol.

### *Outras informações*

sensível à acção do calor, sensível à acção da luz.

## **11. Informação toxicológica**

### *Toxicidade aguda*

LD50 (oral, rato): 908 mg/kg.

LC50 (inalação, rato): 47.7 mg/l /4 h.

LCLo (inalação, humano): 25000 ppm(V) /5 min.

Teste de irritação da pele (coelho): Teste de Draize (irritação da pele): Ligeiras irritações.

Teste de irritação dos olhos (coelho): Teste de Draize (irritação dos olhos): Ligeiras irritações.

### *Toxicidade subaguda a crónica*

O seu potencial cancerígeno requer maior clarificação.

Não se deve temer um efeito tóxico no feto quando o valor limite é respeitado.

Mutagenicidade bacteriana:

Teste de Ames: negativo.

### *Outras informações toxicológicas*

Após a inalação de vapores: tosse, dispneia.

Após absorção. agitação, espasmos, narcose.

Após o contacto com a pele: efeito irritante. Risco de reabsorção cutânea.

Depois do contacto com os olhos: Ligeira irritação. (irritação das mucosas).

Após ingestão: náuseas, vômitos. Efeitos sistémicos:

Depois de longa exposição ao produto: queda da pressão arterial, cefaleias, ataxia (alteração da coordenação motora), queixas gastrointestinais, doenças cardiovasculares.

Outras indicações: Não pode ser excluída: Danos em: fígado, rins.

### *Informação adicional*

O produto deve ser manipulado com as precauções habituais dos produtos químicos.

## **12. Informação ecológica**

Degradação biológica:

Não degradável em água.

Comportamento no meio ambiente:

Distribuição: log P(oct):: 2 (25 °C) (experimental);

Não se prevê um apreciável potencial de bioacumulação (log P o/w 1-3).

Reparte-se preferivelmente no ar. Constante de Henry: 14084 Pa\*m<sup>3</sup>/mol (experimental).

Efeitos ecotóxicos:

Efeitos biológicos: Efeito prejudicial nos organismos aquáticos. Existe perigo para a água potável em caso de penetração em grandes quantidades em solos e/ou aquíferos.

Toxicidade nos peixes:

L.macrochirus LC50: 18 mg/l /96 h; P.promelas LC50: 71 mg/l /96 h; Onchorhynchus mykiss LC50: 18 mg/l /96 h.

Toxicidade em Daphnia:

Daphnia magna CE50: 79 mg/l /48 h.

Toxicidade em bactérias:

lodo activado CE50: 1010 mg/l /3 h; Concentração limite tóxica: Ps.pudita CE5: 125 mg/l /16 h.

Toxicidade em algas:

Concentração limite tóxica: Sc.quadricauda CK5: 1100 mg/l /8 d.

Protozoários: Concentração limite tóxica: E.sulcatum CE5: >6560 mg/l /72 h.

Dados ecológicos adicionais:

CBO: 0.02 g/g;

ThOD: 1346 mg/g;  
Não permita a entrada em águas, águas residuais ou solos!

### **13. Questões relativas à eliminação**

#### *Produto:*

Na União Europeia não existem normas uniformes sobre a eliminação de produtos químicos ou de substâncias residuais. Produtos químicos que dêem origem a substâncias residuais são geralmente considerados como resíduos especiais. A sua eliminação é regulamentada através de leis ou decretos-leis apropriados vigentes nos Estados-membros da União Europeia. Sugerimos que se entre em contacto com a entidade competente (repartição do Estado ou empresa especializada no tratamento de resíduos), que poderá dar informações sobre as medidas de eliminação.

#### *Embalagem:*

Eliminação de acordo com as normas legais. As embalagens contaminadas devem ser tratadas da mesma maneira que a substância correspondente. Caso não existam quaisquer normas legais neste sentido, as embalagens não-contaminadas podem ser tratadas como lixo doméstico normal ou podem ser submetidas a um processo de reciclagem.

### **14. Indicações relativas ao transporte**

Transporte terrestre GGVS, GGVE, ADR, RID

Classificação 6.1/15c

Nome 1888 CHLOROFORM

Transporte fluvial ADN, ADNR

Classificação não testado

Transporte por via marítima IMDG, GGVSee

Classificação 6.1/UN 1888/PG III

Ems: 6.1-0

MFAG: 340

Nome CHLOROFORM

Transporte por via aérea ICAO, IATA

Classificação 6.1/UN 1888/PG III

Nome CHLOROFORM

As informações relativas ao transporte mencionam-se de acordo com a regulamentação internacional e no formato aplicável na Alemanha(GGVS/GGVE). Não estão consideradas possíveis diferenças a nível nacional.

### **15. Informação regulamentada**

#### *Etiquetas de acordo com as Directivas da CE*

Símbolo: Xn Nocivo

Frases R: 22-38-40-48/20/22 Nocivo por ingestão. Irritante para a pele.

Possibilidades de efeitos irreversíveis. Nocivo:

risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e ingestão.

Frases S: 36/37 Usar vestuário de protecção e luvas adequadas.

No.-CE: 200-663-8 Rótulo CE

### **16. Outras informações**

#### *Representante nacional:*

MERCK Lab - Material de Laboratório, SA. \* Rua Alfredo da Silva, 3-C \* P-1300-040 Lisboa \* Tel.:

+351 (21) 3613 500 \* Fax: +351 (21) 3613 666/7

Merck Farma e Quimica, S.A.\* Rua Alfredo da Silva, 3-C \* P-1300-040 Lisboa \*

Tel.: +351 (21) 3613 500 \* Fax: +351 (21) 3613 665

*As indicações baseiam-se no nível actual dos nossos conhecimentos e servem para a caracterização do produto no que se refere às medidas de segurança a tomar. Estas indicações não implicam qualquer garantia de propriedades do produto descrito.*

## Anexo 4. Etiquetas

<b>RESÍDUOS PERIGOSOS</b>	
Data de início de armazenagem	_____
Conteúdo	_____ _____
Laboratório	_____
<b>Mover com cuidado!</b>	
Contém substâncias perigosas ou tóxicas	

<b>RESÍDUOS PERIGOSOS</b>	
Conteúdo	_____ Data _____
Laboratório	_____
Contém substâncias perigosas ou tóxicas	

<b>SOLVENTES PARA RECICLAR</b>	
Data de início de armazenagem	_____
Conteúdo	_____ _____
Laboratório	_____
<b>Mover com cuidado!</b>	
Contém substâncias perigosas ou tóxicas	

<b>PRODUTO QUÍMICO</b>	
Conteúdo	_____ Data _____
Operador	_____ Docente _____
Contém substâncias perigosas ou tóxicas	

## Anexo 5. Formulário de identificação dos produtos a destruir

### Serviço de recolha de resíduos

Departamento de Química, Universidade de Aveiro

*A preencher pelo fiel do armazém*

Entrega n°: \_\_\_\_\_

Data

Contentor n°: \_\_\_\_\_

Armazenamento: \_\_\_\_\_

Data

Laboratório de origem

Entrega no armazém: \_\_\_\_\_

#### Componente principal:

Nome: \_\_\_\_\_ Quantidade \_\_\_\_\_

#### Outros componentes

Nome Quantidade

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

O Docente Responsável

Telefone

\_\_\_\_\_

D.Q

\_\_\_\_\_

Responsável pela segurança:\*

Este registo deve ser preenchido para **todos os resíduos** a eliminar. \*Quando os resíduos a eliminar pertencem às categorias 1, 4, 5 ou 6, exige-se a assinatura do responsável pela segurança.

## Anexo 6. Guia de Segurança do laboratório de aulas



# Universidade de Aveiro

## Departamento de Química

### Normas gerais e procedimentos de segurança

### Guia de Segurança do laboratório de aulas

**Os estudantes devem ler e cumprir as instruções constantes deste documento.**

A **QUÍMICA** é uma ciência experimental e é a variedade e interesse do trabalho de laboratório que a torna tão atractiva para alunos e investigadores. Contudo, as operações realizadas nos laboratórios de química envolvem sempre riscos de acidentes de diversa natureza. Embora não se possam eliminar totalmente os riscos inerentes aos trabalhos ou operações laboratoriais, a exposição de pessoas e bens a situações perigosas pode ser reduzida a um nível mínimo.

De modo a assegurar que ao trabalho laboratorial corresponde uma aprendizagem efectuada em segurança, o Departamento de Química da Universidade de Aveiro elaborou as seguintes regras e procedimentos de segurança que deverá cumprir na íntegra. As regras de segurança estabelecem-se para a segurança de todos, mas dependem do comportamento individual.

1. Não entre no laboratório sem autorização de um docente.
2. Efectue o trabalho experimental como foi indicado. Não faça nada que não seja parte de um procedimento experimental previamente aprovado pelo docente responsável.
3. Prepare-se convenientemente para executar a experiência. Leia e compreenda o protocolo experimental antes de o executar. Siga as instruções do docente responsável. Antes de iniciar uma experiência **certifique-se de que está a par de todos os potenciais perigos**

**dos reagentes (consulte as fichas de segurança dos produtos, ou MSDS, disponíveis no laboratório), produtos e técnicas usadas.** Certifique-se que percebeu o que vai fazer.

4. **Nunca trabalhe sem a supervisão de um docente.** Nunca efectue experiências perigosas sozinho.

5. Use o equipamento de segurança apropriado. **O uso de bata e de óculos de segurança é obrigatório.** Se necessário e de acordo com as instruções do docente responsável, deve ser usado outro equipamento de segurança.

6. **Aprenda a localização do equipamento de segurança** (chuveiros de segurança, extintores, caixas de areia, mantas anti-fogo, etc.).

7. Saiba o que fazer em caso de emergência. **O toque de alarme é considerado o aviso de uma situação de emergência.** Deixe as suas experiências em segurança (desligue tudo o que for possível) saia calmamente e dirija-se para o exterior OESTE (zona do bar).

8. Actue sempre de um modo responsável no laboratório.

9. O corpo deve estar o mais protegido possível, devendo evitar-se roupas largas, sandálias ou tecidos altamente inflamáveis. Nunca deixe que substâncias químicas contactem com a pele.

10. Aperte o cabelo de modo a evitar o contacto com o material ou com os reagentes.

11. Nunca prove qualquer composto químico. O olfacto só deve ser usado se for indicado pelo docente.

12. Desligue as fontes de calor (por exemplo: chamas, placas eléctricas, mantas de aquecimento) quando terminar o seu uso e nunca as abandone quando em uso.

13. **Leia os rótulos com cuidado.** A leitura do rótulo deve ser feita 3 vezes: antes, durante e quando acaba. Da mistura de substâncias químicas podem resultar enganos com consequências imprevisíveis.

14. É proibido fumar, comer ou beber no laboratório.

15. Comunique todos os incidentes ao docente responsável, mesmo os mais pequenos e aparentemente inofensivos.

16. Trate os produtos químicos convenientemente. **Nada vai para o esgoto** (excepto se, e quando, o docente responsável fornecer indicação em contrário). Existem recipientes apropriados para resíduos.

17. Nunca coloque os reagentes não utilizados (sobras) no recipiente original, excepto se o docente responsável fornecer indicação em contrário. Retire apenas o necessário para um recipiente devidamente rotulado e não contamine o restante. Em caso de dúvida consulte o docente responsável.



18. Limpe todos os desperdícios imediatamente. As garrafas e frascos de reagentes devem ser sempre limpos, caso o seu conteúdo tenha escorrido pelas paredes. Isto inclui a água. **Mantenha o local de trabalho limpo e arrumado.**

19. Nunca leve nada de um laboratório sem o conhecimento e o acordo do docente responsável.

20. Ande e não corra, por mais pressa que tenha. Correr nos corredores ou nos laboratórios representa um risco para si e para as outras pessoas que podem transportar consigo materiais perigosos.

21. Tenha sempre cuidado ao abrir e fechar portas, ao entrar ou sair dos laboratórios.

22. No final de um trabalho experimental:

- **Arrume os reagentes:** os reagentes e solventes devem ser arrumados nas prateleiras e armários correspondentes logo após o seu uso, com os rótulos virados para a frente;
- **Todos os reagentes e produtos sintetizados deverão estar rotulados** (é obrigatória a identificação do produto, data de preparação, aluno responsável, disciplina e professor responsável) utilizando etiquetas apropriadas;
- **Desligue o equipamento usado (material eléctrico, fontes de calor, garrafas de gás, etc.);**
- **Coloque os resíduos em local próprio;**
- **Limpe a bancada, arrume o material lavado e lave as mãos** (é preferível efectuar as limpezas e arrumações após cada etapa de um trabalho. O material que conteve reagentes perigosos deve ser enxaguado antes de ser posto de parte para a limpeza final).

23. Se tiver dúvidas em relação a qualquer precaução necessária pergunte ao docente responsável.

24. Quaisquer problemas médicos, alergias conhecidas ou medicação que possam pôr em risco a integridade física do aluno ou dos seus colegas devem ser comunicados ao docente responsável, que actuará em conformidade.

## Anexo 7. Lista de substâncias carcinogêneas

### Group 1: Carcinogenic to humans (87)

#### Agents and groups of agents

Aflatoxins, naturally occurring [1402-68-2] (Vol. 56; 1993)  
4-Aminobiphenyl [92-67-1] (Vol. 1, Suppl. 7; 1987)  
Arsenic [7440-38-2] and arsenic compounds (Vol. 23, Suppl. 7; 1987)  
(NB: This evaluation applies to the group of compounds as a whole and not necessarily to all individual compounds within the group)  
Asbestos [1332-21-4] (Vol. 14, Suppl. 7; 1987)  
Azathioprine [446-86-6] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
Benzene [71-43-2] (Vol. 29, Suppl. 7; 1987)  
Benzidine [92-87-5] (Vol. 29, Suppl. 7; 1987)  
Beryllium [7440-41-7] and beryllium compounds (Vol. 58; 1993)  
(NB: Evaluated as a group)  
*N,N*-Bis(2-chloroethyl)-2-naphthylamine (Chlornaphazine) [494-03-1] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
Bis(chloromethyl)ether [542-88-1] and chloromethyl methyl ether [107-30-2] (technical-grade) (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
1,4-Butanediol dimethanesulfonate (Busulphan; Myleran) [55-98-1] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
Cadmium [7440-43-9] and cadmium compounds (Vol. 58; 1993)  
(NB: Evaluated as a group)  
Chlorambucil [305-03-3] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
1-(2-Chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea (Methyl-CCNU; Semustine) [13909-09-6] (Suppl. 7; 1987)  
Chromium[VI] compounds (Vol. 49; 1990)  
(NB: Evaluated as a group)  
Ciclosporin [79217-60-0] (Vol. 50; 1990)  
Cyclophosphamide [50-18-0] [6055-19-2] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
Diethylstilboestrol [56-53-1] (Vol. 21, Suppl. 7; 1987)  
Epstein-Barr virus (Vol. 70; 1997)  
Erionite [66733-21-9] (Vol. 42, Suppl. 7; 1987)  
Ethylene oxide [75-21-8] (Vol. 60; 1994)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2A to 1 with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)  
Etoposide [33419-42-0] in combination with cisplatin and bleomycin (Vol. 76; 2000)  
[Gamma Radiation: see X- and Gamma ( $\gamma$ )-Radiation]  
*Helicobacter pylori* (infection with) (Vol. 61; 1994)  
Hepatitis B virus (chronic infection with) (Vol. 59; 1994)  
Hepatitis C virus (chronic infection with) (Vol. 59; 1994)  
Human immunodeficiency virus type 1 (infection with) (Vol. 67; 1996)  
Human papillomavirus type 16 (Vol. 64; 1995)  
Human papillomavirus type 18 (Vol. 64; 1995)  
Human T-cell lymphotropic virus type I (Vol. 67; 1996)  
Melphalan [148-82-3] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)  
8-Methoxypsoralen (Methoxsalen) [298-81-7] plus ultraviolet A radiation (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)  
MOPP and other combined chemotherapy including alkylating agents (Suppl. 7; 1987)  
Mustard gas (Sulfur mustard) [505-60-2] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)  
2-Naphthylamine [91-59-8] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
Neutrons (Vol. 75; 2000)  
Nickel compounds (Vol. 49; 1990)  
(NB: Evaluated as a group)  
Oestrogen therapy, postmenopausal (Vol. 72; 1999)  
Oestrogens, nonsteroidal (Suppl. 7; 1987)  
(NB: This evaluation applies to the group of compounds as a whole and not necessarily to all individual compounds within the group)  
Oestrogens, steroidal (Suppl. 7; 1987)  
(NB: This evaluation applies to the group of compounds as a whole and not necessarily to all individual compounds within the group)  
*Opisthorchis viverrini* (infection with) (Vol. 61; 1994)

Oral contraceptives, combined (Vol. 72; 1999)  
 (NB: There is also conclusive evidence that these agents have a protective effect against cancers of the ovary and endometrium)

Oral contraceptives, sequential (Suppl. 7; 1987)

Phosphorus-32, as phosphate (Vol. 78; 2001)

Plutonium-239 and its decay products (may contain plutonium-240 and other isotopes), as aerosols (Vol. 78; 2001)

Radioiodines, short-lived isotopes, including iodine-131, from atomic reactor accidents and nuclear weapons detonation (exposure during childhood) (Vol. 78; 2001)

Radionuclides,  $\alpha$ -particle-emitting, internally deposited (Vol. 78; 2001)  
 (NB: Specific radionuclides for which there is *sufficient* evidence for carcinogenicity to humans are also listed individually as Group 1 agents)

Radionuclides,  $\beta$ -particle-emitting, internally deposited (Vol. 78; 2001)  
 (NB: Specific radionuclides for which there is *sufficient* evidence for carcinogenicity to humans are also listed individually as Group 1 agents)

Radium-224 and its decay products (Vol. 78; 2001)

Radium-226 and its decay products (Vol. 78; 2001)

Radium-228 and its decay products (Vol. 78; 2001)

Radon-222 [10043-92-2] and its decay products (Vol. 78; 2001)

*Schistosoma haematobium* (infection with) (Vol. 61; 1994)

Silica [14808-60-7], crystalline (inhaled in the form of quartz or cristobalite from occupational sources) (Vol. 68; 1997)

Solar radiation (Vol. 55; 1992)

Talc containing asbestiform fibres (Vol. 42, Suppl. 7; 1987)

Tamoxifen [10540-29-1] (Vol. 66; 1996)  
 (NB: There is also conclusive evidence that this agent (tamoxifen) reduces the risk of contralateral breast cancer)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin [1746-01-6] (Vol. 69; 1997)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2A to 1 with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Thiotepa [52-24-4] (Vol. 50; 1990)

Thorium-232 and its decay products, administered intravenously as a colloidal dispersion of thorium-232 dioxide (Vol. 78; 2001)

Treosulfan [299-75-2] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)

Vinyl chloride [75-01-4] (Vol. 19, Suppl. 7; 1987)

X- and Gamma ( $\gamma$ )-Radiation (Vol. 75; 2000)

## **Group 2A: Probably carcinogenic to humans (63)**

### **Agents and groups of agents**

Acrylamide [79-06-1] (Vol. 60; 1994)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Adriamycin [23214-92-8] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Androgenic (anabolic) steroids (Suppl. 7; 1987)

Azacitidine [320-67-2] (Vol. 50; 1990)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Benz[*a*]anthracene [56-55-3] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Benzidine-based dyes (Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Benzo[*a*]pyrene [50-32-8] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Bischloroethyl nitrosourea (BCNU) [154-93-8] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)

1,3-Butadiene [106-99-0] (Vol. 71; 1999)

Captafol [2425-06-1] (Vol. 53; 1991)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Chloramphenicol [56-75-7] (Vol. 50; 1990)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

$\alpha$ -Chlorinated toluenes (benzal chloride [98-87-3], benzotrichloride [98-07-7], benzyl chloride [100-44-7]) and benzoyl chloride [98-88-4] (combined exposures) (Vol. 29, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)

1-(2-Chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) [13010-47-4] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*para*-Chloro-*ortho*-toluidine [95-69-2] and its strong acid salts (Vol. 48, Vol. 77; 2000)  
(NB: Evaluated as a group)

Chlorozotocin [54749-90-5] (Vol. 50; 1990)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Cisplatin [15663-27-1] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*Clonorchis sinensis* (infection with) (Vol. 61; 1994)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Dibenz[*a,h*]anthracene [53-70-3] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Diethyl sulfate [64-67-5] (Vol. 54, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Dimethylcarbamoyl chloride [79-44-7] (Vol. 12, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

1,2-Dimethylhydrazine [540-73-8] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Dimethyl sulfate [77-78-1] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Epichlorohydrin [106-89-8] (Vol. 11, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Ethylene dibromide [106-93-4] (Vol. 15, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*N*-Ethyl-*N*-nitrosourea [759-73-9] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Etoposide [33419-42-0] (Vol. 76; 2000)  
(NB: Other relevant data taken into consideration in making the overall evaluation)

Formaldehyde [50-00-0] (Vol. 62; 1995)

Glycidol [556-52-5] (Vol. 77; 2000)  
(NB: Other relevant data taken into consideration in making the overall evaluation)

Human papillomavirus type 31 (Vol. 64; 1995)

Human papillomavirus type 33 (Vol. 64; 1995)

IQ (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline) [76180-96-6] (Vol. 56; 1993)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8 (Vol. 70; 1997)

5-Methoxypsoralen [484-20-8] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
(NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

4,4'-Methylene bis(2-chloroaniline) (MOCA) [101-14-4] (Vol. 57; 1993)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Methyl methanesulfonate [66-27-3] (Vol. 7, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) [70-25-7] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*N*-Methyl-*N*-nitrosourea [684-93-5] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Nitrogen mustard [51-75-2] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)

*N*-Nitrosodiethylamine [55-18-5] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

*N*-Nitrosodimethylamine [62-75-9] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Phenacetin [62-44-2] (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)

Procarbazine hydrochloride [366-70-1] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Styrene-7,8-oxide [96-09-3] (Vol. 60; 1994)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Teniposide [29767-20-2] (Vol. 76; 2000)  
 (NB: Other relevant data taken into consideration in making the overall evaluation)

Tetrachloroethylene [127-18-4] (Vol. 63; 1995)

*ortho*-Toluidine [95-53-4] (Vol. 27, Suppl. 7, Vol. 77; 2000)

Trichloroethylene [79-01-6] (Vol. 63; 1995)

1,2,3-Trichloropropane [96-18-4] (Vol. 63; 1995)

Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate [126-72-7] (Vol. 20, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Ultraviolet radiation A (Vol. 55; 1992)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Ultraviolet radiation B (Vol. 55; 1992)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Ultraviolet radiation C (Vol. 55; 1992)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Vinyl bromide [593-60-2] (Vol. 39, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 2B to 2A with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)

Vinyl fluoride [75-02-5] (Vol. 63; 1995)

## **Group 2B: Possibly carcinogenic to humans (235)**

### **Agents and groups of agents**

A- $\alpha$ -C (2-Amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole) [26148-68-5] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)

Acetaldehyde [75-07-0] (Vol. 36, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)

Acetamide [60-35-5] (Vol. 7, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)

Acrylonitrile [107-13-1] (Vol. 71; 1999)

AF-2 [2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide] [3688-53-7] (Vol. 31, Suppl. 7; 1987)

Aflatoxin M1 [6795-23-9] (Vol. 56; 1993)

*para*-Aminoazobenzene [60-09-3] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)

*ortho*-Aminoazotoluene [97-56-3] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)

2-Amino-5-(5-nitro-2-furyl)-1,3,4-thiadiazole [712-68-5] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Amitrole [61-82-5] (Vol. 41, Suppl. 7; 1987)  
 Amsacrine [51264-14-3] (Vol. 76; 2000)  
*ortho*-Anisidine [90-04-0] (Vol. 73; 1999)  
 Antimony trioxide [1309-64-4] (Vol. 47; 1989)  
 Aramite® [140-57-8] (Vol. 5, Suppl. 7; 1987)  
 Auramine [492-80-8] (technical-grade) (Vol. 1, Suppl. 7; 1987)  
 Azaserine [115-02-6] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Aziridine [151-56-4] (Vol. 9, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 3 to 2B with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)  
 Benzo[*b*]fluoranthene [205-99-2] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Benzo[*j*]fluoranthene [205-82-3] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Benzo[*k*]fluoranthene [207-08-9] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Benzofuran [271-89-6] (Vol. 63; 1995)  
 Benzyl violet 4B [1694-09-3] (Vol. 16, Suppl. 7; 1987)  
 2,2-Bis(bromomethyl)propane-1,3-diol [3296-90-0] (Vol. 77; 2000)  
 Bleomycins [11056-06-7] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 3 to 2B with supporting evidence from other data relevant to the evaluation of carcinogenicity and its mechanisms)  
 Bracken fern (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
 Bromodichloromethane [75-27-4] (Vol. 52, Vol. 71; 1999)  
 Butylated hydroxyanisole (BHA) [25013-16-5] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
 β-Butyrolactone [3068-88-0] (Vol. 11, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Caffeic acid [331-39-5] (Vol. 56; 1993)  
 Carbon black [1333-86-4] (Vol. 65; 1996)  
 Carbon tetrachloride [56-23-5] (Vol. 20, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Catechol [120-80-9] (Vol. 15, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Ceramic fibres (Vol. 43; 1988)  
 Chlordane [57-74-9] (Vol. 53; 1991)  
 Chlordecone (Kepone) [143-50-0] (Vol. 20, Suppl. 7; 1987)  
 Chlorendic acid [115-28-6] (Vol. 48; 1990)  
*para*-Chloroaniline [106-47-8] (Vol. 57; 1993)  
 Chloroform [67-66-3] (Vol. 73; 1999)  
 1-Chloro-2-methylpropene [513-37-1] (Vol. 63; 1995)  
 Chlorophenoxy herbicides (Vol. 41, Suppl. 7; 1987)  
 4-Chloro-*ortho*-phenylenediamine [95-83-0] (Vol. 27, Suppl. 7; 1987)  
 Chloroprene [126-99-8] (Vol. 71; 1999)  
 Chlorothalonil [1897-45-6] (Vol. 73; 1999)  
 CI Acid Red 114 [6459-94-5] (Vol. 57; 1993)  
 CI Basic Red 9 [569-61-9] (Vol. 57; 1993)  
 CI Direct Blue 15 [2429-74-5] (Vol. 57; 1993)  
 Citrus Red No. 2 [6358-53-8] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
 Cobalt [7440-48-4] and cobalt compounds (Vol. 52; 1991)  
 (NB: Evaluated as a group)  
*para*-Cresidine [120-71-8] (Vol. 27, Suppl. 7; 1987)  
 Cycasin [14901-08-7] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Dacarbazine [4342-03-4] (Vol. 26, Suppl. 7; 1987)  
 Dantron (Chrysazin; 1,8-Dihydroxyanthraquinone) [117-10-2] (Vol. 50; 1990)  
 Daunomycin [20830-81-3] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 DDT [*p,p'*-DDT, 50-29-3] (Vol. 53; 1991)  
*N,N'*-Diacetylbenzidine [613-35-4] (Vol. 16, Suppl. 7; 1987)  
 2,4-Diaminoanisole [615-05-4] (Vol. 27, Suppl. 7; 1987)  
 4,4'-Diaminodiphenyl ether [101-80-4] (Vol. 29, Suppl. 7; 1987)  
 2,4-Diaminotoluene [95-80-7] (Vol. 16, Suppl. 7; 1987)  
 Dibenz[*a,h*]acridine [226-36-8] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Dibenz[*a,j*]acridine [224-42-0] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 7*H*-Dibenzo[*c,g*]carbazole [194-59-2] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Dibenzo[*a,e*]pyrene [192-65-4] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Dibenzo[*a,h*]pyrene [189-64-0] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)

Dibenzo[*a,i*]pyrene [189-55-9] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Dibenzo[*a,l*]pyrene [191-30-0] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 1,2-Dibromo-3-chloropropane [96-12-8] (Vol. 20, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 2,3-Dibromopropan-1-ol [96-13-9] (Vol. 77; 2000)  
*para*-Dichlorobenzene [106-46-7] (Vol. 73; 1999)  
 (N.B. - Mechanistic data taken into account for making overall evaluation)  
 3,3'-Dichlorobenzidine [91-94-1] (Vol. 29, Suppl. 7; 1987)  
 3,3'-Dichloro-4,4'-diaminodiphenyl ether [28434-86-8] (Vol. 16, Suppl. 7; 1987)  
 1,2-Dichloroethane [107-06-2] (Vol. 20, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Dichloromethane (methylene chloride) [75-09-2] (Vol. 71; 1999)  
 1,3-Dichloropropene [542-75-6] (technical-grade) (Vol. 41, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Dichlorvos [62-73-7] (Vol. 53; 1991)  
 1,2-Diethylhydrazine [1615-80-1] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Diglycidyl resorcinol ether [101-90-6] (Vol. 36, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Dihydrosafrole [94-58-6] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Diisopropyl sulfate [2973-10-6] (Vol. 54, Vol. 71; 1999)  
 3,3'-Dimethoxybenzidine (*ortho*-Dianisidine) [119-90-4] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
*para*-Dimethylaminoazobenzene [60-11-7] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
*trans*-2-[(Dimethylamino)methylimino]-5-[2-(5-nitro-2-furyl)-vinyl]-1,3,4-oxadiazole [25962-77-0]  
 (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 2,6-Dimethylaniline (2,6-Xylidine) [87-62-7] (Vol. 57; 1993)  
 3,3'-Dimethylbenzidine (*ortho*-Tolidine) [119-93-7] (Vol. 1, Suppl. 7; 1987)  
 1,1-Dimethylhydrazine [57-14-7] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 3,7-Dinitrofluoranthene [105735-71-5] (Vol. 65; 1996)  
 3,9-Dinitrofluoranthene [22506-53-2] (Vol. 65; 1996)  
 1,6-Dinitropyrene [42397-64-8] (Vol. 46; 1989)  
 1,8-Dinitropyrene [42397-65-9] (Vol. 46; 1989)  
 2,4-Dinitrotoluene [121-14-2] (Vol. 65; 1996)  
 2,6-Dinitrotoluene [606-20-2] (Vol. 65; 1996)  
 1,4-Dioxane [123-91-1] (Vol. 11, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Disperse Blue 1 [2475-45-8] (Vol. 48; 1990)  
 1,2-Epoxybutane [106-88-7] (Vol. 47, Vol. 71; 1999)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 3 to 2B with supporting evidence from other data relevant to the evaluation  
 of carcinogenicity and its mechanisms)  
 Ethyl acrylate [140-88-5] (Vol. 39, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Ethylbenzene [100-41-4] (Vol. 77; 2000)  
 Ethylene thiourea [96-45-7] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Ethyl methanesulfonate [62-50-0] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Foreign bodies, implanted in tissues (Vol. 74; 1999)  
 Polymeric, prepared as thin smooth films (with the exception of poly(glycolic acid))  
 Metallic, prepared as thin smooth films  
 Metallic cobalt, metallic nickel and an alloy powder containing 66-67% nickel, 13-16% chromium and 7% iron  
 2-(2-Formylhydrazino)-4-(5-nitro-2-furyl)thiazole [3570-75-0] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Furan [110-00-9] (Vol. 63; 1995)  
 Glasswool (Vol. 43; 1988)  
 Glu-P-1 (2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole) [67730-11-4] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
 Glu-P-2 (2-Aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole) [67730-10-3] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
 Glycidaldehyde [765-34-4] (Vol. 11, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Griseofulvin [126-07-8] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 HC Blue No. 1 [2784-94-3] (Vol. 57; 1993)  
 Heptachlor [76-44-8] (Vol. 53; 1991)  
 Hexachlorobenzene [118-74-1] (Vol. 20, Suppl. 7; 1987)  
 Hexachloroethane [67-72-1] (Vol. 73; 1999)  
 Hexachlorocyclohexanes (Vol. 20, Suppl. 7; 1987)  
 Hexamethylphosphoramide [680-31-9] (Vol. 15, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Human immunodeficiency virus type 2 (infection with) (Vol. 67; 1996)  
 Human papillomaviruses: some types other than 16, 18, 31 and 33 (Vol. 64; 1995)  
 Hydrazine [302-01-2] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene [193-39-5] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 Iron-dextran complex [9004-66-4] (Vol. 2, Suppl. 7; 1987)

Isoprene [78-79-5] (Vol. 60, Vol. 71; 1999)  
 Lasiocarpine [303-34-4] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Lead [7439-92-1] and lead compounds, inorganic (Vol. 23, Suppl. 7; 1987)  
 (NB: Evaluated as a group)  
 Magenta [632-99-5] (containing CI Basic Red 9) (Vol. 57; 1993)  
 MeA- $\alpha$ -C (2-Amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole) [68006-83-7] (Vol. 40, Suppl. 7; 1987)  
 Medroxyprogesterone acetate [71-58-9] (Vol. 21, Suppl. 7; 1987)  
 MeIQ (2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline) [77094-11-2] (Vol. 56; 1993)  
 MeIQx (2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline) [77500-04-0] (Vol. 56; 1993)  
 Merphalan [531-76-0] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)  
 2-Methylaziridine (Propyleneimine) [75-55-8] (Vol. 9, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Methylazoxymethanol acetate [592-62-1] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 5-Methylchrysene [3697-24-3] (Vol. 32, Suppl. 7; 1987)  
 4,4'-Methylene bis(2-methylaniline) [838-88-0] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
 4,4'-Methylenedianiline [101-77-9] (Vol. 39, Suppl. 7; 1987)  
 Methylmercury compounds (Vol. 58; 1993)  
 (NB: Evaluated as a group)  
 2-Methyl-1-nitroanthraquinone [129-15-7] (uncertain purity) (Vol. 27, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Methyl-*N*-nitrosourethane [615-53-2] (Vol. 4, Suppl. 7; 1987)  
 Methylthiouracil [56-04-2] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Metronidazole [443-48-1] (Vol. 13, Suppl. 7; 1987)  
 Mirex [2385-85-5] (Vol. 20, Suppl. 7; 1987)  
 Mitomycin C [50-07-7] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Mitoxantrone [65271-80-9] (Vol. 76; 2000)  
 Monocrotaline [315-22-0] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 5-(Morpholinomethyl)-3-[(5-nitrofurfurylidene)amino]-2-oxazolidinone [3795-88-8] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Nafenopin [3771-19-5] (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)  
 Nickel, metallic [7440-02-0] and alloys (Vol. 49; 1990)  
 Niridazole [61-57-4] (Vol. 13, Suppl. 7; 1987)  
 Nitrioltriacetic acid [139-13-9] and its salts (Vol. 73; 1999)  
 (NB: Evaluated as a group)  
 5-Nitroacenaphthene [602-87-9] (Vol. 16, Suppl. 7; 1987)  
 2-Nitroanisole [91-23-6] (Vol. 65; 1996)  
 Nitrobenzene [98-95-3] (Vol. 65; 1996)  
 6-Nitrochrysene [7496-02-8] (Vol. 46; 1989)  
 Nitrofen [1836-75-5] (technical-grade) (Vol. 30, Suppl. 7; 1987)  
 2-Nitrofluorene [607-57-8] (Vol. 46; 1989)  
 1-[(5-Nitrofurfurylidene)amino]-2-imidazolidinone [555-84-0] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
*N*-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide [531-82-8] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Nitrogen mustard *N*-oxide [126-85-2] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)  
 Nitromethane [75-52-5] (Vol. 77; 2000)  
 2-Nitropropane [79-46-9] (Vol. 29, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 1-Nitropyrene [5522-43-0] (Vol. 46; 1989)  
 4-Nitropyrene [57835-92-4] (Vol. 46; 1989)  
*N*-Nitrosodi-*n*-butylamine [924-16-3] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosodiethanolamine [1116-54-7] (Vol. 17, Suppl. 7, Vol. 77; 2000)  
*N*-Nitrosodi-*n*-propylamine [621-64-7] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 3-(*N*-Nitrosomethylamino)propionitrile [60153-49-3] (Vol. 37, Suppl. 7; 1987)  
 4-(*N*-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) [64091-91-4] (Vol. 37, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosomethylethylamine [10595-95-6] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosomethylvinylamine [4549-40-0] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosomorpholine [59-89-2] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N'*-Nitrosornicotine [16543-55-8] (Vol. 37, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosopiperidine [100-75-4] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrosopyrrolidine [930-55-2] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
*N*-Nitrososarcosine [13256-22-9] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 Ochratoxin A [303-47-9] (Vol. 56; 1993)  
 Oestrogen-progestogen therapy, postmenopausal (Vol. 72; 1999)  
 Oil Orange SS [2646-17-5] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
 Oxazepam [604-75-1] (Vol. 66; 1996)



Palygorskite (attapulgit) [12174-11-7] (long fibres, > 5 micrometers) (Vol. 68; 1997)  
 Panfuran S [794-93-4] (containing dihydroxymethylfuratrizine)  
 (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)  
 Phenazopyridine hydrochloride [136-40-3] (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)  
 Phenobarbital [50-06-6] (Vol. 13, Suppl. 7; 1987)  
 Phenolphthalein [77-09-8] (Vol. 76; 2000)  
 Phenoxybenzamine hydrochloride [63-92-3] (Vol. 24, Suppl. 7; 1987)  
 Phenyl glycidyl ether [122-60-1] (Vol. 47, Vol. 71; 1999)  
 Phenytoin [57-41-0] (Vol. 66; 1996)  
 PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine) [105650-23-5] (Vol. 56; 1993)  
 Polychlorophenols and their sodium salts (mixed exposures) (Vol. 41, Suppl. 7, Vol. 53, Vol. 71; 1999)  
 Ponceau MX [3761-53-3] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
 Ponceau 3R [3564-09-8] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
 Potassium bromate [7758-01-2] (Vol. 73; 1999)  
 Progestins (Suppl. 7; 1987)  
 Progestogen-only contraceptives (Vol. 72; 1999)  
 1,3-Propane sultone [1120-71-4] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 $\beta$ -Propiolactone [57-57-8] (Vol. 4, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Propylene oxide [75-56-9] (Vol. 60; 1994)  
 Propylthiouracil [51-52-5] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Rockwool (Vol. 43; 1988)  
 Safrole [94-59-7] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
*Schistosoma japonicum* (infection with) (Vol. 61; 1994)  
 Slagwool (Vol. 43; 1988)  
 Sodium *ortho*-phenylphenate [132-27-4] (Vol. 73; 1999)  
 Sterigmatocystin [10048-13-2] (Vol. 10, Suppl. 7; 1987)  
 Streptozotocin [18883-66-4] (Vol. 17, Suppl. 7; 1987)  
 Styrene [100-42-5] (Vol. 60; 1994)  
 (NB: Overall evaluation upgraded from 3 to 2B with supporting evidence from other data relevant to the evaluation  
 of carcinogenicity and its mechanisms)  
 Sulfallate [95-06-7] (Vol. 30, Suppl. 7; 1987)  
 Tetrafluoroethylene [116-14-3] (Vol. 19, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Tetranitromethane [509-14-8] (Vol. 65; 1996)  
 Thioacetamide [62-55-5] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 4,4'-Thiodianiline [139-65-1] (Vol. 27, Suppl. 7; 1987)  
 Thiourea [62-56-6] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Toluene diisocyanates [26471-62-5] (Vol. 39, Suppl. 7, Vol. 71; 1999)  
 Toxins derived from *Fusarium moniliforme* (Vol. 56; 1993)  
 Trichlormethine (Trimustine hydrochloride) [817-09-4] (Vol. 50; 1990)  
 Trp-P-1 (3-Amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole) [62450-06-0] (Vol. 31, Suppl. 7; 1987)  
 Trp-P-2 (3-Amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole) [62450-07-1] (Vol. 31, Suppl. 7; 1987)  
 Trypan blue [72-57-1] (Vol. 8, Suppl. 7; 1987)  
 Uracil mustard [66-75-1] (Vol. 9, Suppl. 7; 1987)  
 Urethane [51-79-6] (Vol. 7, Suppl. 7; 1987)  
 Vinyl acetate [108-05-4] (Vol. 63; 1995)  
 4-Vinylcyclohexene [100-40-3] (Vol. 60; 1994)  
 4-Vinylcyclohexene diepoxide [106-87-6] (Vol. 60; 1994)  
 Zalcitabine [7481-89-2] (Vol. 76; 2000)  
 Zidovudine (AZT) [30516-87-1] (Vol. 76; 2000)

**Anexo 8. Requisição para utilização de substâncias carcinogêneas, embriotóxicas e especialmente tóxicas.**

**I Docente responsável**

\_\_\_\_\_

**II SUBSTÂNCIA**

Nome \_\_\_\_\_ CAS \_\_\_\_\_

MSDS (adicionar em anexo)

Local de utilização \_\_\_\_\_

Categoria de uso: Regular Irregular

Período de utilização \_\_\_\_\_

Concentrações máximas das soluções a utilizar \_\_\_\_\_

Local de armazenagem \_\_\_\_\_

Quantidade a adquirir \_\_\_\_\_

**III Breve descrição da forma como a substância vai ser utilizada**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**IV Número de pessoas potencialmente expostas à substância**

Identificação das pessoas autorizadas a utilizar a substância:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

Identificação de outras pessoas que trabalham no mesmo local onde a substância será usada:

Rúbrica

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_

### **V Descontaminação e eliminação**

Métodos de descontaminação

---

---

---

Métodos de limpeza da área de trabalho (inclui equipamento e superfícies de trabalho)

---

---

---

Procedimentos de eliminação (Intermediários, resíduos e substância não usadas)

---

---

---

### **VI Procedimentos de emergência (inalação, ingestão, inoculação)**

---

---

---

Assinaturas (Docente responsável e utilizadores)

---

---

## **Anexo 9. Localização e transporte das garrafas de gases no DQUA**

A central de gases do Departamento de Química da UA situa-se no 1º piso, junto aos outros armazéns. Os gases ligados em rede são o Hidrogénio Alphagaz, o Azoto Alphagaz, o AR Alphagaz, o Azoto Industrial, o Oxigénio Industrial e o Acetileno.

É absolutamente interdita a abertura de qualquer garrafa ou a mudança de garrafas na central de gases, excepto para o Sr. António Morais, o Sr. Pedro Alves, a Sra. Isabel Martins ou a Dr.<sup>a</sup> Dulce Helena Teixeira.

Além das garrafas presentes na central de gases, existem outras garrafas de gases no edifício do DQ. O registo de entradas e saídas é feito pelo armazém, devendo ser actualizados os registos de quantidade e a localização das garrafas existentes em todo o DQ.

No interior do DQ, as garrafas, cheias ou vazias, são obrigatoriamente transportadas no carrinho existente na central de gases, amarradas de forma segura.

## **Anexo 10. Normas de Utilização da rede de Acetileno**

### **Notas prévias**

- A rede de acetileno é utilizada exclusivamente pela absorção atómica no 3º piso.
- É obrigatória a leitura e cumprimento destas normas por todos os utilizadores.

### **Abertura da rede de Acetileno**

- A rede de acetileno só deverá permanecer aberta enquanto o equipamento estiver em utilização.
- A requisição de abertura da rede de acetileno só será permitida à Dr.<sup>a</sup> Teresa Caldeira.
- A abertura será efectuada após requisição em livro próprio, no armazém.
- A requisição deverá ser efectuada no próprio dia de funcionamento, após verificação de que a válvula de segurança dos equipamentos se encontra fechada.
- A hora de abertura da garrafa de acetileno será obrigatoriamente registada e rubricada em livro próprio.
- A utilização da rede em dias normais antes das 9:00 horas ou aos fins de semana e feriados é considerada de carácter excepcional e implica o cumprimento das seguintes regras:
  - É obrigatória a presença de outra pessoa no departamento (com conhecimento de que o equipamento está em funcionamento), de preferência num local vizinho.
  - É permitida a abertura da rede de acetileno a qualquer docente autorizado pelo grupo de Química Analítica que o solicite à comissão de segurança, devendo este responsabilizar-se pessoalmente pela abertura, em segurança, da rede de acetileno.

### **Fecho da rede de acetileno**

- O fecho da rede de acetileno deverá obedecer às seguintes normas:
  - ◆ Até às 17:00 horas a Dr.<sup>a</sup> Teresa Caldeira ou um dos docentes autorizados a fechar a rede de acetileno deverá requisitar a chave do armazém de gases à Sr.<sup>a</sup> Isabel Martins.

- ◆ O requerente responsabilizar-se-á pelo fecho, em segurança, da rede de acetileno e do armazém de gases.
- ◆ A hora de fecho da garrafa de acetileno será obrigatoriamente registada e rubricada em livro próprio.
- ◆ No dia seguinte a chave deverá ser entregue no armazém.
- ◆ Caso não seja feita a requisição da chave, a rede de acetileno será fechada às 17:30 horas.

**Nota importante:** Neste caso, é dos utilizadores/docentes responsáveis pela utilização da absorção atómica a responsabilidade dos estragos causados ao equipamento ou ao trabalho em curso.

- ◆ No caso de utilização da rede de acetileno aos fins de semana e feriados o fecho da rede deverá ser efectuado pelo docente que requisitou a chave.

- O fecho da rede de acetileno só poderá ser efectuado por utilizadores autorizados.
- São utilizadores autorizados:

A Dr.<sup>a</sup> Teresa Caldeira e os docentes autorizados pelo grupo de Química Analítica que assim o solicitem à comissão de segurança.

### **Registo de Segurança - Absorção Atómica**

- O funcionamento da absorção atómica só será autorizado após completo preenchimento da folha de Registo de Segurança - Absorção Atómica e sua afixação no instrumento.
- Este registo deve ser preenchido para todos os dias de funcionamento do aparelho.
- No caso de funcionamento durante o fim de semana ou feriados, é exigida a assinatura do responsável pela segurança.
- A ausência de folha de Registo de Segurança - Absorção Atómica conduzirá ao fecho imediato da rede de acetileno.

**Nota importante:** Neste caso, é dos utilizadores/docentes responsáveis pela utilização da absorção atómica a responsabilidade dos estragos causados ao equipamento ou ao trabalho em curso.

- Findo o trabalho e desligada a rede de acetileno, a folha de Registo de Segurança - Absorção Atómica deverá ser arquivada na pasta de segurança da sala de Absorção Atómica.

## Registo de Segurança - Absorção atómica

<b>Data</b>	<input type="text"/>	
<b>Início:</b>	<input type="text"/>	<b>Hora de fecho:</b>
<b>Fim previsto:</b>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

**Afixar em lugar bem visível**

<b>O Investigador</b>	<b>Telefones</b>
<input type="text"/>	D.Q. <input type="text"/> Outro <input type="text"/>

<b>O Orientador Responsável</b>	<b>Telefones</b>
<input type="text"/>	D.Q. <input type="text"/> Outro <input type="text"/>

<b>Responsável pela segurança:*</b>
-------------------------------------

Este registo deve ser preenchido para **todos os dias** de funcionamento do aparelho.

\* No caso de funcionamento durante o **fim de semana** exige-se a assinatura do responsável pela segurança.

## **Anexo 11. Normas de Utilização da rede de Hidrogénio**

### **Notas prévias**

- A rede de hidrogénio é utilizada exclusivamente pelos cromatógrafos de gases do 2º piso.
- É obrigatória a leitura e cumprimento destas normas por todos os utilizadores dos cromatógrafos.

### **Abertura da rede de hidrogénio**

- A rede de hidrogénio só deverá permanecer aberta enquanto os equipamentos estiverem em utilização.
- A requisição da abertura da rede de hidrogénio só será permitida aos seguintes funcionários:

Armando Silvestre;

Mário Simões;

Sílvia Rocha;

Manuel António C.R. Silva;

Dmitry Evtugin;

Dulce Helena F.M.G. Teixeira.

Celeste Azevedo

Carlos Pascoal Neto

Valdemar Esteves

Teresa Gomes

- A abertura será efectuada após requisição ao armazém, por correio electrónico.
- A requisição deverá ser efectuada no dia útil anterior ao dia de funcionamento, devendo o requisitante verificar que, à hora de abertura do hidrogénio, as válvulas de segurança dos cromatógrafos se encontram fechadas.
- A hora de abertura da garrafa de hidrogénio será obrigatoriamente registada e rubricada em livro próprio, pelo funcionário autorizado pela comissão de segurança.



- A utilização da rede em dias normais antes das 9:00 horas ou aos fins de semana e feriados é considerada de carácter excepcional e implica o cumprimento das seguintes regras:
  - É obrigatória a presença de outra pessoa no departamento (com conhecimento de que um cromatógrafo está em funcionamento), de preferência num local vizinho à sala dos cromatógrafos de gás.
  - É permitida a abertura da rede de hidrogénio a qualquer docente que o solicite à comissão de segurança, devendo este responsabilizar-se pessoalmente pela abertura, em segurança, da rede de hidrogénio.
  - O utilizador autorizado deverá requisitar ao armazém a chave do armazém de gases no dia anterior à sua utilização.

### **Fecho da rede de hidrogénio**

- O fecho da rede de hidrogénio deverá obedecer às seguintes normas:
  - ◆ Até às 17:00 horas um dos utilizadores/docentes autorizados a fechar a rede de hidrogénio deverá requisitar a chave do armazém de gases à Sr.<sup>a</sup> Isabel Martins.
  - ◆ O requerente responsabilizar-se-á pelo fecho, em segurança, da rede de hidrogénio e do armazém de gases.
  - ◆ A hora de fecho da garrafa de hidrogénio será obrigatoriamente registada e rubricada em livro próprio.
  - ◆ No dia seguinte a chave deverá ser entregue no armazém.
  - ◆ Caso não seja feita a requisição da chave, a rede de hidrogénio será fechada às 17:30 horas.

**Nota importante:** Neste caso, é dos utilizadores/docentes responsáveis pela utilização dos cromatógrafos a responsabilidade dos estragos causados às colunas ou ao trabalho em curso.

- ◆ No caso de utilização da rede de hidrogénio aos fins de semana e feriados o fecho da rede de hidrogénio deverá ser efectuada pelo docente que requisitou a chave ou pelo utilizador, caso seja um utilizador autorizado a fechar a rede de hidrogénio.
- O fecho da rede de hidrogénio só poderá ser efectuada por utilizadores autorizados.
- São utilizadores autorizados:

Prof. Armando Silvestre;

Prof. Mário Simões;

Prof<sup>a</sup>. Sílvia Rocha;

Prof. Manuel António C.R. Silva;

Prof. Dmitry Evtugin;

Dr.<sup>a</sup> Dulce Helena F.M.G. Teixeira;

Sr. Pedro Alves;

Sr.<sup>a</sup> Isabel Martins;

Os docentes que assim o solicitem à comissão de segurança;

Os alunos de doutoramento que, por solicitação do seu orientador responsável, sejam autorizados pela comissão de segurança.

### **Registo de Segurança - GC**

- O funcionamento dos cromatógrafos só será autorizado após completo preenchimento da folha de registo de segurança - GC e sua afixação no cromatógrafo.
- Este registo deve ser preenchido para todos os dias de funcionamento dos aparelhos.
- No caso de funcionamento durante o fim de semana ou feriados, é exigida a assinatura do responsável pela segurança.
- A ausência de folha de registo de segurança - GC num cromatógrafo em funcionamento conduzirá ao fecho imediato da rede de hidrogénio para esse GC.

**Nota importante:** Neste caso, é do utilizador/docente responsável pela utilização do cromatógrafo a responsabilidade dos estragos causados à coluna ou ao trabalho em curso.

- Findo o trabalho e desligada a rede de hidrogénio para o cromatógrafo, a folha de registo de segurança - GC deverá ser arquivada na pasta de segurança da sala de GC.

## Registo de Segurança - GC

<b>Cromatógrafo</b>	<b>Data</b>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

<b>Início:</b> <input type="text"/>	<b>Hora de fecho:</b> <input type="text"/>
<b>Fim previsto:</b> <input type="text"/>	<input type="text"/>

Afixar em lugar bem visível

O Investigador	_____	Telefones	_____
	D.Q		Outro
<b>Autorizado/a</b> pelo responsável pela segurança para fechar a garrafa de hidrogénio		<input type="checkbox"/>	

O Orientador Responsável	_____	Telefones	_____
	D.Q		Outro

Responsável pela segurança:*
------------------------------

Este registo deve ser preenchido para **todos os dias** de funcionamento dos aparelhos. O responsável pelo fecho do hidrogénio é o orientador responsável. Em alguns casos, **previamente autorizados** pelo responsável pela segurança, o orientador poderá delegar no aluno essa tarefa.

\* No caso de funcionamento durante o **fim de semana** exige-se a assinatura do responsável pela segurança.

## **Anexo 12. Requisição para utilização de equipamento científico em regime contínuo**

### **I Docente responsável**

\_\_\_\_\_

### **II Equipamento**

Designação genérica \_\_\_\_\_

Marca \_\_\_\_\_

Modelo \_\_\_\_\_

Local de utilização (nº da sala) \_\_\_\_\_

### **III Procedimentos em caso de acidente**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### **IV Procedimentos no caso de falta de água ou de corrente eléctrica**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### **V Pessoas a contactar em caso de necessidade**

1. \_\_\_\_\_  
    Telefone no Departamento \_\_\_\_\_      Telefone de casa \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_  
    Telefone no Departamento \_\_\_\_\_      Telefone de casa \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_  
    Telefone no Departamento \_\_\_\_\_      Telefone de casa \_\_\_\_\_

**Anexo 13. Formulário para equipamento ou experiência que decorra sem acompanhamento**

## Registo de Segurança

**Afixar em lugar bem visível**

<b>Experiência ou Instrumento</b>	<b>Data</b>
<input style="width: 95%;" type="text"/>	<input style="width: 95%;" type="text"/>

<b>Início:</b>	Hora	Data	<b>Laboratório</b>
<b>Fim:</b>			<input style="width: 95%;" type="text"/>

<b>Todos os detalhes experimentais</b>
--

<b>Instruções em caso de acidente</b>	
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>
<hr/>	<hr/>

O Investigador	Telefones
<input style="width: 95%;" type="text"/>	D.Q.          Outro
-----	

O Orientador Responsável	Telefones
<input style="width: 95%;" type="text"/>	D.Q.          Outro
-----	

Responsável pela segurança:*
------------------------------

Este registo deve ser preenchido para **todas as experiências** que decorram **fora das horas** de funcionamento normal do Departamento. \*Em todas as experiências classificadas nas categorias 2 e 3 exige-se a assinatura do responsável pela segurança.

## **Anexo 14. Informações úteis**

### **Números de telefone importantes**

Emergências	112		
Bombeiros	234 429 979	(B. Velhos)	
	234 422 122		
	234 422 333	(B. Novos)	
	234 425 122		
Polícia (PSP)	234 422 022		
	234 400 290		
Centro de informação antivenenos	217 950 143		
Hospital de Aveiro	234 378 300		
Telefonista da Universidade	234 370 200	9	
Segurança do Campus	234 370 945	22244	919727747
Responsável pela segurança do Campus		52206	

### **Contactos do Departamento em caso de emergência**

Mário Simões	23528	Sala 15.2.20
Pedro Domingues	23511	Sala 15.1.25
Artur Silva	23529	Sala 15.2.22
Secretaria	23500	Sala 15.1.4

### **Coordenadores de segurança dos grupos de investigação**

Química Inorgânica João Rocha	23550	Sala 15.3.25
Química Analítica João Oliveira	23542	Sala 15.3.16
Química Orgânica Graça Neves	23525	Sala 15.2.17
Bioquímica e Química Alimentar Sílvia Rocha	23566	Sala 15.2.26
Química Física Pedro Domingues	23511	Sala 15.1.25
Tecnologia Química Carlos Pascoal Neto	23505	Sala 15.1.6
Engenharia Química Carlos Silva	23595	Sala 12.1.15

## **ANEXO E**

Manual de Boas Práticas Laboratoriais





Despacho n.º 8835/2001 (2.ª série) de 27 de Abril de 2001

**DR 98 - SÉRIE II**

**Emitido Por Ministério da Saúde - Gabinete da Ministra**

Aprova o Manual de Boas Práticas Laboratoriais.

O Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, com a redacção dada pelo Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro, ao aprovar o regime jurídico do licenciamento e fiscalização dos laboratórios de análises clínicas, teve como preocupação fundamental garantir a qualidade das actividades desenvolvidas. Para o efeito, para além de regras gerais sobre a instalação, organização e funcionamento, determinou que estas unidades disponham de um manual de boas práticas que defina as regras e os processos de garantia de qualidade, assegurando uma apropriada organização técnica e procedimental.

É objectivo deste manual melhorar e credibilizar as práticas laboratoriais para aumentar o nível de protecção da saúde e permitir a acreditação dos laboratórios e a sua integração no sistema de qualidade da saúde.

Na sua preparação estiveram envolvidas a Comissão Técnica Nacional, a Ordem dos Médicos e a Ordem dos Farmacêuticos, que, ouvidas sobre a sua versão final, sobre ele se pronunciaram favoravelmente.

Assim:

Ao abrigo do n.º 1 do artigo 7.º do Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, com a redacção dada pelo Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro, aprovo o Manual de Boas Práticas Laboratoriais, que inclui os anexos I a IV e vai ser publicado como parte integrante do presente despacho.

28 de Fevereiro de 2001. - A Ministra da Saúde, Maria Manuela de Brito Arcanjo Marques da Costa.

## **Manual de Boas Práticas Laboratoriais**

### **I - Introdução**

**1 - Objectivo e campo de aplicação** - o exercício profissional em laboratórios que prossigam actividades de diagnóstico, de monitorização terapêutica e de prevenção no domínio da patologia humana (laboratório) faz parte de uma abordagem global de cuidados de saúde, incluindo o médico assistente, o especialista médico ou farmacêutico (especialista) e outros profissionais de saúde. A análise dos resultados laboratoriais fornece dados decisivos para o diagnóstico e prestação de cuidados de saúde.

A qualidade deve ser a preocupação essencial e constante de todo o pessoal do laboratório. O desenvolvimento de um sistema da qualidade é imprescindível para o correcto exercício profissional nos laboratórios.

O presente manual, que se intitula Manual de Boas Práticas Laboratoriais (MBPL), é um instrumento para a implementação da qualidade em todos os laboratório que executem exames laboratoriais e é dirigido a todos os que neles trabalham, independentemente da sua qualificação ou função.

As regras e recomendações contidas no Manual não têm por objectivo impor qualquer tipo de método para executar uma determinada análise: isto seria interferir na competência do director técnico do laboratório, que é o responsável máximo por todos os aspectos científicos e de organização do laboratório. Compete ao director técnico do laboratório a escolha de métodos optimizados, recomendados pelas sociedades científicas nacionais ou internacionais deste âmbito ou validados por ele próprio segundo um procedimento que permita a transferibilidade dos resultados.

O Manual obriga ao registo escrito de todos os procedimentos e abrange todas as etapas dos exames laboratoriais, desde a colheita até à entrega dos resultados. Esses procedimentos operativos associados ao controlo da qualidade são um elemento do sistema de garantia da qualidade dos laboratórios que realizam exames laboratoriais.

As disposições contidas no Manual aplicam-se aos laboratórios privados onde se realizam exames laboratoriais, qualquer que seja a forma de exploração. Aos laboratórios públicos e aos laboratórios do sector social aplicam-se as disposições e obrigações referentes às regras de qualidade e segurança conforme dispõe o n.º 2 do artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, e no que respeita aos estabelecimentos hospitalares devem ser consideradas as competências respectivas do director do estabelecimento, das instâncias deliberativas e consultivas, assim como dos próprios directores dos serviços, de acordo com a legislação em vigor.

### **2 - Definição dos termos:**

2.1 - Exames laboratoriais - são exames que contribuem para o diagnóstico, tratamento, monitorização ou prevenção de doenças humanas ou qualquer modificação do estado de equilíbrio fisiológico.

2.2 - Garantia da qualidade - conjunto de acções preestabelecidas e sistemáticas necessárias para se obter a garantia de que um produto ou serviço satisfaz determinadas exigências da qualidade. No âmbito dos exames laboratoriais, a garantia

da qualidade permite ter o domínio da organização de todas as tarefas que levam à qualidade, abrange obrigatoriamente as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica e inclui também procedimentos de controlo, tais como o controlo da qualidade interno e a avaliação externa da qualidade:

Qualidade (Q) - aptidão de um produto ou serviço para satisfazer as necessidades expressas ou implícitas do utilizador. No domínio dos exames laboratoriais é a adequação entre os meios utilizados às informações esperadas pelo médico prescriptor e às expectativas do doente;

Sistema da qualidade (SQ) - estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, processos e recursos para implementação e gestão da qualidade;

Controlo da qualidade interno (CQI) - conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados das análises à medida que as mesmas são executadas;

Avaliação externa da qualidade (AEQ) - anteriormente conhecida como controlo externo da qualidade (CEQ), corresponde à avaliação, por um organismo exterior, da qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório.

2.3 - Relatório de exames laboratoriais - documento escrito, validado pelo especialista, contendo os resultados (quantitativos ou qualitativos) dos exames efectuados, acompanhado de comentários sempre que necessário.

2.4 - Confidencialidade - todas as informações relativas aos doentes devem ser consideradas como confidenciais e protegidas pelo segredo profissional.

2.5 - Amostras:

Amostra biológica - amostra obtida pelo acto da colheita e sobre a qual vão ser efectuados um ou vários exames laboratoriais;

Amostra de calibração - amostra de composição definida qualitativa e quantitativamente, para um ou vários constituintes, frequentemente aferida em relação a padrões de referência, destinada à calibração das técnicas;

Amostra de controlo - amostra adaptada aos métodos utilizados, destinada a apreciar a exactidão e a precisão dos resultados.

2.6 - Avaliação - estudo de um procedimento, uma técnica ou um instrumento, para precisar as suas características e adaptação ao fim em vista.

2.7 - Laboratório - é a estrutura onde, sob a responsabilidade de um director técnico, se realizam exames laboratoriais. 2.8 -

Recursos humanos - conjunto das pessoas que desempenham uma função no laboratório, habilitadas com uma qualificação conforme os textos regulamentares e sob a responsabilidade do director técnico do laboratório:

Director técnico do laboratório - especialista em patologia clínica ou em análises clínicas inscrito, respectivamente, na Ordem dos Médicos ou na Ordem dos Farmacêuticos e que exerce as suas funções e competências de acordo com a *leges artis* e a legislação em vigor para as respectivas profissões e especialidades;

Especialista - especialista em patologia clínica ou em análises clínicas inscrito, respectivamente, na Ordem dos Médicos ou na Ordem dos Farmacêuticos e que exerce as suas funções e competências de acordo com a *leges artis* e a legislação em vigor para as respectivas profissões e especialidades;

Técnico superior - indivíduo titular de um diploma do ensino superior universitário, não especialista pela Ordem dos Médicos ou Ordem dos Farmacêuticos, que pela natureza do seu curso exerce funções num laboratório;

Técnico - indivíduo titular de qualificação reconhecida para desempenhar, sob a responsabilidade de um especialista, funções no âmbito da execução de exames laboratoriais;

Auxiliar - todo o indivíduo sem qualificação específica que desempenha no laboratório funções de apoio à execução de exames laboratoriais;

Administrativo - todo o indivíduo que no laboratório desempenha funções não directamente relacionadas com a execução dos exames laboratoriais, nomeadamente as de secretariado, atendimento de doentes, etc.

2.9 - Colheita - acto que permite a obtenção de uma amostra biológica.

2.10 - Procedimentos - instruções escritas, próprias de cada laboratório, descrevendo as operações a efectuar, as precauções a tomar e as medidas a aplicar no laboratório.

2.11 - Sistema analítico - conjunto dos meios analíticos constituído por um método, um aparelho ou conjunto de aparelhos, um ou vários reagentes e materiais, uma ou várias amostras de calibração, uma ou várias amostras de controlo, que permite realizar a determinação de um constituinte segundo um procedimento previamente definido.

2.12 - Qualificação - operação destinada a demonstrar que um sistema analítico ou um equipamento funciona correctamente e dá os resultados esperados.

2.13 - Transferibilidade:

Característica de um procedimento analítico que permite que ele seja utilizado em diversos laboratórios;

Característica de um resultado analítico que permite compará-lo com os obtidos noutros laboratórios.

2.14 - Valores de referência - valores observados para um dado parâmetro analítico numa população de referência.

Podem ser estabelecidos pelo director técnico do laboratório, em função das técnicas analíticas que utiliza, ou eventualmente verificados quando se empregam dados de publicações científicas.

A expressão "valor de referência" é preferível às de "valor usual" ou de "valor normal".

2.14.1 - Valor observado - é o valor de um dado parâmetro analítico obtido por observação ou por medida.

2.14.2 - População de referência - é um grupo particular de indivíduos num estado de saúde cuidadosamente definido em função do ou dos parâmetros analíticos a observar.

2.14.3 - Valores de referência - são todos os valores que podem ser observados na população de referência.

2.14.4 - Distribuição de referência - é a distribuição de probabilidade dos parâmetros observados na população de referência.

2.14.5 - Intervalo de referência - é definido a partir da distribuição de referência em função dos objectivos de utilização.

2.15 - Validação - operação que permite garantir que um resultado foi obtido nas condições técnicas adequadas e é compatível com a história clínica. Esta validação é tanto analítica como biopatológica.

A validação analítica comporta a verificação da conformidade das condições de execução com os procedimentos e tem em conta nomeadamente os resultados obtidos no controlo da qualidade interno.

A validação biopatológica é o controlo da verosimilhança e da coerência do conjunto dos resultados das análises efectuadas para uma pessoa, tendo em conta o seu estado clínico, os tratamentos de que foi alvo e os resultados

anteriores.

## II - Regras de funcionamento

### 1 - Organização:

1.1 - Independência do responsável pelo laboratório - o exercício da direcção técnica do laboratório, nas condições previstas no presente MBPL, de acordo com a legislação vigente e respectivas regras deontológicas, pressupõe total autonomia e independência profissional e técnica do especialista director técnico.

1.2 - Obrigações do responsável pelo laboratório - o director técnico do laboratório deve assegurar que as recomendações contidas no MBPL sejam seguidas no laboratório, assim como nos laboratórios com que estabeleça contratos de colaboração, pelo que é imprescindível a sua intervenção nos actos de gestão com influência na realização dos exames laboratoriais.

1.2.1 - Aspectos gerais - a presença física verificável do director técnico, prevista no n.º 2 do artigo 23.º do Decreto-Lei n.º 217/99, com as alterações introduzidas pelo artigo 1.º do Decreto-Lei n.º 534/99, deve ser compatível com o horário de abertura ao público praticado pelo laboratório, devendo ser substituído nos seus impedimentos por um especialista. Compete ao director técnico representar o laboratório e responder nos aspectos éticos e deontológicos e técnicos perante a sua Ordem e, ainda, garantir que as práticas publicitárias do laboratório sejam adequadas aos princípios ético e deontológicos a que se encontra vinculado.

1.2.2 - No que se refere aos recursos humanos:

- a) Estabelecer o organigrama do laboratório;
- b) Definir os requisitos mínimos (qualificação) para o desempenho de uma função;
- c) Definir o programa de formação para o desempenho de cada tarefa;
- d) Promover a formação contínua;
- e) Verificar que cada operação é confiada a pessoal com qualificação, treino e experiência apropriados;
- f) Pôr à disposição do pessoal os procedimentos gerais e operativos, assim como o presente manual;
- g) Informar o pessoal quanto à entrada em vigor de qualquer novo procedimento e eventuais modificações posteriores;
- h) Garantir a aplicação das medidas referentes à saúde, segurança do pessoal e protecção do ambiente, em certos casos em coordenação com o médico de higiene, saúde e segurança no trabalho e a comissão de higiene e segurança no trabalho.

1.2.3 - No que se refere aos procedimentos gerais e operativos:

- a) Verificar que os procedimentos em vigor, aprovados e datados, são postos em prática pelo pessoal;
- b) Verificar que toda a modificação justificada dos procedimentos é escrita, aprovada, datada, comunicada e que o pessoal é preparado para a aplicação dessa modificação;
- c) Verificar que toda a modificação de procedimentos susceptível de alterar quer a apresentação dos resultados quer a sua entrega implica a informação do prescritor a fim de evitar interpretações erróneas;
- d) Conservar um ficheiro cronológico de todos os procedimentos e conservar em separado um ficheiro morto dos procedimentos em desuso;
- e) Certificar-se da gestão regulamentar dos arquivos. (Cf. capítulo VI).

1.2.4 - No que se refere às instalações, ao equipamento, aos consumíveis e aos reagentes:

- a) Garantir que as instalações e o equipamento estão em boas condições de funcionamento;
- b) Garantir que os produtos consumíveis são apropriados;
- c) Garantir que os consumíveis e reagentes estão disponíveis, dentro do prazo de validade e conservados nas condições definidas pelo fabricante;
- d) Garantir o correcto tratamento e eliminação dos resíduos.

1.2.5 - No que se refere a relatórios dos exames laboratoriais:

- a) Deve garantir que o relatório seja validado por um especialista;
- b) Por sua vez, o especialista deve:

Validar os resultados dos exames laboratoriais depois de se ter certificado de que a sua execução foi conforme as recomendações do MBPL;

Verificar se a informação dos resultados é feita nos prazos compatíveis com a sua boa utilização clínica e em condições de confidencialidade.

1.3 - Obrigações do pessoal:

- a) Ter em conta as recomendações do MBPL;
- b) Obrigar-se a todos os procedimentos operativos em vigor no laboratório;
- c) Submeter-se às regras do segredo profissional;
- d) Procurar estar constantemente actualizado, participando tão regularmente quanto possível em acções de formação profissional.

### 2 - Instalações:

2.1 - Disposição e manutenção - as dimensões, a construção e a localização do laboratório devem estar conformes à actividade nele desenvolvida e à legislação específica em vigor.

A disposição do espaço do laboratório deve favorecer a boa execução das utilizações previstas.

As áreas afectas aos laboratórios devem ter em conta e estar adequadas ao número de doentes atendidos e ao número de amostras processadas no laboratório.

Todos os laboratórios devem ter pelo menos uma área para recepção, uma área para secretariado e arquivo, uma sala para colheitas que permita o isolamento dos doentes, duas áreas afectas a actividades técnicas do laboratório, uma área para lavagem do material e dois lavabos (doentes e funcionários).

A superfície mínima do conjunto das áreas, compreendendo as áreas circulantes, não deve ser inferior a 120 m<sup>2</sup>. As áreas laboratoriais devem formar um conjunto contínuo e devem estar separadas uma das outras.

Devem existir áreas de armazenamento, à temperatura adequada, para as matérias-primas, reagentes e consumíveis. Estas devem ser diferentes das áreas de conservação de amostras biológicas. As áreas de armazenamento de matérias-primas e

ou reagentes tóxicos ou potencialmente perigosos ou contaminantes devem estar separadas (no que diz respeito ao armazenamento o termo "área" não pressupõe para esta qualquer dimensão, pode tratar-se de um simples compartimento separado num armário, ou uma sala).

Devem estar definidos procedimentos para a manutenção dos diversos locais (frequência, produtos e modo de emprego).

2.2 - Segurança - todo o pessoal deverá ser informado das medidas a tomar, quer na prevenção quer em caso de acidente. Devem ser tomadas todas as medidas necessárias para respeitar a legislação sobre riscos de incêndio.

As normas de segurança devem ser adequadas à dimensão, perigosidade e especificidade do trabalho produzido no espaço do laboratório.

**3 - Equipamento** - todos os laboratórios devem possuir o equipamento para a realização das análises que executam, que deve constar no seu regulamento interno.

Para os laboratórios autorizados a trabalhar com isótopos radioactivos, os locais e material devem estar de acordo com a regulamentação específica em vigor.

**4 - Sistemas analíticos** - o laboratório deve manter actualizada uma lista de todas as análises efectuadas com o equipamento existente bem como daquelas que envia para laboratórios com os quais estabeleça contratos de colaboração. Deve dispor do material adequado e necessário à execução das análises que declara efectuar, incluindo as urgentes. Os sistemas analíticos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser escolhidos em função do desempenho pretendido e de estudos realizados de forma independente do fabricante e do distribuidor. Se o sistema escolhido não foi alvo de uma avaliação independente, o responsável deverá certificar-se de que os resultados obtidos são conformes às exigências pretendidas e transferíveis na medida do possível.

4.1 - Instrumentação - devem existir procedimentos predefinidos para a inspecção, limpeza, manutenção e verificação periódicas dos aparelhos. Estas operações, tal como as visitas de manutenção ou reparação da assistência técnica, devem ficar registadas por escrito num livro de ocorrências de cada aparelho.

As normas de utilização e manutenção dos aparelhos devem estar permanentemente à disposição do pessoal e serem respeitadas por este.

Devem estar previstos procedimentos alternativos em caso de mau funcionamento de um aparelho: utilização de outras técnicas ou envio das amostras para outro laboratório.

4.2 - Material e reagentes - o material necessário ao funcionamento dos aparelhos deve ser conforme às normas especificadas pelos fabricantes e ser utilizado apenas com o fim e da forma previstas.

Os laboratórios só poderão utilizar reagentes comerciais que tenham sido registados junto da entidade competente reconhecida pelo Ministério da Saúde, devendo o número do registo figurar na embalagem.

Os reagentes preparados ou reconstituídos no laboratório devem exibir a data da sua preparação ou reconstituição e a data limite da validade. Os de origem externa devem ainda constar de um registo de recepção no laboratório. Em todos os casos relevantes, deve ser assegurada a rastreabilidade dos mesmos. As instruções sobre as condições de armazenamento devem ser respeitadas.

**5 - Informática** - se os laboratórios possuírem um sistema informático, este deverá ser concebido e implementado por forma a evitar os erros e a respeitar a confidencialidade dos dados que contém.

O acesso total ou parcial aos dados deve estar limitado ao pessoal autorizado. Qualquer modificação dos dados ou do programa só pode ser efectuada por pessoal autorizado e deve ser registada.

Deve estabelecer-se um processo que permita evitar a perda da informação em caso de avaria do sistema informático. Devem estar previstos procedimentos alternativos em caso de mau funcionamento do sistema informático.

**6 - Eliminação de resíduos** - a eliminação de resíduos deverá ser conforme à legislação em vigor, deve ser conduzida por forma a não pôr em risco a saúde do pessoal do laboratório ou do pessoal encarregue da sua recolha e não deve ser fonte de poluição do ambiente. De acordo com a legislação em vigor, a responsabilidade da gestão de resíduos perigosos é atribuída ao seu produtor. No entanto, esta responsabilidade poderá ser transferida para uma entidade devidamente autorizada para o efeito, mediante a celebração de um contrato de prestação de serviços.

**7 - Contratos de colaboração entre laboratórios** - a contratação entre laboratórios só é possível se todos estiverem em conformidade com o presente manual e no caso do laboratório requisitante não dispôr de capacidade técnica para a realização de exames que exijam tecnologia especial.

Esta contratação tem de ser estabelecida em protocolo de colaboração que deverá abordar os seguintes aspectos:

Forma de identificação da amostra;

Condições de colheita e conservação da amostra;

Condições de transporte da amostra;

Tempo máximo entre colheita e recepção da amostra;

Tempo máximo para a emissão dos resultados;

Modelo de boletim para a emissão dos resultados.

Estes contratos apenas pressupõem os exames laboratoriais que comprovadamente o laboratório requisitante não possa efectuar.

### III - Execução dos exames laboratoriais

#### 1 - Procedimentos:

1.1 - Regras gerais - o laboratório que realiza exames laboratoriais deve dispôr de procedimentos operativos escritos, datados e tecnicamente validados de modo a assegurar a qualidade dos resultados e a conformidade com MBPL.

Em cada zona de actividade específica do laboratório, os procedimentos operativos relativos às operações que aí são realizadas devem estar disponíveis. Livros, artigos e manuais podem ser utilizados como complementos dos procedimentos operativos.

Estes procedimentos não devem ser fixos, mas sim adaptados à evolução dos conhecimentos e dados técnicos. Qualquer alteração de um procedimento deve ser escrita, datada, aprovada pelo responsável autorizado para esse efeito e divulgada junto do pessoal.

Cada amostra biológica deve ser tratada separadamente para que seja possível relacionar inequivocamente o resultado com a amostra.

1.2 - Aplicações - os procedimentos operativos devem incidir especialmente sobre os seguintes pontos:

A preparação do doente para a colheita a efectuar (jejum, dieta e outras restrições aplicáveis);

O tipo de amostra;

A escolha do recipiente destinado a receber o produto/amostra e eventuais aditivos (anticoagulantes ou outros reagentes);

A identificação do doente (incluindo nome, idade, sexo e informação clínica relevante) e da amostra;

A colheita;

As interferências conhecidas e relevantes (medicamentos, alimentos e dados);

As condições de transporte da amostra;

Os critérios de rejeição da amostra;

O processamento pré-analítico da amostra;

Os reagentes (preparação, utilização, segurança e conservação);

Os aparelhos utilizados (utilização, manutenção, calibração);

O processamento analítico com referência ao método utilizado;

As regras de validação;

A transmissão dos resultados;

A conservação da amostra antes e depois da análise;

A gestão dos sistemas informáticos existentes;

A manutenção dos locais e dos materiais de trabalho (limpeza, organização, condições especiais: temperatura, corrente eléctrica e humidade, quando aplicável);

A garantia da qualidade.

## **2 - Colheita, identificação, conservação e eliminação dos produtos e amostras:**

### **2.1 - Colheita de amostras:**

#### **Realização**

A colheita deve ser efectuada pelo especialista ou por pessoal sob a sua responsabilidade e com formação definida no despacho ministerial para que remete o artigo 30.º do regime jurídico do licenciamento e fiscalização. A data e a hora devem ser registadas.

Todas as não conformidades que decorram durante a colheita devem ser registadas por escrito, de modo que o especialista, ou responsável por ele designado, possa avaliar da necessidade de rejeição da amostra. O especialista deve recusar qualquer colheita efectuada em condições incorrectas. A identidade e a categoria profissional de quem executa a colheita devem ser indicadas e transmitidas ao especialista responsável pela análise.

#### **Material**

A colheita deve ser efectuada, regra geral, com material esterilizado e não reutilizável. O recipiente destinado a receber a amostra deve ser adaptado à natureza da mesma e das análises a efectuar. A natureza, quantidade ou concentração dos aditivos que ele possa conter devem ser claramente identificáveis. O recipiente deve ser concebido de modo a evitar riscos de contaminação do pessoal ou do ambiente.

Todas as precauções devem ser tomadas para o armazenamento e eliminação das agulhas utilizadas nas colheitas.

### **2.2 - Identificação da amostra:**

2.2.1 - Tubos ou recipiente (primários e secundários) - a etiquetagem dos recipientes que contêm a amostra tem que ser feita antes da colheita. A etiquetagem deve ser concebida de modo a evitar qualquer erro de identificação.

2.2.2 - Envio da amostra a outro laboratório - a ficha de envio deve mencionar claramente o número da amostra e ou identificação pessoal, a data e se necessário a hora da colheita. As condições de colheita, conservação e transporte da amostra devem ser as do laboratório receptor, fornecidas ao laboratório emissor por escrito. Qualquer não conformidade deve ser comunicada por escrito. A informação clínica respectiva deve acompanhar a amostra.

A data e hora do envio e da recepção da amostra devem ser registadas.

2.3 - Conservação das amostras - as condições de conservação das amostras devem obedecer às regras de segurança e higiene em vigor de modo a evitar contaminação do pessoal ou do ambiente.

As amostras de calibração e de controlo devem ser conservadas segundo as condições indicadas pelo fabricante e o período de validade deve ser respeitado.

Quando não referida, a congelação das alíquotas obtidas após reconstituição de amostras liofilizadas é da responsabilidade do especialista, devendo ser validada internamente.

As amostras ou alíquotas reconstituídas a partir de substâncias liofilizadas, devem ter a data e a hora da reconstituição. Devem ser tomadas todas as precauções para evitar os fenómenos de evaporação e de contaminação.

As amostras e as respectivas alíquotas devem ser conservadas nas condições que preservem a sua qualidade, até ao seu processamento.

O prazo de conservação da amostra deve ser fixado pelo especialista e referido nos procedimentos operativos.

### **2.4 - Restrições à colheita de amostras:**

2.4.1 - Não é permitida, nos postos de colheita, a obtenção de produtos biológicos destinados a análise cuja realização deva ser imediata, ou cujo resultado possa vir a sofrer alterações com o transporte para o laboratório.

2.4.2 - A colheita só pode ser feita pelo especialista, ou por pessoal sob a sua responsabilidade e com formação reconhecida pelo mesmo, com vínculo contratual ao laboratório.

**3 - Transporte de amostras** - cabe ao director técnico do laboratório, através do regulamento interno, a definição das condições de transporte, tendo em atenção a adequada termostabilização das amostras, de acordo com as suas características e da análise a realizar, atendendo ao tempo e à distância.

O transporte tem de ser efectuado por pessoal e meios próprios do laboratório.

**4 - Validação dos resultados** - a validação dos resultados é dupla: compreende uma validação analítica, que pode ser realizada pelo pessoal que executou a análise sob supervisão do especialista, e uma validação biopatológica, que é da competência exclusiva do especialista.

A validação analítica das análises deve ser feita segundo procedimentos escritos e pressupõe a verificação dos indicadores de bom funcionamento dos instrumentos e o conhecimento dos resultados do controlo da qualidade interno.

A validação biopatológica deve assegurar sempre que possível a compatibilidade dos resultados no mesmo doente ao longo do tempo, tendo em consideração, quando aplicáveis, as variações do seu estado clínico e a terapêutica efectuada. A ficha do doente constitui um dado fundamental para a correcta interpretação dos seus resultados e estudo posterior.

#### **5 - Expressão dos resultados e relatórios de exames laboratoriais:**

5.1 - Expressão dos resultados - a expressão dos resultados deve ser precisa e sem ambiguidades. Os intervalos de referência devem ser indicados quando aplicáveis. Outras informações devem ser mencionadas sempre que relevantes para a interpretação dos resultados.

5.2 - Relatórios - os relatórios devem incluir os seguintes requisitos: identificação, localização do laboratório, local onde foi efectuada a colheita e identificação do responsável técnico. Devem ser validados por um especialista conforme legislação em vigor.

Os relatórios só podem ser fornecidos após a sua validação. Contudo, para casos específicos e predefinidos (e. g. doentes hospitalizados, exames urgentes, determinado tipo de análises) poderão ser transmitidos resultados antes da sua validação sendo o médico assistente informado deste facto, devendo o resultado definitivo validado pelo especialista ser transmitido ao médico assistente no menor lapso de tempo.

#### **6 - Transmissão dos resultados:**

6.1 - Considerações gerais - a transmissão dos resultados deve assegurar o respeito pelo segredo profissional.

Os resultados só podem ser fornecidos ao próprio e ao médico prescriptor ou a qualquer outro médico designado pelo doente, com excepção dos casos específicos previstos pela lei ou regulamentos em vigor. Os resultados são de um modo geral entregues em mão ou enviados pelo correio. Regra geral, a entrega deve ser efectuada em envelope fechado. Quando o doente está hospitalizado, os resultados são enviados ao médico prescriptor e remetidos ao doente, a seu pedido, segundo a regulamentação em vigor.

Se os resultados são transmitidos através de um processo telemático a um outro laboratório ou ao médico prescriptor, o especialista deve assegurar a validade dos resultados transmitidos e o respeito pela confidencialidade.

Quando o doente é um adulto incapaz ou um menor, o especialista só pode dar os resultados ao representante legal, excepto nas situações previstas na legislação.

Quando o resultado de um exame laboratorial põe um jogo um prognóstico vital, o especialista deve avisar o médico assistente do doente o mais rapidamente possível.

Se os resultados não podem ser comunicados ao médico assistente, compete ao especialista informar o doente dos mesmos com tanto mais prudência e sensibilidade quanto mais preocupantes sejam, devendo, então, recomendar ao doente a consulta a um clínico o mais rapidamente possível.

6.2 - Casos particulares:

6.2.1 - A transmissão dos resultados de exames laboratoriais efectuados num quadro de uma investigação médico-legal e de medicina do trabalho deve respeitar a legislação em vigor.

6.2.2 - Os resultados de exames laboratoriais requisitados por companhias de seguros só poderão ser entregues à companhia mediante autorização escrita do doente para o efeito.

### **IV - Exames laboratoriais na investigação clínica**

Em grande parte dos protocolos de investigação clínica são incluídos exames laboratoriais que têm normalmente como objectivos:

Pôr em evidência uma propriedade farmacológica ou terapêutica de um medicamento; e ou

Detectar uma toxicidade susceptível de induzir uma alteração metabólica geral ou uma insuficiência orgânica ou funcional.

No decurso destas experiências deve dar-se na interpretação dos resultados uma importância primordial aos métodos estatísticos empregues, para evitar falsas conclusões no estudo.

**1 - Estabelecimento do protocolo experimental** - é do seu rigor que depende em grande parte a qualidade do estudo.

O protocolo experimental é estabelecido tendo em conta as exigências legislativas e regulamentares, por acordo entre as diferentes partes interessadas: o promotor do estudo, o médico investigador, o director técnico do laboratório e o responsável pelo tratamento estatístico.

Deve descrever detalhadamente as várias etapas e operações do estudo. Para além da natureza, do número e da frequência dos exames requisitados, deve ser dada particular atenção aos seguintes pontos:

Medicamentos administrados (ou seus metabolitos) susceptíveis de falsear alguns resultados analíticos;

Horário das colheitas e a sua relação com a administração dos medicamentos;

Condições de colheita, etiquetagem e transporte para o laboratório, assim como a temperatura e o tempo de conservação em caso de análises diferidas;

Incidência de dias feriados ou fins-de-semana.

Procedimentos operativos claros e detalhados devem ser estabelecidos para uso do pessoal encarregado da colheita, identificação, preparação prévia, transporte e execução das análises.

Os métodos analíticos devem ser escolhidos tendo em conta a sua praticabilidade e desempenho em função dos requisitos do estudo e têm de se manter constantes ao longo do estudo.

No caso de suspeita de toxicidade de produtos administrados detectável pelos métodos analíticos, estes não devem ser executados em diferido.

O relatório deve ser enviado ao médico investigador.

**2 - Realização do protocolo** - o especialista responsável pela execução do protocolo deve vigiar:

A boa execução das análises em conformidade com as instruções deste Manual e as regras do protocolo experimental;

A validação dos resultados;

O relatório dos resultados;

A transmissão do relatório: a boa e rápida execução desta operação é particularmente importante quando a variação de alguns constituintes biológicos possa levar à exclusão desse doente do estudo;

O arquivo de todos os dados analíticos relevantes conducentes aos resultados.

Em estudos multicêntricos, e no caso de se confiar a um só laboratório a realização de determinadas análises, devem estabelecer-se procedimentos operativos para envio das amostras biológicas para o laboratório executante. No caso de não haver esta solução centralizadora, todos os laboratórios incluídos no estudo devem usar rigorosamente os mesmos procedimentos operativos.

**3 - Relatórios de resultados** - para além dos resultados de cada amostra, segundo as instruções do capítulo III, n.º 4, deste Manual, é aconselhável que o especialista responsável pela execução do protocolo estabeleça antes do início do estudo um documento geral sobre todos os métodos analíticos, os métodos de controlo da qualidade e os métodos para interpretação e apresentação dos resultados. Este documento geral deve ser redigido e comunicado ao promotor do estudo e ao médico investigador.

## V - Garantia da qualidade

Todos os laboratórios que executem exames laboratoriais devem ter em funcionamento um sistema de garantia da qualidade baseado nas recomendações deste Manual e traduzido em procedimentos escritos, abrangendo toda a organização do laboratório, as diferentes etapas das análises e sua execução, bem como a formação e qualificação dos diversos tipos de pessoal técnico e administrativo. O sistema de garantia da qualidade deve ser dinâmico e contínuo.

**1 - Responsável da garantia da qualidade** - o sistema de garantia da qualidade do laboratório tem de ter como responsável um especialista.

Este responsável tem que ter a formação adequada e a competência necessária para executar esta tarefa.

**2 - Controlo da qualidade interno** - o controlo da qualidade interno é indispensável para a detecção de anomalias, avaliação de erros e sua imediata correcção. É organizado pelo responsável pelo programa de garantia da qualidade.

**3 - Avaliação externa da qualidade** - o laboratório deve participar em programas de avaliação externa da qualidade, de preferência nacionais, organizados quer pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge quer por sociedades científicas, associações profissionais ou ainda por entidades cuja idoneidade seja reconhecida pela CTN.

Estes programas têm de ser desenvolvidos num clima de confiança recíproca, devendo manter-se confidenciais os resultados individuais neles obtidos.

## VI - Manutenção e conservação de arquivos

**1** - Os laboratórios devem conservar, por qualquer processo, pelo menos durante cinco anos, sem prejuízo de outros prazos que venham a ser estabelecidos por despacho do Ministro da Saúde, ouvida a CTN, os seguintes documentos:

- a) Os resultados nominativos dos exames analíticos realizados;
- b) Os resultados dos programas de garantia de qualidade;
- c) Os resultados das vistorias realizadas pelas comissões de verificação técnica (CVT);
- d) Os contratos celebrados quanto à recolha dos resíduos;
- e) Os acordos relativos à aquisição dos reagentes;
- f) Os protocolos de colaboração com outros laboratórios.

Os contratos e demais documentação relativos à aquisição dos equipamentos devem ser conservados durante todo o tempo em que os mesmos se encontrarem em funcionamento.

O registo das medidas tomadas para corrigir eventuais anomalias detectadas, pelo menos durante um ano.

O registo estatístico das análises efectuadas pelo laboratório ou transmitidas por este a outro laboratório, pelo menos durante cinco anos.

**2** - Os arquivos devem ser guardados em local apropriado com condições de temperatura e humidade que garantam a boa conservação dos documentos.

Devem tomar-se todas as medidas necessárias para assegurar a confidencialidade dos dados nominativos.

Sempre que os documentos são conservados de forma informatizada devem tomar-se precauções para evitar a perda accidental de informação.

A organização e classificação dos documentos deve permitir uma consulta rápida e fácil.

## ANEXO I

### Listagem de nomenclaturas a utilizar

*[artigo 7.º, n.º 4, alínea a), do Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, na redacção do Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro]*

Hematologia

Citologia das células sanguíneas (morfologia e contagem)

Células falciformes (prova da formação com agente redutor).  
 Células falciformes (prova da formação).  
 Corpos de Heinz (pesquisa).  
 Corpos de Heinz (susceptibilidade de formação).  
 Eritrograma (eritrócitos+hemoglobina+hematócrito+índices eritrocitários).  
 Estudo morfológico dos leucócitos pelo método de enriquecimento.  
 Hemograma=hemograma completo (eritrograma+constantes globulares+leucograma+plaquetas).  
 Leucograma (contagem dos leucócitos+fórmula leucocitária).  
 Plaquetas (contagem).  
 Reticulócitos (contagem).  
 Sangue periférico (estudo morfológico do ...).  
 Citoquímica das células sanguíneas  
 DNA dos leucócitos (quantificação).  
 Eosinófilos no exsudado nasal (pesquisa).  
 Esterase específica (cloro acetato).  
 Esterases não específicas (alfa-naftil acetato, butirato, naftol ASD acetato) com fluoreto, cada.  
 Esterases não específicas (alfa-naftil acetato, butirato, naftol ASD acetato), cada.  
 Fosfatase ácida dos leucócitos.  
 Fosfatase ácida dos leucócitos (com inibição pelo tartarato).  
 Fosfatase alcalina dos leucócitos.  
 Mieloperoxidasas.  
 PAS.  
 RNA (identificação pela reacção de ribonuclease).  
 Siderócitos no sangue periférico (pesquisa).  
 Sudão negro.  
 Estudo físico-químico e funcional das células do sangue  
 Auto-hemólise.  
 Carboxihemoglobina (pesquisa).  
 Electroforese das cadeias da globina (a pH alcalino, a pH ácido), cada.  
 Electroforese das hemoglobinas por focagem isoeléctrica.  
 Electroforese das hemoglobinas (pH alcalino, pH neutro, pH ácido), cada.  
 Enzimas dos eritrócitos screening para deficiência, cada.  
 Estudo espectrofotométrico dos pigmentos da hemoglobina (oxi, carboxi, meta e sulfa).  
 Fragilidade osmótica=resistência osmótica.  
 Fragilidade osmótica 24 horas após incubação a 37°C.  
 Glutatião (prova de estabilidade).  
 Glutatião reduzido.  
 Glutatião-reductase.  
 Hemoglobina A2, H, D, E, F, S (com doseamento, cada).  
 Hemoglobinas instáveis (pesquisa de: corpos de Heinz, hemoglobina H, desnat. calor, prec. Isopropanol), cada.  
 Metahemoglobina.  
 Metahemoglobina (pesquisa).  
 Metalbumina.  
 Oxihemoglobina.  
 Piruvato-kinase=PK.  
 Prova da sacarose=prova de hemólise pela sacarose.  
 Prova de Ham=prova do soro acidificado.  
 Sulfahemoglobina (pesquisa).  
 Estudo físico-químico do sangue  
 Hemoglobina plasmática.  
 Velocidade de sedimentação eritrocitária=VS.  
 Viscosidade do sangue.  
 Volémia sanguínea.  
 Citologia citoquímica dos órgãos hematopoiéticos  
 Adenograma (não inclui colheita).  
 Esplenograma (não inclui colheita).  
 Estudo citológico dos líquidos biológicos.  
 Hemosiderina na urina.  
 Imunofenotipagem celular (sangue periférico, medula óssea, gânglio), cada anticorpo.  
 Hemoglobina paroxística nocturna (teste da sucrose).  
 Mielograma (não inclui colheita).  
 Estudo da fragilidade vascular  
 Prova do laço=prova de Rumpel-Leed.  
 Tempo de hemorragia (IVY modificado, duas determinações sem e com AAS).  
 Tempo de hemorragia (IVY modificado).  
 Provas globais e de fase da coagulação sanguínea  
 APTT=tempo de tromboplastina parcial activado=T, de cefalina-caulino.  
 APTT para estudo dos tempos de tromboplastina parcial alongados.  
 Protrombina (prova da correcção do consumo da ...).  
 Protrombina (prova do consumo da ...).



Protrombina (taxa)=tempo de Quick=tempo de protrombina com INR.  
 Prova de Hicks-Pitney.  
 Retracção do coágulo.  
 Tempo de protrombina com terapêutica orientadora.  
 Tempo de recalcificação do plasma.  
 Tempo de recalcificação do plasma activado.  
 Tempo de Reptilase.  
 Tempo de Stypven.  
 Tempo de trombina.  
 Tempo de trombina com sulfato de protamina.  
 Tempo de trombina-coagulase.  
 Escudo funcional e antigénico dos factores da coagulação  
 Criofibrinogénio.  
 Factor I=fibrinogénio.  
 Factor II-C.  
 Factor IX AG=antigénio relacionado com o factor IX.  
 Factor IX-C.  
 Factor V-C.  
 Factor VII-C.  
 Factor VII AG.  
 Factor VIII AG=antigénio relacionado com o factor VIII.  
 Factor VIII-C.  
 Factor VIII-VW=cofactor da ristocetina.  
 Factor von willebrand (pesquisa).  
 Factor X-C.  
 Factor XI-C.  
 Factor XII-C.  
 Factor XIII-C.  
 Fibronectina.  
 P&P de Owen.  
 Tromboteste.  
 Tw o-seven-ten=TST.  
 Pro-activadores da coagulação sanguínea  
 Beta=Tromboglobulina=Beta-TG.  
 Complexo trombina/antitrombina III=TAT.  
 Factor Fletcher=pré-kallicreína.  
 Factor plaquetário 4=PF4.  
 Kallicreína.  
 Prostaciclina (plasmáticas ou urinárias).  
 Tromboxano (plasmáticos ou urinárias).  
 Inibidores globais e dos factores da coagulação sanguínea  
 Anticoagulante lúpico.  
 Anticoagulantes circulantes (pesquisa de ...).  
 Anticorpo anticardiolipina (ACA) (IgG ou IgM), cada.  
 Anticorpo antilúpico.  
 Antitrombina III.  
 Antitrombina III modificada.  
 C4 BBP.  
 Fragmentos L e 2 da protrombina (FL+2).  
 Heparina.  
 Heparina (prova de tolerância à ...).  
 Proteína C da coagulação.  
 Proteína C da coagulação (Ag).  
 Proteína S.  
 Proteína S (funcional).  
 Proteína S (livre).  
 Resistência à proteína C activada.  
 Estudo global da fibrinólise  
 Dímero D da fibrina.  
 Fibrinólise (lise do coágulo de euglobulinas).  
 Fibrinopeptídeo A.  
 Lise das euglobulinas.  
 Lise do coágulo de sangue.  
 Pesquisa de monómeros da fibrina=produtos de degradação da fibrina=PDF=prova do gele etanol.  
 Protamina (prova da ...).  
 Factores fibrinolíticos  
 Alfa-2-antiplasmina.  
 Antiplasmina=inibidor da plasmina.  
 Estreptoquinase.  
 Plasmina.

Plasminogénio.  
 Plasminogénio (activador do ...)=UPA (urokinase) com ou sem estase (cada).  
 Plasminogénio (activador tecidual do ...)=TPA com ou sem estase (cada).  
 Plasminogénio (actividade do ...)=PA.  
 Plasminogénio (inibidor do activador do ...)=PAI.  
 Plasminogénio Ag. (antigénio do plasminogénio)=PA Ag.  
 Estudo funcional das plaquetas  
 Adesividade plaquetária.  
 Agregação plaquetária espontânea.  
 Agregação plaquetária induzida pela adrenalina.  
 Agregação plaquetária induzida pela risocetina (no PRP).  
 Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (FWR: co/plasmático).  
 Agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidónico.  
 Agregação plaquetária induzida pelo ADP.  
 Agregação plaquetária induzida pelo colagénio.  
 Factor plaquetário 3  
 Imuno-hematologia.  
 ABO e Rh (grupo sanguíneo-sistema ABO e Rh).  
 Aglutininas eritrocitárias (identificação das ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (pesquisa com albumina das ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (pesquisa com enzimas de ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (pesquisa em meio salino de ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (titulação com albumina das ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (titulação com enzimas das ...).  
 Aglutininas eritrocitárias (titulação em meio salino das ...).  
 Anticorpos antileucocitários.  
 Anticorpos antiplaquetários.  
 Anticorpos bi-fásicos de Donath-Landsteiner.  
 Antígenos eritrocitários (excl. os do sist. ABO e Rh).  
 Coombs directa (prova de ...).  
 Coombs indirecta qualitativa (prova de ...).  
 Coombs indirecta quantitativa (prova de ...).  
 Crioaglutininas (pesquisa de ...).  
 Crioaglutininas (titulação das ...).  
 Fenótipo Rhesus (aglutinogénios).  
 Iso-hemaglutininas naturais (titulação).  
 Rh (determinação do genótipo).  
 Bioquímica  
 Glúcidos.  
 Ácido láctico=lactatos.  
 Ácido metilmalónico (pesquisa).  
 Ácido oxálico.  
 Ácidos orgânicos.  
 Ácido pipecólico.  
 Ácido pirúvico/piruvado.  
 Açúcares (estudo cromatográfico).  
 Açúcares redutores (pesquisa).  
 Curva de hiperglicémia provocado duas horas com cinco doseamentos de glicose=prova oral de tolerância à glicose de quatro horas com cinco doseamentos de glicose.  
 Curva de hiperglicémia provocado três horas com quatro doseamentos de glicose=prova oral de tolerância à glicose de três horas com quatro doseamentos de glicose.  
 Frutosamina.  
 Frutose.  
 Frutose (sobrecarga endovenosa).  
 Frutose 1 fosfato aldolase.  
 Frutose 1,6 difosfato-aldolase.  
 Frutose 1,6 difosfatase.  
 Galactose.  
 Galactose-6-sulfatase.  
 Galactose sobrecarga endovenosa.  
 Galactose (prova de tolerância à ...).  
 Glicogénio.  
 Glicosaminoglicanos (doseamento e separação).  
 Glicosaminoglicanos (electroforese bidimensional).  
 Glicose.  
 Glicose após ingestão de 50 g de glucose.  
 Glucagina - sobrecarga endovenosa.  
 Glucocerebrosidase.  
 Glutamina.  
 Hemoglobina A1c=hemoglobina glicosilada.

Lactose.  
Lactose (prova de tolerância à ...).  
Levulose.  
Oligossacáridos - pesquisa e identificação.  
Pentoses (pesquisa de ...).  
Rastreo de galactosemia do recém-nascido.  
Prótidos  
Ácido cítrico.  
Ácido fenilpirúvico (doseamento).  
Ácido fenilpirúvico pesquisa.  
Ácido gama-aminobutírico=GABA.  
Ácido glutâmico (doseamento).  
Ácido homogentísico (doseamento).  
Ácido úrico.  
Ácidos aminados (sep. cromatog. bidimensional).  
Ácidos aminados (sep. cromatog. unidimensional).  
Adenosinotriphosfato=ATP.  
Alanina - sobrecarga oral.  
Albumina.  
Alfa-1 antitripsina.  
Alfa-1 antitripsina (fenotipagem).  
Alfa-1 quimotripsina.  
Alfa-2 macroglobulina.  
Aminoácidos (sangue, urina ou LCR).  
Aminoacidúria total.  
Amônia.  
AMP=adenosina monofosfato.  
ANP péptido natriurético auricular.  
Apolipoproteína A.  
Apolipoproteína B.  
Apolipoproteína C.  
Apolipoproteína E ou outras, cada.  
Apolipoproteína Lp(a).  
Arginase.  
Arginino-succinato-liase.  
Arginino-succinato-sintetase.  
Arisulfatase C e esteroide sulfatase.  
Aspartilglucosaminidase.  
Azoto dos ácidos aminados.  
Azoto total não proteico.  
Beta-1 glicoproteína por imunensaio.  
Beta-2 microglobulina.  
Carnitina muscular.  
Carnitina total e livre.  
CDT transferrina deficiente em carbo-hidratos.  
Ceruloplasmina.  
Cistina intraleucocotária.  
Cistina (pesquisa de ...).  
Cistinúria (doseamento de ...).  
Clearance da creatinina.  
Creatina.  
Creatinina.  
Criglobulinas (caracterização das ...).  
Criglobulinas (pesquisa de ...).  
Electroforese das proteínas=proteinograma (inclui proteínas totais).  
Electroforese das proteínas em liq. biológicos, após sua concentração.  
Fenilalanina.  
Fenilcetonúria=PKU (pesquisa de ...).  
Ferritina.  
Glicoproteínas (electroforese das ...).  
Haptoglobina.  
Hemoglobina (pesquisa de ...).  
Hemopexina.  
Hemossiderina na urina (pesquisa de ...).  
Histidina, pesquisa de metabolitos por cromatografia.  
Homocistina total.  
Homocistina (pesquisa de ...).  
L-Dopa.  
Melanina (pesquisa de ...).  
Microalbuminúria.

Mioglobina um doseamento.  
Mioglobina (pesquisa de ...).  
Mucopolissacaridasas na urina (est. cromat. camada fina e coluna).  
Mucopolissacáridos (estudo cromatográfico).  
Mucopolissacáridos (pesquisa de ...).  
Mucoproteínas.  
Osteocalcina.  
Proteína Bence-Jones com caracterização imunológica.  
Proteínas totais.  
Prova de sobrecarga de metionina, com dois doseamentos de homocisteína total.  
Transferrina.  
Trimetilamina (pesquisa).  
Troponina.  
Ureia.  
Ureia (depuração da ...).  
Lípidos  
Acetona=corpos cetônicos.  
Ácido acetoacético/acetoacetato.  
Ácido beta-hidroxibutírico.  
Ácido diacético.  
Ácido diacético (pesquisa de ...).  
Ácido 3-hidroxibutírico/3-hidroxibutirato.  
Ácidos gordos (cromatografia).  
Ácidos gordos esterificados.  
Ácidos gordos livres.  
Apoproteína E (identificação de isomorfias).  
Aril sulfatase A ou B (cada).  
Aspecto do soro após refrigeração=supernatant creaming.  
Colesterol HDL.  
Colesterol HDL 2.  
Colesterol HDL 3.  
Colesterol LDL.  
Colesterol total.  
Colesterol total, livre e esterificado.  
Colesterol VLDL.  
Corpos cetônicos (pesquisa).  
Electroforese das lipoproteínas=lipoproteinograma.  
Esfingolipidos.  
Ésteres dos ácidos gordos.  
Ficha lipídica=lípidograma (colesterol+triglicéridos+colesterol HDL+LDL+lipoproteinograma se necessário).  
Fosfolípidos.  
Gorduras totais nas fezes de 3 dias.  
Hexosaminidase total.  
Lecitina-colesterol-acetiltransferase (LCAT).  
Lipoproteína lipase (LPL).  
Perfil lipídico (separação por ultracentrifugação).  
Razão palmítica/esteárica.  
Triglicerídeos.  
Triglicérido-Lipase-Hepática TGHL.  
Enzimas  
5-Núcleotidase=5-NT.  
Acetilcolinesterase.  
Acetilcolinesterase isoenzimas.  
Adenosina desaminase=ADA.  
Aldolase.  
Alfa-1-Hialuronidase.  
Alfa-amilase pancreática.  
Alfa-amilase salivar.  
Alfa-fucosidade.  
Alfa-galactosidade.  
Alfa-hiduronidase.  
Alfa-manosidade.  
Alfa-N-acetil-galactosaminidase.  
Alfa-N-acetil-glucosaminidase.  
Alfa-neuraminidase.  
Amilase.  
Aminopectidase.  
Aminopectidase A.  
Aril-sulfatase A.  
Aril-sulfatase B.

Beta-galactosidase.  
 Beta-glucoronidase.  
 Beta-glucosidase.  
 Beta-hexosaminidase A.  
 Beta-hexosaminidase total.  
 Betamansidase.  
 Biotinidase sangue em papel de filtro.  
 Biotinidase soro.  
 Chitotriosidase.  
 CK=CPK=creatinafosfoquinase.  
 CK MB=creatinafosfoquinase fracção MB.  
 CK MM=creatinafosfoquinase MM.  
 Colinesterase.  
 Desidrogenase alfa-hidroxi-butírica=HBDH.  
 Desidrogenase glutâmica=GLDH.  
 Desidrogenase isocítrica=ICDH.  
 Desidrogenase láctica=LDH (separação térmica das isoenzimas).  
 Desidrogenase láctica=LDL=DHL.  
 Desidrogenase málica=MDH.  
 Desidrogenase sorbitica=SDH.  
 Di-hidro-acetona-fostato-acetiltransferase.  
 Dipeptidil-aminopeptidase IV.  
 Dissacaridasas.  
 Enzima conversor da angiotensina=SACE.  
 Esfingomielinase.  
 Estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial.  
 Estudo do défice de adenilo-succinase (teste de Bratton Marshal).  
 Fosfatase ácida total.  
 Fosfatase ácida total e fracção prostática.  
 Fosfatase alcalina.  
 Fosfatase alcalina (isoenzima ósseo - doseamento).  
 Fosfatase alcalina (sep. electroforética das isoenzimas da ...).  
 Fosfoglicero-mutase.  
 Fosfohexose-isomerase=PHI.  
 Fosforilases.  
 Galacto aminase (pesquisa).  
 Galactocerebrosidade.  
 Galacto-1-fosfato-uridiltransferase.  
 Galactose-1-fosfato-glutamil-transferase.  
 Galactotransferase (pesquisa de ...)=spot test.  
 Galactotransferase eritrocitária.  
 Gama glutamil transferase (GGT).  
 Glucoroniltransferase da uridina difosfato.  
 Glucose-6-fosfato desidrogenase.  
 GOT=AST=aminotransferase aspartato.  
 GPT=ALT=alanina aminotransferase.  
 Hexosaminidase A.  
 Hexosaminidase A+B.  
 Hialuronidase.  
 Isoamilase.  
 Isoenzimas da CK (sep. electrof. das isoenzimas da CK).  
 LAP=leucina-aminopeptidase.  
 L-Fucosidase.  
 Lipase.  
 Lisozima=muramidase.  
 Mansidase.  
 N-Acetil-glucosaminidase=NAG.  
 Ornitino-carbamiltransferase.  
 Oxidase do ácido fitânico.  
 Pepsina.  
 Piruvato-carboxilase.  
 Piruvato-desidrogenase, det. enzimática.  
 Quimotripsina.  
 Tripsina.  
 Marcadores tumorais  
 Alfa-fetoproteína.  
 Antígeno carcino-embrionário (CEA).  
 CA - 125.  
 CA - 19.9.  
 CA - 15.3.

CA - 19.5.  
 CA - 50.  
 CA - 54.9.  
 CA - 72.4.  
 CA - 54.9.  
 CYFRA.  
 Fosfatase ácida prostática-PAP (imunoensaio).  
 Marcadores tumorais não incluídos nesta tabela.  
 MCA.  
 NSE.  
 PSA.  
 PSA total=antígeno específico da próstata.  
 Iões e equilíbrio ácido base  
 Ácido clorídrico livre e acidez total (cont. gástrico e ou duod.) sem colheita.  
 Bicarbonatos.  
 Cálcio (absorção atômica).  
 Cálcio ionizado.  
 Cálcio total.  
 Capacidade total de fixação do ferro.  
 Cloreto de amônio.  
 Cloro.  
 Equilíbrio ácido-básico (pH, PC O2, SAT O2 e excesso de base tampão, bicarbonato)=gases no sangue.  
 Ferro.  
 Ferro (absorção atômica).  
 Fósforo inorgânico.  
 Ionograma (Na, K, Cl).  
 Magnésio.  
 Magnésio (absorção atômica).  
 Magnésio eritrocitário.  
 Osmolaridade.  
 pH (determinação do ...).  
 Potássio.  
 Sódio.  
 Suor (determinação dos cloretos ou sódio no ...), após estimulação por iontoforese com pilocarpina.  
 Oligoelementos  
 Alumínio (absorção atômica).  
 Cobre (absorção atômica).  
 Cobre sérico (dos. químico).  
 Flúor.  
 Lítio.  
 Reserva alcalina.  
 Selênio (absorção atômica).  
 Zinco (absorção atômica).  
 Vitaminas  
 Ácido fólico.  
 Ácido formitino-glúâmico=FIGLU.  
 Caroteno.  
 Vitamina A.  
 Vitamina B12.  
 Vitamina C=ácido ascórbico.  
 Vitamina D, cada.  
 Vitamina E.  
 Vitaminas do complexo B (B1; B2; B6; ac. nicotínico) cada.  
 Drogas e tóxicos  
 Álcool etílico.  
 Amikacina.  
 Aminofilina=teofilina.  
 Amiodarona.  
 Anfetamina.  
 Antiepilépticos (cada).  
 Antiparkinsonianos (cada).  
 Arsênio (pesquisa de ...).  
 Benzodiazepinas (cada).  
 Cádmi (doseamento por abs. atômica).  
 Canabinóides.  
 Carbamazepina.  
 Chumbo (abs. atômica).  
 Ciclosporina.  
 Clonazepam.  
 Cocaína.

Crómio.  
Difenil-hidantoína=fenintoína=hidantina.  
Digoxina.  
Disopiramida.  
Drogas de abuso (pesquisa), cada.  
Etosuccimida.  
Fármacos (não discriminados na tabela), cada.  
Fenobarbital ou outros barbitúricos, cada.  
Gentamicina.  
Kanamicina.  
Lidocaína.  
Mercúrio (absorção atómica).  
Mercúrio, pesquisa.  
Metadona.  
Metrotexato.  
Morfina.  
Netilmicina.  
Opiáceos, cada.  
Primidona.  
Procainamida.  
Propranolol.  
Quinidina.  
Selénio (abs. atómica).  
Tobramicina.  
Warfarina.  
Porfirinas, bilirrubina e ácidos biliares  
Ácido delta-aminolevulínico=ALA.  
Ácidos biliares conjugados e não conjugados na bñlis (pesquisa e identificação).  
Bilirrubina (pesquisa de...).  
Bilirrubina total.  
Bilirrubina total+directa e indirecta.  
Coproporfirinas.  
Pigmentos biliares (pesquisa de ...).  
Porfiringa eritrocitária livre.  
Porfirinas (uro+coproporfirinas).  
Porfobilinogénio.  
Protoporfirinas.  
Sais biliares (doseamento).  
Urobilina (pesquisa de ...).  
Urobilinogénio (pesquisa de ...).  
Uroporfirinas.  
Uroporfirinas (pesquisa de ...).  
Diversos  
Ácido pristânico.  
Ácido siálico.  
Ácidos fitânicos.  
Addis=contagem minutada (contagem ou prova de ...).  
Amido (prova de tolerância ao ...) - não inclui produtos administrados.  
Cálculo urinário.  
Cloraminas.  
Concentração urinária (prova de ...).  
Cross-laps=telopéptido aminoterminal do colagénio.  
Densidade.  
Diluição urinária (prova de ...).  
Gonadotrofinas coriônicas.  
Grau de digestão dos alimentos, nas fezes.  
Gravidez (diagnóstico imunológico da ...)=DIG=TIG.  
Hidroxiprolina.  
NTX - telopéptido aminoterminal do colagénio.  
Fridinolina/desopiridinolina, cada.  
Phénistix.  
Plasmogéneos.  
Prova da estimulação pela secretina.  
Prova da xilose.  
Prova de estimulação do suco gástrico pela pentagastrina.  
Prova de estimulação do suco gástrico pelo histalog.  
Prova de estimulação pela pancreozimina.  
Prova de sobrecarga de ácido fenilpropiónico com cromatografia de ácidos orgânicos.  
Sangue oculto (pesquisa de ...).  
Substâncias metacromáticas na urina (pesquisa de ...).

Succinilacetona.  
 Sulfatídeos.  
 Sulfatos.  
 Sulfiteste.  
 Sulfitos.  
 Urina II (análise sumária da urina, inclui sedimento urinário).  
 VIP - vasoactive peptide intestinal.  
 Endocrinologia laboratorial e estudo funcional dos metabolismos, órgãos e sistemas  
 Doseamentos hormonais  
 Hormonas do eixo hipotálamo-hipofisário  
 ACTH (cada doseamento).  
 FSH=hormona foliculo-estimulante.  
 GH=STH=somatotrofina=hormona do crescimento.  
 Hormona antidiurética=ADH=vasopressina.  
 Hormona lactogénica placentária=HPL.  
 Hormona luteo-estimulante=LH.  
 Hormona tireo-estimulante=TSH.  
 IGF BP1=somatomedina C.  
 IGF BP3.  
 Progesterona=PROG=PRG.  
 Prolactina=PRL.  
 Hormonas da tiróide  
 Calcitonina.  
 T3.  
 T3 livre.  
 T3 reverse.  
 T4.  
 T4 livre.  
 TBG=globulina ligada à tiroxina.  
 Tioglobulina.  
 Hormonas da paratiróide  
 AMP cíclico.  
 Parathormona=PTH.  
 Hormonas das gónadas  
 17-alfa-hidroxiprogesterona.  
 Beta-HCG=unidade beta da gonadotrofina coriónica.  
 Estradiol=E2.  
 Estriol=E3.  
 Estrogénios fraccionados na urina por HPLC.  
 Estrogénios totais (E1+E2+E3).  
 Estrona=E1.  
 Prova de synacten três análises de 17-OH-progesterona).  
 Receptores celulares de estrogénios.  
 Receptores celulares de progesterona.  
 SHBG - globulina ligada às hormonas sexuais.  
 Testoterona livre.  
 Testoterona total.  
 Hormonas supra-renais  
 17-cetosteróides fraccionados.  
 17-cetosteróides totais=17-KS.  
 Ácido homovanílico=HVA.  
 Ácido vanilmandélico=AVM.  
 Aldosterona.  
 Angiotensina I ou II, cada.  
 Catecolaminas fraccionadas (adrenalina e NOR adrenalina+dopamina) para HPLC.  
 Catecolaminas totais.  
 Composto S=desoxicortisol.  
 Cortisol=hidrocortisona=composto F.  
 Dehidroepiandrosterona (DHEA-SO4 ou DHEA), cada.  
 Delta-4-androstenodiona=delta-4-A.  
 Metanefrinas totais.  
 Metanefrinas totais (metanefrina+nor-metanefrinas ou epinefrina+nor-epinefrinas) por HPLC.  
 Pregnanedriol (DRIOL).  
 Pregnanetriol (TRIOL).  
 Hormonas gastrintestinais e pancreáticas  
 Ácido 5-hidroxi-indolacético=5-HIAA.  
 Colecistoquinina.  
 Gastrina.  
 Glucagina=glucagon.  
 Insulina (cada doseamento).



Peptido C.  
 Secretina.  
 Serotonina.  
 Hormonas renais  
 Eritropoietina.  
 Renina (actividade plasmática da ...).  
 Endorfinas  
 Beta-endorfina.  
 Provas de estimulação e inibição glandulares endócrinas  
 Do eixo hipotálamo-hipofisário  
 Prova da clonidina com doseamentos hormonais.  
 Prova da L-Dopa com ou sem propanolol com doseamento STH (cada doseamento).  
 Prova de clomifene alargada (doseamentos de LH, FSH, estradiol, testosterona, cada doseamento).  
 Prova de clomifene com doseamentos: 2 LH, 2 FSH, 2 E<sub>2</sub>, 2 testosterona.  
 Prova de estim. da STH pelo exercício, cada determ. de STH.  
 Prova de estimul. com LRH com 3 doseamentos de LH e 3 de FSH, cada.  
 Prova de estimul. com TRH com doseamentos de TSH, cada.  
 Prova de estim. múltipla para TRH, LRH e hipoglicémia (7/glicémia, 6/STH, 5/cortisol, 4/PRL, 4/FSH, 4/L, 5/ACTH).  
 Prova de estimulação múltipla alarg. pelo TRH, LRH e hipoglic. com dos. PRL, TSH, FSH, LH, ACTH, cortisol, cada.  
 Prova de glucagon com doseamentos de STH, cada doseamento.  
 Prova de hipoglicémia insulínica (IV) com doseamentos hormonais, cada determinação.  
 Prova de inibição da STH após sobrecarga glucídica, cada dos. de STH.  
 Da supra-renal  
 Prova da metopirona com 2 dos. comp. sem 17 cetosteroides (cada).  
 Prova de estimulação com ACTH, com doseamentos de cortisol (cada).  
 Das gónadas  
 Prova da gonadotrofina coriônica com doseamentos de testosterona e estradiol, cada doseamento.  
 Do pâncreas  
 Prova de hiperglicémia provocada com doseamentos de insulina simultâneos, cada.  
 Microbiologia  
 Bacteriologia  
 Anaeróbios (pesquisa e identificação de ...).  
 Antibiograma para bacilos ácido-resistentes (cada tuberculostático).  
 Antibióticos (determinação da concentração inibitória mínima, cada).  
 Autovacina.  
 BK (ex. directo com e sem homogeneização para pesquisa de ...)=Mycobacterium tuberculosis.  
 BK (exame directo e cultural)=Mycobacterium tuberculosis.  
 Bacilo diftérico=bacilo Loeffler=Corynebacterium diphtheriae (pesquisa com exame cultural).  
 Bacilos de Hansen (pesquisa de ...)/Mycobacterium leprae.  
 Bactérias (imunofluorescência para identificação de ...).  
 Bacteriológico cult. em aerobiose, com estudo paralelo em anaerobiose com eventual antibiograma.  
 Bacteriológico directo e cultural com identificação+micológico e parasitológico com eventual antibiograma.  
 Bordetela pertussis (exame cultural e identificação).  
 Brucella (hemocultura para ...).  
 Chlamydia trachomatis (pesq. por imunofluorescência).  
 Chlamydia trachomatis (pesquisa em cultura de células da ...).  
 Citobacteriológico (ex. directo, cultural com identificação e eventual contagem de colónias e antibiograma).  
 Coprocultura=exame bacteriológico de fezes (incl. pesq. de salmonella, shigella e staphylococcus).  
 Escherichia coli enteropatogénica (exame cultural e identificação serológica).  
 Espermocultura com eventual antibiograma.  
 Estreptococos (identificação imunológica dos ...).  
 Estreptococos beta-hemolíticos (pesquisa).  
 Helicobacter (exame cultural e identificação).  
 Hemocultura (inclui estudo em anaerobiose e respectivas subculturas).  
 Hemocultura (incluindo três subculturas).  
 Inoculação no cobaio.  
 Legionella sp. pesq. e identif. (cult. e serologia por imunofluorescência).  
 Listéria (exame cultural e identificação).  
 Mielocultura (sem colheita).  
 Mycoplasma urealyticum ou ureaplasma urealyticum (exame cultural) cada.  
 Neisseria gonorrhoeae (exame directo e cultural).  
 Neisseria meningitidis (exame directo e cultural).  
 PCR (polymerase chain reaction) para pesquisa e identificação de bactéria.  
 Salmonella e shigella (exame cultural e identificação com serotipagem).  
 Staphylococcus (exame cultural e identificação da espécie).  
 Streptococcus beta haemoliticus (exame cultural e identificação serológica).  
 Treponema (pesquisa microscópica em fundo escuro do ...).  
 Vibrio cholerae (exame cultural e identificação).  
 Yersinia (exame cultural e identificação).  
 Micologia

Exame micológico directo.  
 Exame micológico (directo, cultura e identificação).  
 Parasitologia  
 Filária (pesquisa de ...).  
 Giárdia Lamblia (pesquisa no líquido de lavagem duodenal) sem colheita.  
 Leishmania (pesquisa de ...).  
 Parasitológico (exame ...), cada amostra.  
 Parasitológico (exame) por IFP para identificação, cada.  
 Plasmodio (pesquisa de ...) e identificação.  
 Toxoplasma (pesquisa de ...).  
 Trypanossoma (pesquisa de ...).  
 Virulogia  
 ADN viral em amostras biológicas - quantificação.  
 ARN viral em amostras biológicas - quantificação.  
 Cultura de vírus não orientada e identificação.  
 Cultura de vírus orientada e identificação.  
 Genotipagem do vírus C da hepatite com recurso a técnicas de RT-PCR e sondas moleculares específicas (quatro tipos ou subtipos).  
 HBV - pesquisa de ADN do vírus B da hepatite por PCR ou técnica afim.  
 HCV - pesquisa de ARN do vírus C da hepatite por RT-PCR ou outra técnica de amplificação.  
 HCV (quantificação da virémia ou "carga viral").  
 HDV - pesquisa de ADN do vírus D da hepatite por PCR ou outra técnica de amplificação.  
 HEV - pesquisa de ADN do vírus E da hepatite por PCR ou outra técnica de amplificação.  
 HIV 1 - pesquisa de ARN do vírus 1 da imunodeficiência humana por RT-PCR ou técnica similar.  
 HIV 1 (quantificação do ARN do vírus ou "carga viral").  
 HIV 2 - pesquisa de ARN do vírus 2 da imunodeficiência humana por RT-PCR ou técnica similar.  
 HPV - pesquisa e identificação, para captação híbrida.  
 Identificação de vírus por PCR ou técnica afim.  
 Rotavírus (determinação do tipo electroforético).  
 Rotavírus (pesquisa por hemaglutinação ...).  
 Vírus (colheita, isolamento e identificação em cult. cel. de ...).  
 Vírus (identificação por IF ou ELISA ...), cada.  
 Vírus responsáveis por inf. respiratórias (pesq.), cada.  
 Vírus sincicial, pesquisa.  
 Imunologia  
 Imunologia celular  
 Ac. antiplaquetários (pesquisa contra painel plaquetário com HLA).  
 Antígeno HLA (determinação da presença de um ...).  
 Citotoxicidade celular.  
 Citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC).  
 Cultura linfocitária mista entre linfócitos de dois indivíduos (MLC).  
 Cultura linfocitária mista entre linfócitos de dois indivíduos (MLC) - cada dador adicional.  
 Desgranulação dos basófilos (teste da ...), cada antígeno.  
 Estudo da função fagocítica dos leucócitos (neutrófilos, monócitos, macrófagos), cada.  
 Estudo da função fagocítica e microbicida intracelular dos leucócitos (neutrófilos, monócitos, macrófagos), cada.  
 Iso-hemaglutininas naturais (titulação das ...).  
 Leucócitos - determinação dos receptores celulares.  
 Libertação leucocitária de histamina (prova de ...).  
 Linfócitos - resposta a antígenos "in vitro" por estimulação em cultura.  
 Linfócitos B - imunoglobulinas (CIG) intracitoplasmáticas (determ. das ...), cada anti-soro.  
 Linfócitos B - ind. blástica por mitogénio, cada mitogénio.  
 Linfócitos B - rosetas espontâneas com eritrócitos de ratinho.  
 Linfócitos B - detecção IG da superf. da memb. (SIG - LF), cada anti-soro.  
 Linfócitos B - receptores FC (estudos dos ...).  
 Linfócitos B - síntese das imunoglobulinas (IG) in vitro.  
 Linfócitos T - indução blástica por mitogénios (PHA, COM A, PWN), resp. a cada.  
 Linfócitos T - rosetas espontâneas (E), com eritrócitos de carneiro.  
 Linfócitos T - inibição da migração após estim. por mitogénios.  
 Linfócitos T - linfoólise med. por células.  
 Prova cutânea de hipersensibilidade retardada (PCHR), mínimo quatro antígenos.  
 Quantificação de populações celulares (linfocitárias/outras), CD, com AC monoclonais, cada marcador.  
 Quimiotaxia de células fagocíticas (neutrófilos/monócitos/macrófagos).  
 Redução do NBT por leucócitos - teste do NBT.  
 Teste linfocitário de pré-estimulação PTL.  
 Tipagem HLA classe I (A, B, C), cada classe.  
 Tipagem HLA classe II (HLA-DR, DQ, DP), cada classe.  
 Imunoquímica  
 Alfa-1 antitripsina.  
 Alfa-1 antitripsina (fenótipos).  
 Alfa-1 glicoproteína ácida (ou orosomucóide).

Alfa-2 macroglobulina.  
 Anticorpos IgG4 específicos, cada antígeno.  
 Beta-1-glicoproteína para imunoensaio.  
 Beta-2-microglobulina.  
 C'3 (C'3C).  
 C'3 (inactivador de ...).  
 C'3 PA (pró-activador).  
 C'4.  
 Cadeias leves de imunoglobulinas (kappa e lambda) - dos., cada.  
 Cadeias leves de imunoglobulinas (kappa e lambda) na urina dos., cada.  
 Citocinas (interferões interleucinas, outras), cada.  
 Complemento - fragmentos de activação (C3D, C4D, MAC, outros), cada.  
 Complemento (fragmentos activados: C3A, C5A, ETC), cada.  
 Complemento total (título de actividade hemolítica - CH 50).  
 Complemento, factores (C1q, C2, C5, C6, C7, C8 e C9), cada.  
 Crioglobulinas (caracterização imunoquímica).  
 Crioglobulinas (pesquisa de ...).  
 Crioglobulinas (pesquisa e caracterização imunoquímica, se necessário).  
 Electroimunofixação das proteínas (total+IgG+IgA+IgM+CL kappa+CL lambda).  
 Electroimunofixação das proteínas após concentração (mínimo quatro anti-soros).  
 Factor reumatóide, doseamento com determinação do tipo de cadeia pesada (A, G, M).  
 Factor reumatóide, RA teste.  
 Histamina.  
 Identificação de precipitinas, cada.  
 IgE específica para um determinado alérgénio (rast test), cada.  
 IgE específica para um grupo de alérgenos=phadiotop ou multialérgenos.  
 Imunocomplexos (téc. do cons. do complemento, medida pelo CH50).  
 Imunocomplexos (técnica de fixação C'1q).  
 Imunocomplexos circulantes (técnica de inibição de factor reumatóide).  
 Imunocomplexos circulantes (técnica de nefelometria simples).  
 Imunocomplexos, identificação dos componentes após precipitação pelo PEG.  
 Imunoelectroforese das proteínas (total+IgG+IgA+IgM+CL kappa+CL lambda).  
 Imunoelectroforese das proteínas com concentração prévia da amostra (LCR, urina, ...).  
 Imunoglobulina A - secretora (pesq.).  
 Imunoglobulina A (IgA).  
 Imunoglobulina D (IgD).  
 Imunoglobulina E (IgE).  
 Imunoglobulina G (IgG).  
 Imunoglobulina M (IgM).  
 Imunoglobulinas (IgA+IgG+IgM).  
 Inactivador da esterase do C1.  
 Inactivador da esterase do C1, teste funcional.  
 Metil-histamina.  
 Mieloperoxidase.  
 Proteína C - reactiva (doseamento da ...).  
 Proteína catiónica do eosinófilo (ECP).  
 Proteína X do eosinófilo.  
 Prova de Sai.  
 Receptores solúveis de citocinas.  
 Subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) cada.  
 Subclasses de imunoglobulina A (IgA1 e IgA2), cada.  
 Tipagem de alótipos de imunoglobulinas (GM/INU/GC).  
 Triptase.  
 Waaler-rose (reacção de ...).  
 Auto-imunidade  
 Anca=anticorpos anticitoplasma dos neutrófilos C ou P, cada.  
 Anticorpos anti-AND nativo=anti-DNA ou anti-AND.  
 Anticorpos antiantígenos nucleares extraíveis (ENA) - SM/RNP/ SS-A/SS-B, outros, cada.  
 Anticorpos anticardioplipina (IgA).  
 Anticorpos anticardioplipina (IgG+IgM).  
 Anticorpos anticélula parietal gástrica (com titulação, quando necessário).  
 Anticorpos anticentómetro.  
 Anticorpos antiducto-salivar.  
 Anticorpos antielastina.  
 Anticorpos antiendomisio.  
 Anticorpos antiesperma.  
 Anticorpos antifactor intrínseco.  
 Anticorpos antifosfolípideo (IgA).  
 Anticorpos antifosfolípideo (IgG+IgM).  
 Anticorpos anti gliadina IgA ou IgG, cada.

Anticorpos anti-histonas.  
 Anticorpos anti-hormona do crescimento (anti-HGH).  
 Anticorpos anti-ilhéus de langerhans.  
 Anticorpos anti-insulina.  
 Anticorpos anti-LC1 (citosol hepático).  
 Anticorpos anti-LKM-anti-liver, kidney microsome.  
 Anticorpos antimembrana basal glomerular (GBM).  
 Anticorpos antimembrana basal glomérulo renal.  
 Anticorpos antimembrana basal tubular.  
 Anticorpos antimieloperoxidase (MPO).  
 Anticorpos antimitocondria por IF (com titulação, se positivos).  
 Anticorpos antimitocondriais (M1, M2, outros).  
 Anticorpos antimúsculo estriado por IF (com titulação, se positivos).  
 Anticorpos antimúsculo liso por IF (com titulação, se positivos).  
 Anticorpos antinucleares por IF (com titulação, se positivos).  
 Anticorpos antiovário.  
 Anticorpos antipâncreas exócrino.  
 Anticorpos antiproteinase 3 (PR3).  
 Anticorpos antiqueratina.  
 Anticorpos antiqueratina (esófago de rato).  
 Anticorpos anti-receptor da insulina.  
 Anticorpos anti-receptor de acetilcolina.  
 Anticorpos anti-receptor TSH=TRABS.  
 Anticorpos anti-reticulina.  
 Anticorpos anti-reticulina.  
 Anticorpos anti-SCL 70.  
 Anticorpos anti-supra-renal.  
 Anticorpos anti-testículo.  
 Anticorpos anti-tiroideus (antitiroglobul.+antimicros.).  
**Imunoserologia**  
 Anticorpos antitripanossoma.  
 Anticorpos antiagentes microbianos, víricos, parasitários, fúngicos ou outros, não incluídos nesta tabela (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-Adenovirus (titulação por FC).  
 Anticorpos anti-Brucela (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-Citomegalovirus (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-Clamidia trachomatis (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-Coxiella burnetii=febre Q.  
 Anticorpos antidiftéricos.  
 Anticorpos antienterovírus.  
 Anticorpos antiequinococo.  
 Anticorpos antiestreptodornase.  
 Anticorpos antiexoenzimas estreptocócicos, pesquisa.  
 Anticorpos antiexoenzimas estreptocócicos, titulação.  
 Anticorpos anti-HbC (IgG)=anti-HbC.  
 Anticorpos anti-HbC IgM=anti-HbC IgM.  
 Anticorpos anti-HbE=anti-HbE.  
 Anticorpos anti-HbS=anti-HbS.  
 Anticorpos anti-hepatite A=anti-HVA (IgG ou IgM), cada.  
 Anticorpos anti-hepatite C (teste confirmativo por blotting).  
 Anticorpos anti-hepatite C (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-hepatite delta (IgM).  
 Anticorpos anti-hepatite delta=anti-HVD.  
 Anticorpos anti-hialuronidase.  
 Anticorpos anti-HIV (HIV 1 ou HIV2), cada.  
 Anticorpos anti-HIV (teste confirmativo por blotting).  
 Anticorpos anti-HTLV (HTLV 1 ou HTLV 2), cada.  
 Anticorpos anti-HVA IgM.  
 Anticorpos anti-Legionella (titulação para 11 antígenos).  
 Anticorpos anti-leptospira.  
 Anticorpos anti-Listéria monocytogenes.  
 Anticorpos anti-Mycoplasma pneumoniae (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antiornitose.  
 Anticorpos anti-P 24.  
 Anticorpos anti-Plasmodium.  
 Anticorpos anti-rickettsia (titulação por imunofluorescência para três espécies).  
 Anticorpos anti-rotavirus.  
 Anticorpos antitetânicos (inc. titulação, se necessário).  
 Anticorpos antitoxoplasma (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos anti-Treponema palidum=FTA-Abs (IF).  
 Anticorpos anti-Treponema palidum=TPHA.

Anticorpos antivírus da coriomeningite linfocítica.  
 Anticorpos antivírus da Influenza.  
 Anticorpos antivírus da mononucleose infecciosa (prova em lâmina).  
 Anticorpos antivírus da papeira (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antivírus da rubéola (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antivírus da varicela.  
 Anticorpos antivírus Epstein-Barr - ebna.  
 Anticorpos antivírus Epstein-Barr - VCA (IgG+IgM).  
 Anticorpos antivírus Epstein-Barr (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antivírus herpes I (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antivírus herpes II (inclui IgG e IgM).  
 Anticorpos antivírus Parainfluenza A ou B (inclui IgG e IgM) cada.  
 Anticorpos antivírus sarampo (inclui IgG e IgM).  
 Antígeno HbE=HbE Ag.  
 Antígeno HbS=HbS Ag.  
 Antígeno P 24.  
 Antígeno rotavírus.  
 Antígeno vírus de Epstein-Barr.  
 Blotting-Western: Southern; Northern (técnicas de) para identificação de antígenos ou anticorpos.  
 Monospot - teste ou equivalente=antic. antivírus da monon. inf. (para lâmina).  
 Paul-Bunnell (reação de ...).  
 Reação de Casoni (não inclui ampola).  
 Reação de Hudlesson.  
 Reação de Weil-Félix (três antígenos).  
 Reação de Rosa Bengala.  
 Reação de Weinberg.  
 Reação de Widal (quatro antígenos).  
 Reação de Wright.  
 Reação para fasciola hepática (fasciolíase).  
 RPR (MST, rápido para pesq. de reagentes sífilíticos).  
 Tasso - título de antiestreptolisina O.  
 VDRL (reação do ...).  
 Diversos  
 Esperma=ex. macrosc. (caract. físicas, coagulação-liquefação e volume).  
 Esperma - teste de Sims-Huhner (teste pós-coito).  
 Espermograma (contagem, exame morfológico, motilidade).  
 Imobilizinas, cada.  
 Líquido amniótico (espectrofotometria do ...).  
 Líquido amniótico (relação lecitina-esfingomielina).  
 Líquido cefalorraquiano=liquor (ex. macrosc., cont. de células).  
 Líquido pericárdico, peritoneal pleural (ex. microb.+cél. ciif.).  
 Líquido pericárdico, peritoneal ou pleural (ex. químicos ou microbiológicos) v. na secção respectiva o custo de cada.  
 Líquido pericárdico, peritoneal ou pleural (ex. macroscópico, ex. microscópico, cont. cel. e cont. diferencial).  
 Líquido sinovial (ex. macrosc., viscosidade e teste de coagulação).  
 Líquido sinovial (ex. químico, imunológicos ou microbiológicos).  
 Mucopolisacáridos (pesquisa de).  
 Razão palmítica/esteárica.  
 Suco gástrico e ou duodenal (exame macroscópico e químico).  
 Suco gástrico - prova de estimulação pela hipoglicemia induz. pela insulina.  
 Suco gástrico - prova de estimulação pela pentagastrina.  
 Suco gástrico - prova de estimulação pelo histalog.  
 Suor det. cloretos ou sódio no suor após estim. por iontofor. com pilocarp.  
 Patologia molecular/genética  
 Análises de microsatélites.  
 Cariótipo em linfócitos.  
 Cariótipo em líquido amniótico ou fibroblastos.  
 Colheita de vilosidades coriônicas (incluindo ecografia).  
 Culturas celulares (fibroblastos, amnióticos, linfoblastos, etc.).  
 Culturas de linfócitos para pesquisa de X frágil.  
 Culturas sincronizadas para bandas de alta resolução.  
 Estudo da distrofia miotónica.  
 Estudo das atrofas musculares espinais.  
 Estudo das distrofinopatias.  
 Estudo das mutações causais de doenças lisosomais de sobrecarga de Gaucher, gangliosidoses, GM2, leucodistrofia metacromática e Krabbe (cada mutação).  
 Estudo das sarcoglicanopatias (cada gene).  
 Estudo molecular (cada gene).  
 Estudo molecular da cadeia respiratória mitocondrial.  
 Extração de DNA ou RNA.  
 Haplotipagem.

Hibridização in situ (FISH) por cada sonda (cultura não incluída).  
Rastreamento de deleções.  
Rastreamento de deleções (cada gene).  
Rastreamento de X frágil.  
Sequenciação (cada fragmento); leitura sense e antisense.  
Southern Blot e hibridação (cada sonda).

## ANEXO II

### Normas relativas à instalação de postos de colheita de produtos biológicos - PCPB

*[artigo 7.º, n.º 4, alínea j), do Decreto-Lei n.º 217/99, na redacção do Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro]*

De acordo com o artigo 40.º, n.os 1 e 2, com referência ao artigo 39.º, n.º 4, do Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, na redacção dada pelo Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro, a instalação de postos de colheita deve respeitar o prescrito no artigo 12.º destes diplomas.

Independentemente das regras gerais e particulares definidas no presente MBPL, são estabelecidas as seguintes regras para a instalação e funcionamento de postos de colheita de produtos biológicos (PCPB):

- 1) Para um PCPB, devidamente licenciado, poder funcionar deverá estar instalado em área destinada exclusivamente à colheita e acondicionamento de produtos biológicos subdividida em zona de atendimento, sala de espera e instalações sanitárias, que poderão ser partilhadas;
- 2) Os PCPB dependem do laboratório sob a responsabilidade directa do director técnico ou de um especialista com vínculo contratual ao laboratório. Assim, podem funcionar, devidamente licenciados, oito postos sob a responsabilidade do director técnico e seis postos por cada especialista;
- 3) Todos os PCPB devem estar devidamente identificados como tal e terem em local visível o respectivo horário de funcionamento e os nomes do laboratório de que dependem e do respectivo responsável técnico.
- 4) Os PCPB devem dispor, no mínimo, de um técnico com vínculo contratual ao laboratório, a que o especialista confira competência para efectuar colheitas de acordo com o despacho ministerial publicado ao abrigo do artigo 30.º dos diplomas acima citados, e de pessoal auxiliar (ou administrativo) que poderá ser partilhado e com formação específica dada pelo laboratório;
- 5) A distância entre os PCPB e o laboratório não pode ser superior a 60 km, devendo, no entanto, ter-se em atenção o tempo do percurso de modo a poderem ser cumpridas as normas deste MBPL no que ao transporte das amostras diz respeito;
- 6) Os PCPB não devem ser instalados:
  - 1) Em instalações de subsistemas de saúde e empresas seguradoras que não disponham de serviços de internamento ou recobro;
  - 2) Em instalações de empresas que produzam ou comercializem reagentes, equipamentos ou outros materiais utilizados no sector do diagnóstico;
  - 3) Em unidades convencionadas de centros de saúde;
  - 4) Em centros de enfermagem e sedes de casas do povo, juntas de freguesia, bombeiros, centros paroquiais, casas de pescadores, associações desportivas, mútuas ou outros locais similares que a CTN venha a considerar como impeditivos;
- 7) Os PCPB em funcionamento à data de aprovação do presente MBPL podem ser licenciados em condições diferentes das estabelecidas neste anexo mediante parecer prévio da CTN, após vistoria da CVT;
- 8) As condições descritas no presente anexo, que determina as regras de funcionamento dos PCPB, bem com as condições gerais e particulares descritas no MBPL directamente relacionadas com o funcionamento dos postos, devem estar claramente descritas no regulamento interno do laboratório.

## ANEXO III

### Atribuição de valências

*[artigo 7.º, n.º 4, alínea k), do Decreto-Lei n.º 217/99, na redacção do Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro]*

1 - Nos termos do artigo 2.º, n.º 4, do Decreto-Lei n.º 217/99, de 15 de Junho, na redacção do Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro, para atribuição das valências é necessária a execução dos parâmetros ou das determinações mínimas a seguir listados, devendo constar do MBPL do laboratório a existência dos meios técnicos e humanos necessários para a realização dos mesmos:

a) Bioquímica - execução no mínimo, de 30 parâmetros ou determinações de entre as seguintes:

Ácido úrico;  
Alanina aminotransferase;  
Amilase;  
Aspartato aminotransferase;  
Bilirrubina total+directa e indirecta;  
Cálcio;  
Capacidade total de fixação de ferro;  
Colesterol HDL;  
Colesterol total;  
Creatinina;  
Creatinina fosfoquinase;  
Depuração da creatinina;  
Desidrogenase láctica;  
Electrof. das proteínas;

Ferritina;  
 Ferro;  
 Fosfatase ácida+fosfatase prostática;  
 Fosfatase alcalina;  
 Fósforo;  
 Gama glutamyl transpeptidase (γGT);  
 Glicose;  
 Gravidez diagnóstico imunológico;  
 Hemoglobina glicosilada (HbA 1c);  
 Imunoglobulina A;  
 Imunoglobulina G;  
 Imunoglobulina M;  
 Ionograma;  
 Magnésio;  
 Microalbuminúria;  
 Proteína C reactiva (doseamento);  
 Proteínas totais;  
 Prova de sobrecarga de glicose;  
 Transferrina;  
 Triglicéridos;  
 Ureia;  
 Urina II (análise sumária de urina);  
 b) Microbiologia - execução das análises nos cinco produtos seguintes:  
 Exsudado nasofaríngeo - exame bacteriológico (directo e cultural com identificação e eventual antibiograma);  
 Exsudado uretral - exame bacteriológico (directo e cultural com identificação+micológico e parasitológico com eventual antibiograma);  
 Exsudado vaginal - exame bacteriológico (directo e cultural com identificação+micológico e parasitológico com eventual antibiograma);  
 Fezes - exame parasitológico;  
 Urina - exame citobacteriológico (directo e cultural com identificação e eventual contagem de colónias e antibiograma);  
 c) Hematologia - execução, no mínimo, de seis parâmetros ou determinações de entre as seguintes:  
 Grupo sanguíneo - sistema ABO e Rh;  
 Hemograma;  
 Plaquetas;  
 Reticulocitos;  
 Tempo de protrombina;  
 Tempo de tromboplastina parcial activada;  
 Velocidade de sedimentação;  
 d) Imunologia - execução, no mínimo, de 18 parâmetros ou determinações de entre as seguintes:  
 Antiestreptolisina O (título de);  
 Anticorpos anticitomegalovirus IgG;  
 Anticorpos anticitomegalovirus IgM;  
 Anticorpos anti-HVA;  
 Anticorpos anti-HbC;  
 Anticorpos anti-HbC IgM;  
 Anticorpos anti-HbE;  
 Anticorpos anti-HbS;  
 Anticorpos anti-hepatite C;  
 Anticorpos anti-HIV (HIV1 +HIV2);  
 Anticorpos anti-HVA IgM;  
 Anticorpos antinucleares;  
 Anticorpos antitiróideus (antitiroglobulina+antimicrosossomais);  
 Anticorpos antitoxoplasma IgG;  
 Anticorpos antitoxoplasma IgM;  
 Anticorpos antivírus da rubéola IgG;  
 Anticorpos antivírus da rubéola IgM;  
 Antigénio HbE;  
 Antigénio HbS;  
 Factor reumatóide/RA teste;  
 Imunoglobulina E;  
 Imunoglobulina E específica para um determinado alérgeno (pelo menos três);  
 Prova de Coombs indirecta;  
 Reacção de Hudlesson/reacção de Wright;  
 Reacção de Widal;  
 Reacção de Waller Rose;  
 Reacção do VDRL ou equivalente;  
 Teste múltiplo de imunoglobulinas E específicas para despiste de alergias;  
 Teste múltiplo de imunoglobulinas E específicas para despiste de alergias respiratórias;  
 e) Endocrinologia laboratorial e estudo funcional dos metabolismos, órgãos e sistemas - execução, no mínimo, de sete parâmetros ou determinações de entre as seguintes:

Antigénio carcino-embrionário;  
Antigénio específico da próstata - total;  
Estradiol;  
Hormona folículo-estimulante;  
Hormona luteo-estimulante;  
Hormona tireo-estimulante;  
Hormona tiroxina;  
Hormona tiroxina - fracção livre;  
Hormona triido-tironina;  
Hormona triido-tironina - fracção livre;  
Progesterona.

2 - No que diz respeito às valências monitorização de fármacos e toxicologia clínica, genética e patologia molecular os laboratórios que se queiram candidatar a elas devem indicar os parâmetros ou especificações que pretendem realizar bem como os meios técnicos e humanos de que dispõem para isso.

#### **ANEXO IV**

##### **Requisitos do relatório anual de actividades**

***[alínea m) do n.º 4 do artigo 7.º do n.º 217/99, de 15 de na redacção do Decreto-Lei n.º 534/99, de 11 de Dezembro***

1 - O relatório anual de actividades deve obedecer aos seguintes requisitos e abordar, pelo menos, os aspectos abaixo discriminados:

1.1 - Introdução;

1.2 - Características gerais do laboratório:

a) Instalações;

b) Pessoal;

c) Equipamento geral;

d) Número de doentes;

e) Número de análises efectuadas internamente;

f) Número de análises efectuadas por contrato com outro laboratório;

g) Acções de formação, interna e ou externa, do pessoal.

1.3 - Características específicas do laboratório por valência:

a) Instalações;

b) Pessoal;

c) Equipamento específico;

d) Número de doentes;

e) Número de análises efectuadas internamente por valência;

f) Número de análises efectuadas por contrato com outro laboratório por valência;

g) Acções de formação, interna e ou externa, do pessoal afecto à valência.

1.4 - Postos de colheita:

a) Número de postos;

b) Instalações;

c) Pessoal;

d) Equipamento específico;

e) Número de doentes;

f) Número de colheitas;

g) Condições de transporte;

h) Acções de formação, interna e ou externa, do pessoal afecto ao PCPB.

1.5 - Análise crítica do funcionamento do laboratório;

1.6 - Comentários;

1.7 - Conclusões;

2 - Outros aspectos, gerais ou particulares, do MBPL podem ser considerados pelo director técnico do laboratório.



## **ANEXO F**

Exemplo de um protocolo de reagente para diagnóstico *in vitro*



# Reagente para Amilase EPS-G7 para Sistemas<sup>±</sup> SYNCHRON<sup>®</sup> e UniCel<sup>®</sup> da Beckman Coulter<sup>™</sup>

**REF** A45288 (2 x 200 testes)

## USO RECOMENDADO

Reagente para a determinação quantitativa da  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucano-hidrolase EC3.2.1.1) no soro, plasma ou urina humana nos sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter.

## SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA<sup>1,2</sup>

A  $\alpha$ -amilase catalisa a hidrólise das ligações 1,4 –  $\alpha$ -glucosídicas nos polissacarídeos para produzir maltose e outros oligossacarídeos. A enzima é uma molécula relativamente pequena rapidamente eliminada pelos rins e excretada na urina. A enzima presente no soro e na urina é predominantemente de origem pancreática (P-AMI) e salivar (S-AMI).

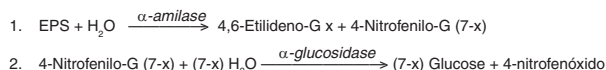
A  $\alpha$ -amilase é mais frequentemente medida no diagnóstico da pancreatite aguda, quando os níveis no soro se podem elevar grandemente (é habitual uma elevação de quatro a seis vezes acima do limite superior de referência). Na pancreatite aguda, os níveis de  $\alpha$ -amilase começam a subir 5 a 8 horas após o aparecimento dos sintomas, atingem o pico entre as 12 e as 72 horas e voltam aos níveis normais ao 3<sup>o</sup> ou 4<sup>o</sup> dia.

## METODOLOGIA<sup>2,3</sup>

Os métodos de análise que utilizam substratos bem definidos com cadeias curtas de glucosilo oferecem vantagens significativas sobre os procedimentos amiloclásticos e sacarogénicos e, por isso, alcançaram ampla aceitação. Com esse substrato, utiliza-se neste método o etilideno-pNP-G7 (E-pNP-G7), também geralmente referido como EPS. O uso do etilideno impede que os exo-enzimas decomponham o substrato, de modo que na ausência de  $\alpha$ -amilase não se observa mudança de cor.

A  $\alpha$ -amilase presente na amostra provoca a clivagem do substrato libertando fragmentos mais pequenos que são actuados pela  $\alpha$ -glucosidase, provocando a libertação final do cromóforo.

As séries de reacções envolvidas neste sistema de análise são as seguintes:



A taxa de formação de 4-nitrofenóxido é proporcional à  $\alpha$ -amilase presente na amostra e é medida pela taxa de aumento na capacidade de absorção a 410 nm (comprimento de onda secundário de 560 nm) nos sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter. Quando usado com Parâmetros de Sistema aprovados, o Reagente Amilase EPS-G7 recupera os valores de IFCC da amilase.

## COMPOSIÇÃO DO REAGENTE

### Ingredientes activos

#### Reagente A (Compartimento A)

	Concentração
$\alpha$ -Glucosidase (microbiana)	>9700 U/L
NaCl	87 mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	12,6 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	0,08 mmol/L
Tampão	53,3 mmol/L
Konserwant	
pH 7,2 ± 0,05 a 20°C.	

#### Reagente B (Compartimento B)

EPS	22 mmol/L
Tampão	54,4 mmol/L
Konserwant	
pH 7,2 ± 0,05 a 20°C.	

**AVISO:** Amilase EPS-G7 é para utilização exclusiva em diagnóstico in vitro. Não Ingerir. Evitar contacto com a pele e os olhos. Em caso de derrame, lave abundantemente com água as áreas afectadas. O reagente contém azida de sódio, que pode reagir com o cobre ou chumbo das canalizações. Utilize água abundante para a sua eliminação. Para informações adicionais, consulte a Ficha de Informação de Segurança do Material do Reagente Amilase EPS-G7 para Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter.

## PREPARAÇÃO DO REAGENTE

O Reagente é fornecido pronto a usar. Transfira as quantidades de Reagente A e Reagente B para os compartimentos apropriados do Cartucho definido pelo utilizador incluído no kit como indicado na tabela seguinte. Actue com cuidado para evitar contaminação.

Kit Amilase EPS-G7	Compartimento A	Compartimento B
Reagente A	40 mL	-
Reagente B	-	8,5 mL

## ESTABILIDADE E ARMAZENAGEM

Se armazenados entre 2-8°C, os reagentes, antes de serem abertos, encontram-se estáveis até à data de validade indicada. Quando armazenado em Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC, o reagente encontra-se estável durante 35 dias.

### Indicações de Deterioração do Reagente:

- Turvação
- Falha em recuperar valores de controlo dentro dos limites designados
- Indicador "BL ABS HI".

## RACCOLTA E MANIPOLAZIONE CAMPIONI

**Soro:** Utilize soro não hemolisado.

**Plasma:** Heparina Li ou Heparina Na.

**Urina:** As colheitas aleatórias ou temporizadas são amostras válidas.<sup>4</sup>

**Armazenagem:**  $\alpha$ -amilase é excepcionalmente estável e as amostras de soro podem ser guardadas pelo menos durante quatro dias à temperatura ambiente e pelo menos por duas semanas a 4°C.<sup>2</sup> As amostras de urina são estáveis durante 7 dias quando guardadas a 4°C. Caso se preveja que possa haver atraso no transporte da amostra de urina para o laboratório, recomenda-se o uso de um conservante químico como o Mertiolato (0,24 mmol/L).<sup>4</sup>

## MATERIAIS FORNECIDOS

- Thermo Scientific Amilase EPS-G7 para Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter

## EQUIPAMENTO ADICIONAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Analísadores químico Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter.
- Tubos de ensaio da Beckman Coulter.
- Controlos Normal e Anormal Testados

## PROCEDIMENTOS DE ENSAIO

Aplique o reagente no sistema como indicado no Manual de Instruções. Programe as amostras e os controlos para análise como indicado no Manual de Instruções.

Para os parâmetros do Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC consulte a secção Parâmetros do Sistema do folheto da presente embalagem.

## CALIBRAÇÃO

É necessária calibração. O Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC calcula a U/L de actividade multiplicando a taxa de reacção medida pelo Factor de Cálculo programado (Consulte a secção Parâmetros do Sistema do folheto da presente embalagem). O factor de cálculo foi deduzido para permitir comparação com o procedimento de medição de referência da IFCC Amilase.<sup>3</sup>

## CÁLCULOS

Os resultados são calculados automaticamente pelo Sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC.

Unidade de conversão: U/L x 16,67 x 10<sup>-3</sup> =  $\mu$ kat/L.

## CONTROLO DA QUALIDADE

Para assegurar o adequado controlo da qualidade, deve ser efectuado controlo normal e anormal com valores ensaiados como amostras desconhecidas:

- Pelo menos uma vez por dia ou como fixado pelo laboratório.
- Quando se usa um novo cartucho de reagente.
- Após a realização da manutenção preventiva ou quando é instalado um componente crítico.

Os resultados de controlo que se encontram para além dos limites superior ou inferior das variações estabelecidas indicam que o ensaio poderá encontrar-se fora de controlo. Em tais situações, são recomendadas as seguintes acções correctivas:

- Repetir os mesmos controlos.
- Se os resultados dos controlos repetidos se encontrarem fora dos limites, prepare um soro de controlo novo e repita o teste.
- Se os resultados em material de controlo fresco continuarem fora dos limites, repita a análise com reagente fresco.
- Se os resultados continuarem fora de controlo, contacte os Serviços Técnicos ou o distribuidor local.

## LIMITAÇÕES

- Foram conduzidos estudos de especificidade analítica no CX e LX/DxC para determinar o nível de interferência de vários componentes de amostra. Não foi observada interferência abaixo dos seguintes limites de concentração de interferente (critério de passagem, valor de controlo inicial  $\pm$  10%):

	LX/DxC	CX
Hemoglobina	900 mg/dL	1000 mg/dL
Lipémia (usando Intralípido)	2000 mg/dL	1000 mg/dL
Glucose	2160 mg/dL	2160 mg/dL
Bilirrubina Livre	60 mg/dL	60 mg/dL
Bilirrubina Conjugada	60 mg/dL	60 mg/dL
Ácido ascórbico	200 mg/dL	200 mg/dL

## VALORES ESPERADOS<sup>5</sup>

Soro/Plasma:	A 37°C	28 - 100 U/L (0,468 - 1,67 $\mu$ kat/L)
*Urina – Masculino	A 37°C	16 - 491 U/L (0,267 - 8,18 $\mu$ kat/L)
*Urina – Feminino	A 37°C	21 - 447 U/L (0,350 - 7,45 $\mu$ kat/L)

\*Os valores esperados para urina foram calculados de amostras colidas espontaneamente.

## INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Dado que a Beckman Coulter não fabrica o reagente nem efectua controlo de qualidade ou outros testes sobre lotes específicos, a Beckman Coulter não pode responsabilizar-se pela qualidade dos dados obtidos que seja derivada do desempenho do reagente, de qualquer variação entre os lotes ou de alterações de protocolo por parte do fabricante.

## DANOS NO TRANSPORTE

Caso seja recebido produto danificado, notifique o seu Centro de Apoio Clínico da Beckman Coulter.

## INFORMAÇÃO DE DESEMPENHO

Foram obtidos os dados seguintes usando o Reagente Thermo Scientific Amilase EPS-G7 nos sistemas Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter de acordo com os procedimentos estabelecidos.

## INTERVALO DE MEDIDA

Quando realizado como recomendado, o intervalo de medida do teste é o seguinte para todas as matrizes de amostra recomendadas:

**Thermo**  
SCIENTIFIC

LX/DxC: 4 - 2000 U/L (0,067 - 33,3 µkat/L)  
 CX: 4 - 1800 U/L (0,067 - 30,0 µkat/L)

#### LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção representa o nível mais baixo mensurável de analito que pode ser significativamente distinguido do zero. É calculado como o valor que fica dois desvios padrão acima da estimativa média para uma amostra zero (branco) apropriada. Quando realizado como recomendado, o limite de detecção é:

LX/DxC: 4 U/L (0,067 µkat/L)  
 CX: 4 U/L (0,067 µkat/L)

#### IMPRECISÃO

A precisão foi avaliada usando o protocolo NCCLS (CLSI) EP5-A2.<sup>6</sup> Foram realizados estudos para representar o desempenho típico de um analisador bem conservado no mesmo local e ao longo de um período de 20 dias (40 passagens), recorrendo a três níveis de soro de controlo comercialmente disponíveis e a dois níveis de qualidade de urina de controlo. Foram efectuadas duas passagens por dia pelo mesmo operador nos mesmos lotes de reagente, num único analisador CX e LX/DxC.

LX/DxC	Soro						Urina				
	NÍVEL I		NÍVEL II		NÍVEL III		NÍVEL I		NÍVEL II		
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	
n	80		80		80		80		80		
Média	69	1,15	289	4,82	800	13,3	53	0,884	155	2,58	
Intra	SD	1,5	0,025	2,6	0,043	9,9	0,165	1,7	0,028	1,7	0,028
	CV %	2,2		0,9		1,2		3,2		1,1	
Total	SD	1,5	0,025	3,8	0,063	9,9	0,165	1,9	0,032	3,2	0,053
	CV %	2,3		1,3		1,2		3,5		2,1	

CX	Soro						Urina				
	NÍVEL I		NÍVEL II		NÍVEL III		NÍVEL I		NÍVEL II		
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	
n	80		80		80		80		80		
Média	70	1,17	285	4,75	810	13,5	54	0,900	157	2,62	
Intra	SD	1,8	0,030	3,3	0,055	4,8	0,080	2,5	0,042	2,1	0,035
	CV %	2,6		1,2		0,6		4,6		1,4	
Total	SD	2,3	0,038	4,1	0,068	7,8	0,130	2,8	0,047	2,9	0,048
	CV %	3,3		1,4		1,0		5,2		1,9	

#### COMPARAÇÃO DO MÉTODO

Foram efectuados estudos comparativos utilizando o protocolo NCCLS (CLSI) EP9-A2.<sup>7</sup> Foi usado como método de referência (X) um reagente Amilase EPS-G7 comercialmente disponível, utilizando as aplicações recomendadas num analisador Roche Hitachi 911<sup>®</sup>. O método (Y) de teste foi corrido com as aplicações recomendadas nos analisadores Synchron CX/LX e UniCel DxC da Beckman Coulter. Foram testadas em paralelo amostras de soro, plasma e urina por ambos os métodos de teste e de referência e os resultados foram comparados pela regressão de Deming. Foram obtidos os seguintes resultados estatísticos:

LX/DxC	Soro/Plasma		Soro		Plasma		Urina	
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L
n	111		70		41		106	
Intervalo	45 - 1864	0,750 - 31,1	45 - 1864	0,750 - 31,1	46 - 1493	0,768 - 24,9	17 - 1884	0,283 - 31,4
X-Média	410	6,83	400	6,68	428	7,15	400	6,67
Y-Média	396	6,60	386	6,45	414	6,91	403	6,72
Declive	0,975		0,973		0,979		1,027	
Intercepção	-3,7	-0,062	-3,0	-0,050	-4,8	0,080	-7,6	0,127
r	0,9994		0,9994		0,9995		0,9992	

CX	Soro/Plasma		Soro		Plasma		Urina	
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L
n	111		70		41		99	
Intervalo	45 - 1864	0,750 - 31,1	45 - 1864	0,750 - 31,1	46 - 1493	0,768 - 24,9	17 - 1493	0,283 - 24,9
X-Média	410	6,83	400	6,68	428	7,15	332	5,53
Y-Média	395	6,58	386	6,45	411	6,86	350	5,83
Declive	0,972		0,970		0,975		1,065	
Intercepção	-3,2	-0,053	-1,5	-0,025	-6,1	-0,102	-4,1	-0,068
r	0,9991		0,9993		0,9987		0,9975	

Foram igualmente realizados estudos comparativos da mesma maneira acima descrita, usando o reagente Amilase BCI como método de referência (X). Foram obtidos os seguintes resultados estatísticos:

LX/DxC	Soro/Plasma		Urina	
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L
n	110		101	
Intervalo	29 - 797	0,483 - 13,3	27 - 779	0,450 - 13,0
X-Média	191	3,18	292	4,87
Y-Média	152	2,53	227	3,78
Declive	0,791		0,726	
Intercepção	0,5	0,008	15,1	0,252
r	0,9987		0,9983	

CX	Soro/Plasma		Urina	
	U/L	µkat/L	U/L	µkat/L
n	112		110	
Intervalo	29 - 798	0,483 - 13,3	31 - 773	0,517 - 12,9
X-Média	219	3,65	289	4,82
Y-Média	181	3,02	234	3,90
Declive	0,830		0,775	
Intercepção	-0,6	-0,010	10,0	0,167
r	0,9975		0,9963	

# Reagente para Amilase EPS-G7

para Sistemas<sup>†</sup> SYNCHRON<sup>®</sup> e UniCel<sup>®</sup> da Beckman Coulter<sup>™</sup>

## Parâmetro do sistema

PARÂMETROS DO APARELHO:	Synchron CX	Synchron LX/UniCel DxC
Nome do teste:	AMYX	AMYX
Tipo de reacção:	Taxa 1	Taxa 1
Unidades:	U/L	U/L
Precisão decimal:	X	X
Orientação da reacção:	POSITIVO	POSITIVO
Modelo matemático:	LINEAR	LINEAR
Factor de cálculo:	6220	6220
Limite temporal de calibragem:	0	0
Número de calibradores:	0	0
1		
2		
3		
4		
5		
6		
Comprimento de onda primário:	410	410
Comprimento de onda secundário:	560	560
Volume da amostra:	7 µL	7 µL
<b>REAGENTES:</b>		
Injecção primária (primeira)/ Primeira injecção		
Compartimento/Componente:	A	A
Volume/Volume a preparar:	175 µL	175 µL
Adicionar tempo/Hora da injecção:	0 seg	0 seg
Injecção primária (primeira) / Segunda injecção		
Compartimento/Componente:	B	B
Volume/Volume a preparar:	35 µL	35 µL
Adicionar tempo/Hora da injecção:	0 seg	-180 seg
Injecção secundária/Terceira injecção		
Compartimento/Componente:	Nenhum	Nenhum
Volume/Volume a preparar:	0	0
Adicionar tempo/Hora da injecção:	não disponível	não disponível
<b>REAGENTES:</b>		
Em branco		
Leitura inicial:	220 seg	-80 seg
Leitura Final:	280 seg	-20 seg
1ª Reacção		
Leitura inicial:	180 seg	180 seg
Leitura Final:	270 seg	300 seg
2ª Reacção		
Leitura inicial:	não disponível	não disponível
Leitura Final:	não disponível	não disponível

# Reagente para Amilase EPS-G7

para Sistemas<sup>†</sup> SYNCHRON<sup>®</sup> e UniCel<sup>®</sup> da Beckman Coulter<sup>™</sup>


## Parâmetro do sistema

PARÂMETROS DO APARELHO:	Synchron CX	Synchron LX/UniCel Dx C
<b>VARIAÇÃO DE RESULTADOS ACEITÁVEL:</b>		
Limite inferior:	4	4
Limite superior:	1800	2000
<b>LIMITES DE DETECÇÃO DE ERROS:</b>		
<b>Reagente em branco/Em branco</b>		
Limite inferior absoluto:	-0,100	-0,100
Limite superior absoluto:	0,250	0,250
Taxa Limite inferior:	não disponível	-1,500
Taxa Limite superior:	não disponível	2,200
Desvio médio:	não disponível	2,200
<b>Reacção/1ª Reacção</b>		
Limite inferior absoluto:	-0,100	-0,100
Limite superior absoluto:	1,500	2,200
Taxa Limite inferior:	não disponível	-1,500
Taxa Limite superior:	não disponível	2,200
Desvio médio:	não disponível	2,200
<b>2ª Reacção</b>		
Limite inferior absoluto:	não disponível	-1,500
Limite superior absoluto:	não disponível	2,200
Taxa Limite inferior:	não disponível	-1,500
Taxa Limite superior:	não disponível	2,200
Desvio médio:	não disponível	2,200
<b>DEPLEÇÃO DE SUBSTRATOS:</b>		
Taxa inicial:	99,999	99,999
Delta absoluto:	1,500	2,200
<b>ESPAÇO ENTRE MÚLTIPLOS PONTOS:</b>	não disponível	não disponível

### REFERENCES

1. JF Zilva and PR Pannall. "Plasma Enzymes in Diagnosis" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment. Lloyd-Luke London 1979: Chapter XV: 341-2
2. M Panteghini, Bais, R and van Solinge "Enzymes" in Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders 2006 Chapter 21 616-7.
3. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of  $\alpha$ -Amylase. Clin Chem Lab Med 2006; 1146-55
4. Shephard MDS, Mazzachi RD. The Clin Biochem 1983; 4: 61-7.
5. Junge, W. et. al. 'Development of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37°C according to the principle recommended by the IFCC.' Clin Biochem. 2001; 34:607 - 15.
6. Tholen, D. W. et. al. 'EP5-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline – second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004; Volume 24: Number 25.
7. Krouwer, J. S. et al. 'EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline – second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002; Volume 22: Number 19.













© 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Hitachi 911<sup>®</sup> is a registered trademark of Roche Diagnostics, Indianapolis, IN 46250. ‡SYNCHRON LX<sup>®</sup>/CX<sup>®</sup> and UniCel<sup>®</sup> Dx C are registered trademarks of Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA 92835. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

 Fisher Diagnostics  
a division of Fisher Scientific Company, LLC  
a part of Thermo Fisher Scientific Inc.  
Middletown, VA 22645-1905 USA  
Phone: 800-528-0494  
540-869-3200  
Fax: 540-869-8132

 MDCI Ltd.  
Arundel House  
1 Liverpool Gardens  
Worthing, West Sussex BN11 1SL UK



### SÍMBOLOS NA ETIQUETA DO PRODUTO

	Representante Autorizado		Limitação de Temperatura
	Para uso diagnóstico in vitro		Utilizar até/Validade até
	Código/Número de lote		AVISO. Consultar as instruções para utilização.
	Número de Catálogo		Fabricado por
	Consulte instruções para utilização		Reagente B
	Reagente A		Não reutilizar

## **ANEXO G**

Exemplo de um protocolo de reagente para diagnóstico *in vitro*







# INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

# HDLC DT

Kit para Colesterol HDL DT VITROS Chemistry Products  
Kit Para Colesterol HDL DT VITROS

Colesterol HDL

## Indicação de Utilização

Para diagnóstico *In Vitro*.

Para uso em medições quantitativas da concentração de colesterol das HDL (HDLC) no soro e no plasma, utilizando os Sistemas Químicos VITROS DT60 e DT60 II.

## Sumário e Explicação

O colesterol das Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) é utilizado na avaliação do risco de desenvolvimento de doença coronária (CHD). O risco de doença coronária (CHD) aumenta quando a concentração de colesterol ligado às HDL é baixa.

## Princípios do Procedimento

O Kit para Colesterol HDL DT VITROS é usado para preparar e ensaiar amostras quanto ao colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL), num Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS. As amostras têm inicialmente que ser tratadas com um reagente para retirar as outras lipoproteínas que também contêm colesterol, incluindo as classes de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL). A quantidade de colesterol HDL pode ser determinada usando Lâminas HDLC DT VITROS Chemistry Products.

O HDL é separado pela precipitação do LDL e do VLDL, usando sulfato de dextrano (MW 50000) e cloreto de magnésio<sup>1</sup> que são fornecidos no tubo HDL VITROS Chemistry Products. As lipoproteínas HDL permanecem na fracção líquida do tubo após a centrifugação. Esta fracção líquida é chamada o sobrenadante e é a fracção a ser analisada. As fracções que não são HDL formam uma esfera no fundo do tubo e são descartadas.

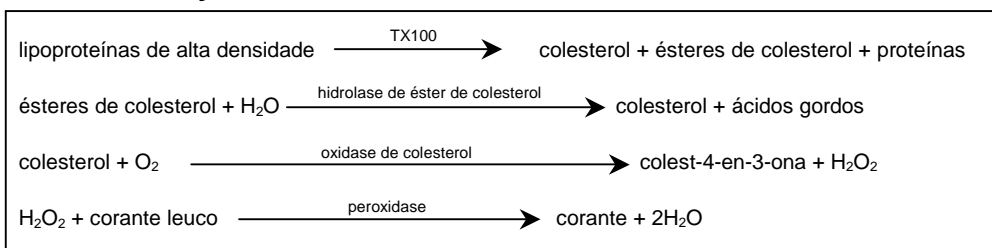
É adicionada uma gota da amostra pré-tratada do doente na lâmina, sendo uniformemente distribuída pela camada de difusão para as camadas subjacentes. O surfactante Triton X-100 (TX100), que se encontra na camada de difusão, auxilia a dissociação do colesterol e dos ésteres de colesterol, dos complexos de lipoproteína presentes na amostra. A hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol é catalisada pela hidrolase de ésteres de colesterol. O colesterol livre é depois oxidado na presença da oxidase de colesterol, originando a colestenoona e peróxido de hidrogénio. Finalmente, o peróxido de hidrogénio oxida um corante leuco na presença da peroxidase, originando um corante colorido.

A densidade do corante formado é proporcional à concentração de colesterol ligado às HDL presente na amostra pré-tratada e é medida por espectrofotometria de reflectância.

## Tipo de Teste e Condições

Tipo de Teste	Módulo DT60/DT60 II VITROS	Tempo Aproximado de Incubação	Temperatura	Comprimento de Onda	Volume da Gota da Amostra
Colorimétrico	DT60/DT60 II	5 minutos	37 °C	660 nm	10 µL

## Sequência da Reacção



## Advertências e Precauções

Para diagnóstico *In Vitro*.

**ADVERTÊNCIA:** *Manipule com precaução os materiais e amostras de origem humana. Considerando que não existe nenhum método de teste capaz de garantir a total ausência de agentes infecciosos, considere todas as amostras clínicas, controles e calibradores como potencialmente infecciosos. Manipule as amostras, resíduos sólidos e líquidos e componentes do teste em conformidade com os regulamentos locais e a Norma M29<sup>º</sup> do CLSI ou outras normas de segurança contra potenciais riscos biológicos publicadas.*

**ADVERTÊNCIA:** *Apesar de o produto Diluente de Amostras HDLC VITROS ter origem bovina, deve ser manipulado com as mesmas precauções que qualquer outro produto de sangue ou derivado de sangue.*

**ATENÇÃO:** *Os tubos HDL VITROS contêm azida de sódio. A eliminação do reagente em lavatórios com canalização de cobre ou de chumbo deve ser seguida de grandes quantidades de água para evitar a formação de azidas metálicas, potencialmente explosivas.*

**ATENÇÃO:** *Os tubos HDL VITROS contêm sulfato de gentamicina e azida de sódio. R22 - Nocivo por ingestão.*

Para Precauções específicas para os calibradores, materiais de controle de qualidade e outros componentes, consulte as Instruções de Utilização para o produto VITROS adequado ou a literatura de produtos de outros fabricantes.

## Reagentes

### Ingredientes da Lâmina HDLC DT

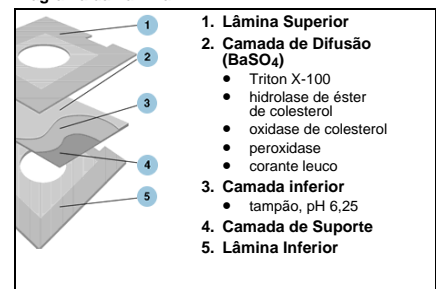
#### Ingredientes Reactivos por cm<sup>2</sup>

Triton X-100 0,8 mg; oxidase de colesterol (*Nocardia*, E.C.1.1.3.6) 0,2 U; hidrolase de ésteres de colesterol (*Candida rugosa*, E.C.3.1.1.13) 0,7 U; peroxidase (raiz de rábano, E.C.1.11.1.7) 5,3 U; e 2-(3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil)-4,5-bis-(4-dimetilaminofenil) imidazole (corante leuco) 0,2 mg.

#### Outros ingredientes

Pigmento, ligantes, tampão, surfactantes, estabilizantes e agente de ligação cruzada.

Diagrama da Lâmina



### Tubos HDL

#### Ingredientes Reactivos

Sulfato de dextrano (MW 50000) 0,8 mg, cloreto de magnésio hexa-hidrato 6,7 mg

#### Outros ingredientes

Azida de sódio 0,22%, sulfato de gentamicina <0,01%, corante e conservantes

### Diluente da Amostra HDLC

#### Ingredientes Reactivos

Albumina de soro bovino a 7%

#### Outros ingredientes

Azida de sódio a 0,05%, sais inorgânicos e conservantes

### Manuseamento da Lâmina

**ATENÇÃO:** Não utilize lâminas provenientes de embalagens danificadas ou seladas inadequadamente.

## Preparação da Lâmina

**IMPORTANTE:** A lâmina deve atingir a temperatura ambiente, entre 18–28 °C, antes da abertura do invólucro.

Não utilize lâminas fechadas que tenham estado à temperatura ambiente, 18–28 °C durante um período superior a 48 horas.

1. Retirar a lâmina por abrir da caixa.
2. Aquecer a lâmina por abrir durante 15 minutos. As lâminas fechadas que permaneçam no invólucro selado poderão ser novamente armazenadas no frigorífico ou congelador.
3. Retirar a embalagem e colocar a lâmina na estação de carregamento no máximo 15 minutos após a abertura.

## Armazenamento e Estabilidade do Kit HDLC DT

Os componentes do Kit Colesterol HDL DT são estáveis até final do prazo de validade indicado na embalagem, desde que sejam armazenados e manipulados conforme especificado. Não utilize após o fim do prazo de validade.

Componente do Kit	Condição de armazenamento	Estabilidade
<b>Lâmina</b>		
Fechado	Frigorificado	2–8 °C
	Congelado	≤-18 °C
	Temperatura ambiente	18–28 °C
Aberto	Temperatura ambiente	18–28 °C
<b>Tubos</b>		
	Frigorificado	2–8 °C
	Congelado	≤-18 °C
<b>Diluyente da Amostra*</b>		
	Frigorificado	2–8 °C
	Congelado	≤-18 °C
		Até final do prazo de validade

\* Descartar se a solução se tornar enevoada ou turva.

- Verifique o desempenho com os materiais de controlo de qualidade:
  - Se o sistema ficar desligado por mais de 2 horas.

## Colheita, Preparação e Armazenamento da Amostra

### Amostras Recomendadas

- Soro
- Plasma:<sup>3</sup> Heparina

**IMPORTANTE:** Foi reportado que alguns dispositivos de colheita afectam outras substâncias analisadas e testes.<sup>4</sup> Dada a variedade de dispositivos de colheita de amostras disponíveis, não é possível à Ortho-Clinical Diagnostics emitir uma declaração definitiva relativamente ao desempenho dos seus produtos com esses dispositivos. Confirme se os seus dispositivos de colheita são compatíveis com este teste.

### Tipos de Amostras Não Recomendados

- Plasma:<sup>5</sup> EDTA

### Soro e Plasma

#### Colheita e Preparação da Amostra

Proceda à colheita das amostras utilizando os procedimentos padrão do laboratório.<sup>6,7</sup>

#### Preparação do Doente

- Não é necessária qualquer preparação especial do doente.

#### Precauções Especiais

- Centrifugue as amostras e remova o soro ou plasma do material celular dentro de 3 horas após a colheita.<sup>8</sup> Se o processamento adicional for adiado, conserve no frigorífico a uma temperatura 2–8 °C.

**Armazenamento e Manipulação da Amostra**

- Manipule e armazene as amostras em recipientes tapados para evitar a contaminação e a evaporação.
- Proceda à homogeneização das amostras mediante inversão suave e coloque estas à temperatura ambiente, 18–28 °C, antes da análise.

**Armazenamento e Estabilidade da Amostra<sup>8,9</sup>**

Armazenamento	Temperatura	Estabilidade
<b>Amostra Original</b>		
Frigorificado	2°–8°C	≤3 dias
Congelado	≤-18 °C	≤4 semanas*
<b>Amostra Pré-Tratada (Sobrenadante)**</b>		
Congelado	≤-20 °C	≤3 meses
	≤-70 °C	≤2 anos

\* Para um armazenamento mais prolongado, separe as fracções das HDL e congele o sobrenadante.

**IMPORTANTE:** Evite ciclos repetidos de congelamento-descongelamento.

**Procedimento de Pré-tratamento da Amostra e de Teste**

**Materiais Fornecido**

- 25 Lâminas HDLC DT VITROS Chemistry Products
- 27 Tubos HDL VITROS Chemistry Products
- Diluente da Amostra HDLC VITROS Chemistry Products

**Material Necessário Mas Não Fornecido**

- Kit Calibrador DT VITROS Chemistry Products
- Controlos I & II DT VITROS Chemistry Products
- Pipeta DT VITROS
- Centrifugadora capaz de produzir forças de 1500 x g
- Recomenda-se uma misturadora tipo vortex.

**Precauções Especiais**

- Utilizar uma velocidade do vortex que não faça com que a mistura derrame para fora do tubo de amostra.

**Procedimento**

**IMPORTANTE:** Não efectue pré-tratamento dos calibradores.

**IMPORTANTE:** Certifique-se de que utiliza componentes com o mesmo número de lote do kit.

1. Espere pelo menos 10 minutos que os produtos refrigerados Tubos HDL VITROS e Diluente de Amostras HDLC VITROS atinjam a temperatura ambiente. Se estes materiais forem armazenados a -18°C, eles precisarão de um período de aquecimento mais longo (pelo menos 30 minutos). Uma vez aberto, o Diluente de Amostras HDLC VITROS deverá ser armazenado bem tapado no frigorífico, entre usos.
2. Com a pipeta, deposite soro ou plasma com heparina até à marca de 0,5 mL no tubo HDL VITROS.
3. Tape e misture completamente durante 30 segundos—recomenda-se uma misturadora de vortex.

**OBSERVAÇÃO:** A amostra tornar-se-á turva durante o processo de mistura.

4. Deixar repousar durante um período mínimo de 5 minuto.
5. Centrifugue o tubo HDL VITROS durante 10 minutos a 1500 x g. Alternativamente, poderá centrifugar o tubo por um período de mais curta duração usando uma microcentrifugadora durante 95 segundos a 12600 x g.

6. Inspeccione visualmente os sobrenadantes para avaliar o seu grau de transparência. As fracções sem HDL formam uma esfera no fundo do tubo. Não perturbe a esfera. Se o sobrenadante for transparente, transfira o sobrenadante transparente do tubo HDL VITROS para um copo de amostra para fazer a análise no analisador DT.\*

**IMPORTANTE:** *Os sobrenadantes deverão ser removidos do precipitado peletizado assim que for possível após a centrifugação. Os sobrenadantes deverão ser usados num prazo máximo de 15 minutos. Se a análise no Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS tiver que ser adiada mais do que uma hora, o sobrenadante deverá ser frigorificado. Se a análise for adiada por mais de 8 horas, consulte a secção "Manuseamento e Armazenagem da Amostra".*

7. Analise a amostra tratada conforme as instruções do manual do operador para o seu Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS.

### Instruções de Utilização

- Consultar o manual de operação do Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS.

**IMPORTANTE:** *Coloque todos os fluidos e amostras à temperatura ambiente, entre 18°C e 28°C; analise de imediato.*

### Diluição da Amostra

Se as concentrações de HDL excederem o intervalo de medição (reportável ou dinâmico) ou se as amostras se apresentarem turvas ou tiverem partículas flutuantes depois do pré-tratamento:

1. Dilua a amostra **não tratada** com um volume igual de Diluente para a Amostra HDLC VITROS.
2. Homogeneize suavemente, invertendo o frasco diversas vezes.
3. Leve com a pipeta 0,5 mL da amostra diluída para um segundo tubo HDL VITROS.
4. Repita os passos 3 até 6 do procedimento acima. Lembre-se de multiplicar o resultado pelo factor de diluição de 2,0.
5. Reanalise.
6. Multiplique os resultados por 2 para obter uma estimativa da concentração de HDL na amostra original.

**OBSERVAÇÃO:** Não se recomendam diluições adicionais.

## Calibração

### Calibradores Necessários

Kit Calibrador DT, VITROS Chemistry Products, frascos 1, 2 e 4

### Preparação, Manipulação e Armazenamento do Calibrador

**IMPORTANTE:** *Não efectue pré-tratamento dos calibradores.*

Consultar as Instruções de Utilização do Kit Calibrador DT VITROS.

### Procedimento de Calibração

Consultar o manual de operação do Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS.

### Quando Calibrar

Calibre:

- Quando o número do lote da lâmina mudar.
- Quando forem substituídas partes críticas do analisador para reparação ou manutenção.
- Quando os regulamentos governamentais assim o exigirem.
  - Por exemplo, nos E.U.A., os regulamentos da CLIA exigem uma calibração ou confirmação da calibração pelo menos uma vez em cada seis meses.

As Lâminas HDLC DT VITROS também podem necessitar de ser calibradas:

- Se os resultados do controle de qualidade estiverem consistentemente fora do intervalo aceitável.
- Depois de terem sido efectuados determinados procedimentos de manutenção.

Para mais informações, consultar o manual de operação do Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS.

### Cálculos

A reflectância da lâmina é medida a um comprimento de onda de 660 nm após o tempo de incubação definido. Depois da calibração ter sido executada para cada lote de lâminas, é possível determinar a concentração de colesterol das lipoproteínas de alta densidade em amostras desconhecidas, utilizando o modelo matemático colorimétrico de ponto final existente no software e a resposta obtida para cada lâmina de teste desconhecida.

### Validade de uma Calibração

Os parâmetros de calibração são automaticamente determinados pelo Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS face a um conjunto de parâmetros de qualidade existente no software do analisador. O não cumprimento de qualquer um dos parâmetros de qualidade pré-definidos irá originar uma calibração falhada. O relatório da calibração deverá ser utilizado em conjunto com resultados do controlo de qualidade para determinar a validade de uma calibração.

### Intervalo de Medição (Reportável ou Dinâmico)

Unidades Convencionais (mg/dL)	Unidades SI (mmol/L)
1–110	0,03–2,84

Para amostras fora do intervalo, consulte "Diluição da Amostra".

### Rastreio da Calibração

Os valores atribuídos ao Kit de Calibrador DT VITROS Chemistry Products para Reagente de Colesterol de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) com slides DT HDLC VITROS são rastreáveis ao Método<sup>10</sup> de Comparação Designado pela Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) e Materiais de Referência Certificados do NIST (National Institute for Standards and Technology), SRM<sup>®</sup> (Standard Reference Material) 911. A rastreabilidade do Método de Comparação Designado (DCM) pela CRMLN com a Base de Exactidão do CDC é mantida por cada laboratório participante na rede CRMLN, através da utilização de controlos de proficiência trimestrais administrados pelo CDC. Ao Calibrador de Trabalho é atribuído um valor de HDLC pelo Método de Comparação Designado pela CRMLN num laboratório da rede CRMLN para utilização na calibração do Procedimento de Medição Seleccionado do Fabricante. O Método Seleccionado é compatível com a atribuição de valores ao reagente de Colesterol HDL VITROS para o Kit Calibrador DT VITROS. O Método Seleccionado HDLC inclui (MW 50000) a precipitação pelo Sulfato de Dextrano de lipoproteínas não-HDL de acordo com as recomendações do CDC (Centers for Disease Control),<sup>11</sup> seguida de determinação enzimática automatizada da concentração do colesterol (fracção HDL) nos sobrenadantes.

## Controlo de Qualidade

**IMPORTANTE:** Os controlos **têm que ser pré-tratados**.

### Seleção do Material de Controlo de Qualidade

**IMPORTANTE:** Recomenda-se o uso de Control I & II DT VITROS com o Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS. Avalie o desempenho de outros líquidos de controlo comerciais relativamente à sua compatibilidade com este teste antes de os utilizar para controlo de qualidade.

- Materiais de controlo diferentes dos DT Control I & II VITROS podem mostrar diferenças quando comparados com outros métodos de colesterol HDL se eles:
  - Forem diferentes de uma matriz humana verdadeira.
  - Apresentem concentrações elevadas de conservantes, estabilizadores ou outros aditivos não fisiológicos.
- Não utilize materiais de controlo estabilizados com etilenoglicol.

### Recomendações para o Procedimento de Controlo de Qualidade

- Escolha níveis de controlo que estejam no intervalo clinicamente significativo.
- Analise os materiais de controlo de qualidade da mesma forma que as amostras dos doentes, antes ou durante o processamento da amostra do doente.
- Para confirmar o desempenho do sistema, analise os materiais de controlo:
  - Depois da calibração.
  - De acordo com os regulamentos locais ou pelo menos uma vez em cada dia em que o teste for realizado.
  - Depois de terem sido efectuados procedimentos de reparação especificados. Consulte o manual do operador para o seu Sistema DT60/DT60 II VITROS.
- Se os resultados do controlo ficarem fora do seu intervalo aceitável, investigue a causa antes de decidir reportar ou não dos resultados do doente.
- Para recomendações genéricas de controlo de qualidade, consulte o *Statistical Quality Control for Quantitative Measurements: Principles and Definitions; Approved Guideline-Third Edition*<sup>12</sup> ou outras normas publicadas.
- Para mais informações, consultar o manual de operação do Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS.

### Preparação e Armazenamento de Materiais de Controlo de Qualidade

Consulte as Instruções de Utilização para Control I & II DT VITROS Chemistry Products ou a literatura de produtos de outros fabricantes.

## Resultados

### Unidades de Participação e Conversão de Unidades

O Sistema Químico DT60/DT60 II VITROS pode ser programado para participar resultados de colesterol HDL em unidades convencionais e unidades SI.

Unidades Convencionais	Unidades SI
mg/dL	mmol/L (mg/dL x 0,02586)

## Limitações do Procedimento

### Interferências conhecidas

O método Kit Colesterol HDL DT VITROS foi rastreado relativamente a substâncias interferentes em conformidade com o Protocolo EP7 do NCCLS.<sup>15</sup> As substâncias listadas no quadro abaixo, quando testadas nas concentrações indicadas, deram origem às tendências apresentadas.

Interferente*	Interferente		Concentração de Colesterol ligado às HDL		Tendência**		
	Concentração	Comentários	Unidades Conv.	Unidades SI	Unidades Conv.	Unidades SI	
			(mg/dL)	(mmol/L)	(mg/dL)	(mmol/L)	
Ácido ascórbico	3 mg/dL	170 µmol/L	Terapêutico Elevado	40,9	1,06	-7	-0,18
Dipirona	12 mg/dL	3,6 mmol/L	Gotejamento I.V. Intenso	40,5	1,05	-7	-0,18
Dopamina	4 mg/dL	200 µmol/L	Gotejamento I.V. Intenso	44,6	1,15	-9	-0,22
N-acetilcisteína	10 mg/dL	0,61 mmol/L	Terapêutico Oral	40,2	1,04	-6	-0,14

\* É possível que sejam encontradas outras substâncias interferentes. Estes resultados são representativos; embora os seus resultados possam ser algo diferentes, facto decorrente da variabilidade dos testes. Não é possível prever o grau de interferência em concentrações diferentes das descritas.

\*\* A tendência consiste numa estimativa da diferença máxima observada.

### Outras Limitações

Sabe-se que alguns fármacos e estados clínicos alteram as concentrações de colesterol ligado às HDL *In Vivo*. Para mais informações, consulte um dos resumos publicados.<sup>16, 17, 18</sup>

## Interpretação dos Resultados e Resultados Esperados

### Interpretação dos Resultados

Tanto o colesterol ligado às LDL como o colesterol ligado às VLDL podem ser calculados com base nos resultados da Lâmina CHOL DT VITROS, da Lâmina TRIG DT VITROS e nos resultados para colesterol ligado às HDL, visando facultar perfis completos das lipoproteínas.

$$LDL = CHOL - HDLC - VLDL$$

$$VLDL = TRIG/5 \text{ para unidades convencionais (mg/dL)}$$

$$VLDL = TRIG/2,2 \text{ para unidades SI (mmol/L)}$$

Os cálculos para as LDL não são adequados para amostras com concentrações de triglicéridos superiores a 400 mg/dL (4,52 mmol/L) ou em amostras de doentes que apresentam hiperlipoproteinemia de tipo III (electroforese com lipoproteína "beta ampla").<sup>13</sup>

### Resultados Esperados

Os níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade são categorizados de acordo com o esquema de classificação nas directrizes de ATP III recomendados pelo NCEP para amostras colhidas de doentes em jejum.<sup>14</sup>

#### Classificação

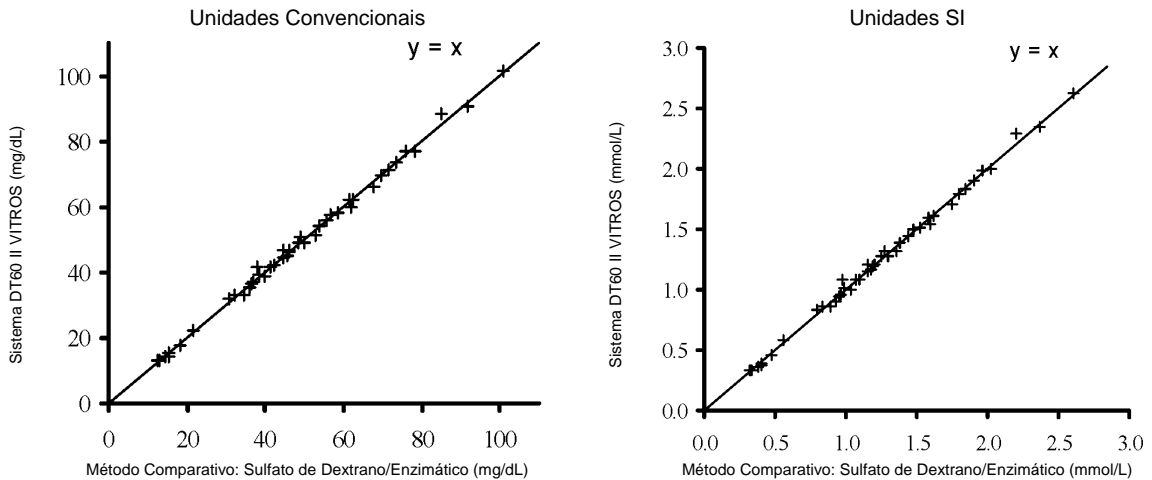
Classificação	Unidades Conv. (mg/dL)	Unidades SI (mmol/L)
Baixo	<40	<1,0
Elevado	≥60	≥1,6

## Características de Desempenho

### Comparação entre Métodos

Os gráficos e o quadro abaixo mostram os resultados de uma comparação do Método de Colesterol HDL VITROS analisado no Sistema Químico DT60 II VITROS utilizando o método comparativo de Sulfato de Dextrano/Enzimático<sup>10</sup> com amostras de soro pré-tratadas. O método de colesterol HDT DT VITROS cumpriu com os requisitos do Programa de Standardização de Lípidos CDC para fabricantes.

### Soro



	n	Curva	Coeficiente de Correlação	Unidades Convencionais (mg/dL)			Unidades SI (mmol/L)		
				Intervalo de Conc. da Amostra	Inter-cepção	Eixo xx	Intervalo de Conc. da Amostra	Inter-cepção	Eixo xx
<b>DT60 II face ao Método comparativo</b>	43	1,00	0,998	12–101	0,02	1,23	0,3–2,6	0,00	0,03

### Precisão

A precisão foi avaliada utilizando materiais de controlo de qualidade no Sistema DT60 II VITROS seguindo o Protocolo EP5 da NCCLS.<sup>19</sup>

Os dados apresentados são uma representação do desempenho do teste e são facultados apenas como orientação. Variáveis tais como a manipulação e armazenamento da amostra, manipulação e armazenamento do reagente, ambiente do laboratório e manutenção do sistema podem influenciar a reprodutibilidade dos resultados do teste.

	Unidades Convencionais (mg/dL)			Unidades SI (mmol/L)			CV% do Laboratório**	No. de Observ.	No. de Dias
	Conc. Média	DP Diário*	DP do Laboratório**	Conc. Média	DP Diário*	DP do Laboratório**			
<b>DT60 II</b>	31,5	0,56	1,01	0,82	0,01	0,03	3,2	99	25
	53,8	0,90	2,14	1,39	0,02	0,06	4,0	100	25

\* A precisão diária foi determinada utilizando duas execuções/dia com dois a três replicados.

\*\* A precisão dentro do laboratório foi determinada utilizando um único lote de lâminas e calibração semanal.

































Referências

1. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran Sulfate-Mg+2 Precipitation Procedure for Quantitation of High-Density Lipoprotein Cholesterol. In Cooper GR (ed). *Selected Methods of Clinical Chemistry*. Washington, D.C.: American Association for Clinical Chemistry; 10:91–99; 1983.
2. CLSI. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition*. CLSI document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA; 2005.
3. Dumas BT, et al. Differences Between Values for Plasma and Serum in Tests Performed in the Ektachem 700 XR Analyzer, and Evaluation of "Plasma Separator Tubes (PST)." *Clin. Chem.* 35:151–153; 1989.
4. Calam RR. Specimen Processing Separator Gels: An Update. *J Clin Immunoassay.* 11:86–90; 1988.
5. *Recommendations for Improving Cholesterol Measurement: A Report from the Laboratory Standardization Panel of the National Education Program*. US Department of Health and Human Services Public Health Service, National Institutes of Health. NIH Publication No. 90-2964. February 1990.
6. CLSI. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-Sixth Edition*. CLSI document H3-A6 (ISBN 1-56238-650-6). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA; 2007.
7. NCCLS. *Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens; Approved Standard—Fifth Edition*. NCCLS document H4-A5 [ISBN 1-56238-538-0]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2004.
8. *Clinical Laboratory Handbook for Patient Preparation and Specimen Handling*. Fascicle VI: Chemistry/Clinical Microscopy. Northfield, IL: College of American Pathologists; 1992.
9. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurements of High-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. *Clin. Chem.* (41)10:1427–1433; 1995.
10. Kimberley MM, Leary ET, Cole TG, Waymack PP. Selection, Validation, Standardization and Performance of a Designated Comparison Method for HDL-Cholesterol for Use in the Cholesterol Reference Laboratory Network. *Clin. Chem.* (45) 10:1803–1812; 1999.
11. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg2+ Precipitation Procedure for Quantitation of High-density-lipoprotein Cholesterol. *Clin Chem.* 28: 1379-88; 1982.
12. CLSI. *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline – Third Edition*. CLSI document C24-A3 (ISBN 1-56238-613-1). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA; 2006.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18:499; 1972.
14. NCEP. *Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Final Report*. NIH Publication No. 02-5215: II-7, III-6. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland: September 2002.
15. NCCLS. *Interference Testing in Clinical Chemistry*. NCCLS Document EP7. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA; 1986.
16. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*. ed. 4. Washington D.C.: AACC Press; 1995.
17. Friedman RB, Young DS. *Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests*. Washington, D.C.: AACC Press; 1990.
18. Tryding N, Tufvesson C, Sonntag O (eds). *Drug Effects in Clinical Chemistry*. ed. 7. Stockholm: The National Corporation of Swedish Pharmacies, Pharmasoft AB, Swedish Society for Clinical Chemistry; 1996.
19. NCCLS. *User Evaluation of Precision Performance with Clinical Chemistry Devices*. NCCLS Document EP5. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA; 1992.

**Glossário de Símbolos**

Os seguintes símbolos poderão ter sido utilizados na etiquetagem deste produto.

	Não reutilizar		Limite superior da temperatura		Esta extremidade para cima
	Utilizar até ou prazo de validade (ano-mês-dia)		Limite inferior da temperatura		Unidades SI
	Código ou número do lote		Limites da temperatura		Unidades Convencionais
	Número de série		Consultar as instruções de utilização		Valor
	Número de catálogo ou código do produto		Irritante		Intervalo
	Precaução		Nocivo		Intervalo de Médias
	Fabricante		Tóxico		Ponto médio
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Frágil, manipular com precaução		Revisto
	Contém o suficiente para "n" testes		Manter seco		Substituí
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Reciclável (ponto verde) O fabricante cumpre com os regulamentos para a gestão da eliminação de materiais de embalagem		Estimativa de DP do laboratório

### Histórico de Revisões

Data de Revisão	Versão	Descrição das Alterações Técnicas*
2012-10-03	6.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>Preparação do Doente – Actualizado</li> <li>Interpretação dos Resultados e Resultados Esperados – Actualizado</li> <li>Referências – Foi actualizada a referência 14</li> </ul>
2012-03-01	5.0	Glossário de Símbolos – Actualizado
2010-08-07	4.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rastreio da Calibração – Actualizado</li> <li>Referências – Actualizadas</li> </ul>
2009-04-02	3.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicação de Utilização – Actualizado</li> <li>Advertências e Precauções - Foram retiradas as subsecções que continham as normas de segurança laboratoriais padrão</li> <li>Rastreio da Calibração – Actualizado</li> <li>Diluição da Amostra – dados corrigidos</li> <li>Comparação entre Métodos – Actualizado “Programa de Estandarização de Lípidos CDC para fabricantes”</li> <li>Referências – Actualizadas</li> <li>Glossário de Símbolos – Actualizado</li> <li>Actualizações menores de formatação e teor</li> </ul>
2006-05-19	2.1	Acrescentado “Kit Para Colesterol HDL DT VITROS” (Brasil)
2004-02-29	2.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diagrama da Lâmina – mudou-se BaSO<sub>2</sub> para BaSO<sub>4</sub></li> <li>Comparação de Métodos – acrescentou-se que o método cumpre com os requisitos do Programa de Estandarização de Lípidos CDC/NCEP para fabricantes, e substituíram-se os gráficos para mostrar todos os dados disponíveis</li> <li>Actualizada a tabela do Glossário de Símbolos</li> </ul>
2003-08-11	1.0	<ul style="list-style-type: none"> <li>Novo formato</li> <li>Nova organização e secções consistentes com a Directiva do IVD</li> <li>Limitações do Procedimento – actualizados valores para concentrações de colesterol HDL e tendências na tabela de Interferentes Conhecidos</li> <li>Comparação dos Métodos – actualizados os valores das comparações e os gráficos</li> <li>Precisão – actualizados todos os valores</li> <li>Referências – acrescentados todos excepto 1, 8</li> </ul>

\* As barras de alteração indicam a posição de uma emenda técnica ao texto relativamente à versão prévia do documento.

Quando estas Instruções de Utilização forem substituídas, assine e date por baixo e guarde conforme especificado pelos regulamentos locais ou políticas do laboratório, conforme adequado.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

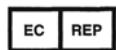
\_\_\_\_\_  
Data de Validade

HDLC DT

Colesterol HDL

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Histórico de Revisões



Ortho-Clinical Diagnostics  
50-100 Holmers Farm Way  
High Wycombe  
Buckinghamshire  
HP12 4DP  
United Kingdom



Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.  
100 Indigo Creek Drive  
Rochester, NY 14626

Ortho Clinical Diagnostics

PART OF THE *Johnson & Johnson* FAMILY OF COMPANIES

Brasil:

Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. de Prod. para Saúde  
Ltda.

Divisão: Johnson & Johnson Medical Brasil

Rua Gerivatiba, 207 - São Paulo/SP

CEP 05501-900 – Brasil CNPJ: 54516661/0001-01

Resp. Técnico.: Nancy M.R.B Lopes C.R.F.-SP Nº 10965

Somente Para Uso Diagnóstico *In Vitro*

SAC: 08007075420

VITROS é uma marca registrada da Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.  
© Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., 2003-2012.

## **ANEXO H**

Texto 1 – Acetyl-Coenzyme A Assay Kit



## Product Information

### Acetyl-Coenzyme A Assay Kit

Catalog Number **MAK039**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

Acetyl-CoA is an essential cofactor and carrier of acyl groups in enzymatic acetyl transfer reactions. It is formed either by the oxidative decarboxylation of pyruvate in mitochondria, by the oxidation of long-chain fatty acids, or by the oxidative degradation of certain amino acids. Acetyl-CoA is the starting compound for the citric acid cycle (Kreb's cycle). It is also a key precursor in lipid biosynthesis and the source of all fatty acid carbons. Acetyl-CoA positively regulates the activity of pyruvate carboxylase. It is a precursor of the neurotransmitter acetylcholine. Histone acetylases (HAT) use Acetyl-CoA as the donor for the acetyl group used in the post-translational acetylation reactions of histone and non-histone proteins.

This kit is a highly sensitive assay for determining Acetyl-CoA level in a variety of biological samples. Acetyl-CoA concentration is determined by a coupled enzyme assay, which results in a fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ) product, proportional to the Acetyl-CoA present. This assay can be set up to determine Acetyl-CoA in either the nmole or pmole range.

### Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Acetyl-CoA Assay Buffer Catalog Number MAK039A	25 mL
Fluorescent Probe, in DMSO Catalog Number MAK039B	0.2 mL
Conversion Enzyme Catalog Number MAK039C	0.1 mL
Acetyl-CoA Enzyme Mix Catalog Number MAK039D	0.5 mL
Acetyl-CoA Substrate Mix Catalog Number MAK039E	1 vL

Coenzyme A Quencher Catalog Number MAK039F	1 mL
Quench Remover Catalog Number MAK039G	1 vL
Acetyl-CoA Standard, 1 $\mu$ mole Catalog Number MAK039H	1 vL

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- 96 well flat-bottom plate – It is recommended to use black plates with clear bottoms for fluorescence assays.
- Fluorescence multiwell plate reader
- Perchloric Acid (PCA) 1.0 M (Catalog Number 34288) or equivalent
- Potassium Bicarbonate (Catalog Number 60339) or equivalent

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Preparation Instructions

Briefly centrifuge vials before opening. Use ultrapure water for the preparation of reagents. To maintain reagent integrity, avoid repeated freeze/thaw cycles.

Acetyl-CoA Assay Buffer – Allow buffer to come to room temperature before use.

Fluorescent Probe – Warm to room temperature prior to use to melt DMSO. Mix well by pipetting, then aliquot and store, protected from light and moisture, at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Acetyl-CoA Substrate Mix – Reconstitute in 220  $\mu$ L of Acetyl-CoA Assay Buffer. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Use within 2 months of reconstitution.

Quench Remover – Reconstitute in 220  $\mu\text{L}$  of water. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Keep on ice while in use. Use within 2 months of reconstitution.

Acetyl-CoA Standard – Reconstitute in 100  $\mu\text{L}$  of water to generate 10 mM standard solution. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Keep on ice while in use. Use within 2 months of reconstitution.

### Storage/Stability

The kit is shipped on wet ice and storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protected from light, is recommended.

### Procedure

All samples and standards should be run in duplicate.

#### Acetyl CoA Standards for Fluorometric Detection

Assay Range (0.2–1 nmole): Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 10 mM Acetyl CoA standard solution with 990  $\mu\text{L}$  of water to prepare a 0.1 mM standard solution. Dilute 100  $\mu\text{L}$  of the 0.1 mM solution into 400  $\mu\text{L}$  of water to prepare a 0.02 mM standard solution. Add 0, 10, 20, 30, 40, and 50  $\mu\text{L}$  of the 0.02 mM Acetyl CoA standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 200, 400, 600, 800, and 1000 pmole/well standards. Add Acetyl-CoA Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

Assay Range (20–100 pmole): Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 10 mM Acetyl CoA standard solution with 990  $\mu\text{L}$  of water to prepare a 0.1 mM standard solution. Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 0.1 mM standard solution with 490  $\mu\text{L}$  of water to make a 2  $\mu\text{M}$  standard solution. Add 0, 10, 20, 30, 40, and 50  $\mu\text{L}$  of the diluted Acetyl CoA standard into a 96 well plate generating 0 (blank), 20, 40, 60, 80, and 100 pmole/well standards. Add Acetyl-CoA Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

#### Sample Preparation

Tissue samples (20–1,000 mg) should be frozen rapidly (liquid  $\text{N}_2$  or methanol/dry ice) and pulverized.

Deproteinize sample by PCA precipitation. Add 2  $\mu\text{L}$  of 1 N perchloric acid/mg of sample, keeping sample cold. Homogenize or sonicate thoroughly. Centrifuge the samples at  $13,000 \times g$  for 10 minutes to remove insoluble material. Neutralize the supernatant with 3 M potassium bicarbonate solution, adding in aliquots of 1  $\mu\text{L}$ /10  $\mu\text{L}$  of supernatant while vortexing until bubble evolution ceases (2–5 aliquots). Cool on ice for 5 minutes. Verify pH is in the range of 6–8, using 1  $\mu\text{L}$  of sample. Spin 2 minutes to pellet potassium bicarbonate.

For unknown samples, it is suggested to test several sample volumes to make sure the readings are within the standard curve range.

Add 1–50  $\mu\text{L}$  of samples into duplicate wells of a 96 well plate. Bring samples to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Acetyl-CoA Assay Buffer. To correct for background created by free Coenzyme A and succinyl-CoA, add 10  $\mu\text{L}$  of Acetyl-CoA Quencher to each sample well. Incubate at room temperature for 5 minutes. Add 2  $\mu\text{L}$  of Quench Remover, mix well and incubate an additional 5 minutes.

Include a blank sample for each sample by omitting the Conversion Enzyme in the Reaction Mix.

#### Assay Reaction

1. Set up the appropriate Reaction Mixes according to the scheme in Table 1. 50  $\mu\text{L}$  of Reaction Mix is required for each reaction (well).

**Table 1.**  
Reaction Mixes

Assay Range (0.2–1 nmole)

Reagent	Samples and Standards	Blank Sample
Acetyl-CoA Assay Buffer	40 $\mu\text{L}$	41 $\mu\text{L}$
Acetyl-CoA Substrate Mix	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Conversion Enzyme	1 $\mu\text{L}$	–
Acetyl-CoA Enzyme Mix	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Fluorescent Probe	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

Assay Range (20–100 pmole)

Reagent	Samples and Standards	Blank Sample
Acetyl-CoA Assay Buffer	41.8 $\mu\text{L}$	42.8 $\mu\text{L}$
Acetyl-CoA Substrate Mix	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Conversion Enzyme	1 $\mu\text{L}$	–
Acetyl-CoA Enzyme Mix	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Fluorescent Probe	0.2 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{L}$

2. Add 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix to each of the wells. Mix well using a horizontal shaker or by pipetting, and incubate the reaction for 10 minutes at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Protect the plate from light during the incubation.
3. Measure fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ).



## Results

### Calculations

The background for the assays is the value obtained for the 0 (blank) Acetyl-CoA standard. Correct for the background by subtracting the blank standard value from all readings. Background values can be significant and must be subtracted from all readings. Use the values obtained from the appropriate Acetyl-CoA standards to plot a standard curve.

Note: A new standard curve must be set up each time the assay is run.

Subtract the blank sample value from the sample reading to obtain the corrected fluorescence measurement. Using the corrected fluorescence measurement, the amount of Acetyl-CoA present in the sample may be determined from the standard curve.

### Concentration of Acetyl-CoA

$$S_a/S_v = C$$

$A_y$  = Amount of Acetyl-CoA in unknown sample (pmole) from standard curve

$S_v$  = Sample volume ( $\mu$ L) added into the wells.

$C$  = Concentration of Acetyl-CoA in sample

Acetyl Coenzyme A molecular weight: 809.6 g/mole.

### Sample Calculation

Amount of Acetyl-CoA ( $S_a$ ) = 25.84 nmole  
(from standard curve)

Sample volume ( $S_v$ ) = 50  $\mu$ L

Concentration of Acetyl-CoA in sample

$$25.84 \text{ nmole}/50 \mu\text{L} = 0.5168 \text{ nmole}/\mu\text{L}$$

$$0.5168 \text{ nmole}/\mu\text{L} \times 809.6 \text{ ng/nmole} = 418.10 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

**Troubleshooting Guide**

<b>Problem</b>	<b>Possible Cause</b>	<b>Suggested Solution</b>
Assay not working	Cold assay buffer	Assay Buffer must be at room temperature
	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For fluorescence assays, use black plates with clear bottoms.
Samples with erratic readings	Samples prepared in different buffer	Use the Assay Buffer provided or refer to Technical Bulletin for instructions
	Samples were not deproteinized	Use PCA precipitation to deproteinize samples
	Cell/Tissue culture samples were incompletely homogenized	Repeat the sample homogenization, increasing the length and extent of homogenization step.
	Samples used after multiple freeze-thaw cycles	Aliquot and freeze samples if samples will be used multiple times
	Presence of interfering substance in the sample	If possible, dilute sample further
	Use of old or inappropriately stored samples	Use fresh samples and store correctly until use
Lower/higher readings in samples and standards	Improperly thawed components	Thaw all components completely and mix gently before use
	Use of expired kit or improperly stored reagents	Check the expiration date and store the components appropriately
	Allowing the reagents to sit for extended times on ice	Prepare fresh Reaction Mix before each use
	Incorrect incubation times or temperatures	Refer to Technical Bulletin and verify correct incubation times and temperatures
	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
Non-linear standard curve	Use of partially thawed components	Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix
	Pipetting errors in preparation of standards	Avoid pipetting small volumes
	Pipetting errors in the Reaction Mix	Prepare a Reaction Mix whenever possible
	Air bubbles formed in well	Pipette gently against the wall of the plate well
	Standard stock is at incorrect concentration	Refer to the standard dilution instructions in the Technical Bulletin
	Calculation errors	Recheck calculations after referring to Technical Bulletin
	Substituting reagents from older kits/lots	Use fresh components from the same kit
Unanticipated results	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings
	Samples contain interfering substances	If possible, dilute sample further
	Sample readings above/below the linear range	Concentrate or dilute samples so readings are in the linear range

LS,MF,MAM 03/12-1

## **ANEXO I**

Tradução – Kit enzimático para determinação da acetil-coenzima A



## Informação do produto

### Kit enzimático para determinação da acetil-coenzima A

Número de catálogo **MAK039**

Temperatura de armazenamento -20 °C

## FICHA TÉCNICA

### Descrição do produto

A acetil-CoA é um cofator essencial e um transportador de grupos acilo em reações enzimáticas de transferência de grupos acetilo. Forma-se na matriz mitocondrial, quer pela descarboxilação oxidativa do piruvato, quer pela oxidação de ácidos gordos de cadeia longa, ou ainda pela degradação de alguns aminoácidos. A acetil-CoA é o composto inicial do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). É também um precursor chave na biossíntese lipídica e a origem de todos os ácidos gordos carboxílicos. A acetil-CoA regula positivamente a atividade do piruvato carboxilase. É um precursor do neurotransmissor acetilcolina. As histona-acetilases (HAT) utilizam a acetil-CoA como dador do grupo acetilo, utilizada em reações de acetilação pós-translacional de histonas e de proteínas não-histonas.

Este kit é um ensaio altamente sensível para a determinação do nível de acetil-CoA em várias amostras biológicas. A concentração de acetil-CoA é determinada por um ensaio conjugado de enzimas, o qual resulta num produto fluorimétrico ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm), proporcional à quantidade de acetil-CoA presente na amostra. Este ensaio pode ser preparado para determinar a concentração de acetil-CoA na gama de nmol quer na de pmol.

### Componentes

O kit permite 100 ensaios em placas de 96 poços.

Solução de ensaio acetil-CoA Número de catálogo MAK039A	25 mL
Sonda fluorescente, em DMSO Número de catálogo MAK039B	0,2 mL
Enzima de conversão Número de catálogo MAK039C	0,1 mL
Mistura de enzima acetil-CoA Número de catálogo MAK039D	0,5 mL
Mistura substrato de acetil-CoA Número de catálogo MAK039E	1 vL

Supressor Coenzima A Número de catálogo MAK039F	1 mL
Removedor de supressor Número de catálogo MAK039G	1 vL
Padrão de acetil-CoA, 1 $\mu$ mol Número de catálogo MAK039H	1 vL

### Reagentes e equipamento necessários mas não fornecidos.

- Placa de 96 poços com fundo plano - recomenda-se o uso de placas pretas de fundo claro para ensaios por fluorescência;
- Leitor de fluorescência em placas multipoços;
- Ácido perclórico (PCA) 1.0 M (número de catálogo 34288) ou equivalente
- Hidrogenocarbonato de potássio (número de catálogo 60339) ou equivalente.

### Avisos e precauções

Este produto destina-se ao uso exclusivo em I&D. Não deve ser usado como medicamento, em usos domésticos ou para outros fins. Por favor, consulte a ficha de dados de segurança de material (MSDS) para informação relativamente às práticas de segurança e riscos de manuseamento dos materiais.

### Instruções de preparação

Centrifugue os frascos de vidro brevemente antes de abrir. Utilize água ultrapura para a preparação dos reagentes. Para manter a integridade dos reagentes, evite ciclos repetidos de congelação/descongelação.

Solução de ensaio acetil-CoA - Antes de usar, aguarde que a solução atinja a temperatura ambiente.

Sonda fluorescente - Antes de usar, aqueça até atingir a temperatura ambiente para fundir o DMSO. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene, ao abrigo da luz e da humidade, a -20 °C.

Mistura substrato de acetil-CoA – Dissolva em 220  $\mu$ L de solução de ensaio acetil-CoA. Misture bem com a

ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Utilize no espaço de 2 meses após a solubilização.

Removedor de supressor - Dissolva em 220 µL de água. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Mantenha as soluções em gelo durante a utilização. Utilize no espaço de 2 meses após a solubilização.

Padrão acetil-CoA - Dissolva em 100 µL de água para obter uma solução padrão a 10 mM. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Durante a utilização, mantenha a solução em gelo. Utilize no espaço de 2 meses após a reconstituição.

### Armazenamento/Estabilidade

O kit é enviado em gelo normal. Recomenda-se o seu armazenamento a -20 °C, ao abrigo da luz.

### Procedimento

Devem ser efetuados duplicados de todas as amostras e padrões,

#### Padrões acetil-CoA para deteção fluorimétrica

Gama dos ensaios (0,2 – 1 nmol): Para preparar uma solução padrão 0,1 mM, adicione 10 µL da solução padrão de acetil-CoA 10 mM a 990 µL de água. Para preparar uma solução padrão de 0,02 mM, dilua 100 µL da solução 0,1 mM em 400 µL de água. Adicione 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µL de solução padrão de acetil-CoA 0,02 mM numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 200, 400, 600, 800 e 1000 pmol/poço. Adicione a solução de ensaio acetil-CoA a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

Gama do ensaio (20 – 100 pmol): Para preparar uma solução padrão de 0,1 mM, dilua 10 µL da solução padrão de acetil-CoA 10 mM com 990 µL de água. Para fazer uma solução padrão de 2 µM, dilua 10 µL da solução padrão 0,1 mM com 490 µL de água. Adicione 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µL da solução padrão diluída de acetil-CoA diluída numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 20, 40, 60, 80 e 100 pmol/poço. Adicione a solução de ensaio acetil-CoA em cada poço até perfazer o volume de 50 µL.

#### Preparação das amostras:

As amostras de tecido (20 – 1.000 mg) devem ser congeladas rapidamente (N<sub>2</sub> líquido ou metanol/gelo seco) e pulverizadas.

Desproteíne a amostra por precipitação com ácido perclórico. Adicione 2 µL de ácido perclórico 1 N/mg de amostra, mantendo a amostra fria. Homogeneizar ou sonicar cuidadosamente. Centrifugue as amostras a 13.000 x g durante 10 minutos para remover material insolúvel. Neutralize o sobrenadante com uma solução de hidrogenocarbonato de potássio 3 M, adicionando em alíquotas de 1 µL/10 µL de sobrenadante, enquanto agita num vórtice, até à libertação de bolhas gasosas (2-5 alíquotas). Arrefeça em gelo durante 5 minutos. Verifique se

o pH se encontra no intervalo de 6-8, utilizando 1 µL de amostra. Agite 2 minutos para dissolver o hidrogenocarbonato de potássio.

Para amostras desconhecidas, sugere-se testar vários volumes de amostra para verificar se as leituras se encontram na gama da curva padrão.

Adicione em poços 1 – 50 µL de amostra em duplicado numa placa de 96 poços. Perfazer para um volume final de 50 µL, com solução de ensaio acetil-CoA. Para corrigir a linha de base criada pelas coenzima A e pela succinil-CoA livres, adicione 10 µL de supressor de acetil-CoA em cada poço. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos. Adicione 2 µL de removedor de supressor, misture bem e incube de novo durante mais 5 minutos.

Inclua um branco para cada uma das amostras, omitindo a enzima de conversão na mistura em reação.

#### Reação de ensaio

1. Prepare as misturas de reação adequadas de acordo com o esquema da Tabela 1. São necessários 50 µL da mistura de reação para cada reação (poço).

**Tabela 1.**

Misturas de reação

Gama do ensaio (0,2 – 1 nmol)

Reagente	Amostras e padrões	Branco
Solução de ensaio acetil-CoA	40 µL	41 µL
Mistura substrato de acetil-CoA	2 µL	2 µL
Enzima de conversão	1 µL	–
Mistura enzima acetil-CoA	5 µL	5 µL
Sonda fluorescente	2 µL	2 µL

Gama do ensaio (20–100 pmol)

Reagente	Amostras e padrões	Branco
Solução de ensaio acetil-CoA	41,8 µL	42,8 µL
Mistura substrato acetil-CoA	2 µL	2 µL
Enzima de conversão	1 µL	–
Mistura enzima acetil-CoA	5 µL	5 µL
Sonda fluorescente	0,2 µL	0,2 µL

2. Adicione 50 µL de mistura de reação adequada a cada um dos poços. Misture bem com um agitador horizontal ou com a ajuda de uma pipeta, e incube, durante 10 minutos, a 37 °C. Proteja a placa da luz durante a incubação.
3. Meça a intensidade de fluorescência ( $\lambda_{ex} = 535 / \lambda_{em} = 587$  nm).

## Resultados

### Cálculos

A linha de base para os ensaios é o valor obtido para o padrão de acetil-CoA 0 (branco). Corrija o sinal base subtraindo o valor do branco a todas as leituras. Os valores do sinal base podem ser significativos e devem ser subtraídos a todas as leituras. Utilize os valores obtidos com os padrões de acetil-CoA adequados para traçar a curva padrão.

Nota: Sempre que analise novas amostras, deverá traçar uma nova curva padrão.

Subtraia o valor do branco à leitura de cada amostra para obter a medida de fluorescência correta. A quantidade de acetil-CoA presente em cada amostra é determinada através da curva padrão, utilizando a medida de fluorescência corrigida.

### Concentração de acetil-CoA

$$S_a/S_v = C$$

$A_y$  = Quantidade de acetil-CoA na amostra desconhecida (pmol) determinada a partir da curva padrão

$S_v$  = Volume de amostra ( $\mu$ L) adicionado aos poços

$C$  = Concentração da acetil-CoA na amostra

Peso molecular da acetil coenzima A: 809,6 g/mol.

### Cálculo da concentração de acetil-CoA na amostra

Quantidade de acetil-CoA ( $S_a$ ) = 25,84 nmol  
(determinada a partir da curva padrão)

Volume de amostra ( $S_v$ ) = 50  $\mu$ L

Concentração de acetil-CoA numa amostra

$$25,84 \text{ nmol}/50 \mu\text{L} = 0,5168 \text{ nmol}/\mu\text{L}$$

$$0,5168 \text{ nmol}/\mu\text{L} \times 809,6 \text{ ng/nmol} = 418,10 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

## Guia para resolução de problemas

Problema	Causa provável	Solução sugerida
O ensaio não funciona	Solução do ensaio a temperatura baixa	A solução de ensaio deve estar à temperatura ambiente
	Omissão de um dos passos no procedimento	Consulte e siga exatamente a ficha técnica
	Leitor de placas a um comprimento de onda incorreto	Verifique as definições dos filtros dos instrumentos
	Tipo de placa de 96 poços utilizado	Para ensaios por fluorescência, utilize placas pretas de fundo claro
Amostras com leituras erráticas	Amostras preparadas em soluções diferentes	Utilize a solução de ensaio fornecida ou consulte as instruções na ficha técnica
	As amostras não foram desproteinizadas	Utilize a precipitação com ácido perclórico para desproteinar as amostras
	As amostras de cultura de células ou tecidos não foram completamente homogeneizadas	Repita a homogeneização da amostra, aumentando a duração e a extensão do passo de homogeneização
	Amostras usadas após múltiplos ciclos de congelação-descongelação	Faça alíquotas e congele as amostras, se estas tiverem de ser usadas várias vezes
	Presença de substâncias interferentes na amostra	Se possível, faça uma diluição adicional das amostras
	Uso de amostras velhas ou incorretamente armazenadas inapropriadamente	Utilize amostras recentes e armazene-as de forma adequada
Intensidades mais baixas/mais elevadas em amostras e padrões	Componentes descongelados incorretamente	Descongele completamente todos os componentes completamente e misture-os ligeiramente antes de usar
	Uso de kit fora de prazo de validade ou de reagentes armazenados incorretamente	Verifique a data de validade e armazene os componentes de forma adequada
	Reagentes deixados em gelo durante largos períodos de tempo	Prepare uma nova mistura de reação antes de cada utilização
	Tempos de incubação ou temperaturas incorretas	Consulte a ficha técnica e verifique os tempos de incubação e as temperaturas corretas
	Utilização de volumes incorretos	Utilize pipetas calibradas e prepare as alíquotas corretamente
Curva padrão fora da gama pretendida	Utilização de componentes parcialmente congelados	Descongele e volte a suspender todos os componentes antes de preparar a mistura de reação
	Erros de pipetagem durante a preparação de padrões	Evite pipetar volumes muito pequenos
	Erros de pipetagem na mistura de reação	Prepare uma mistura de reação sempre que possível.
	Bolhas de ar formadas no poço	Pipetar os poços da placa ligeiramente
	O padrão stock tem uma concentração incorreta	Consulte na ficha técnica as instruções de diluição de padrões
	Erros nos cálculos	Refaça os cálculos após consulta da ficha técnica
	Reagentes substituídos de lotes/kits antigos	Utilize componentes novos do mesmo kit
Resultados não esperados	Medição da fluorescência das amostras a comprimento de onda incorretos	Verifique as definições do equipamento e do filtro
	As amostras contêm substâncias interferentes	Se possível, faça mais uma diluição
	Valores das leituras da amostra acima/abaixo da gama linear da curva de calibração	Concentre ou dilua as amostras para que as leituras se encontrem no intervalo linear da reta de calibração

LS, MF, MAM 03/12-1



## **ANEXO J**

Texto 2 – Asparaginase Activity Assay Kit



## Product Information

### Asparaginase Activity Assay Kit

Catalog Number **MAK007**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

Asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of asparagine to aspartate. While asparaginase is synthesized by plants, microorganisms, and some animals, it does not occur naturally in humans. While most cells have the ability to synthesize asparagine, many hematopoietic cells do not and depend on exogenous asparagine for protein synthesis. Treatment of certain hematopoietic malignancies such as acute lymphoblastic leukemia (ALL), with asparaginase results in depletion of blood levels of asparagine resulting in cell cycle arrest and apoptosis. Asparaginase is also used in the food industry to reduce the formation of acrylamide in starchy and fried foods.

The Asparaginase Activity Assay Kit provides a simple and direct procedure for measuring Asparaginase activity in a variety of biological samples. Asparaginase activity is determined by a coupled enzyme assay, which results in a colorimetric (570 nm)/fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ) product, proportional to the aspartate generated. One milliunit (mU) of Asparaginase is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1.0  $\mu\text{mole}$  of aspartate per minute at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Asparaginase Assay Buffer Catalog Number MAK007A	25 mL
Fluorescent Peroxidase Substrate, in DMSO Catalog Number MAK007B	0.2 mL
Substrate Mix Catalog Number MAK007C	1 vL
Aspartate Enzyme Mix Catalog Number MAK007D	1 vL
Conversion Mix Catalog Number MAK007E	1 vL

Asparaginase Assay Positive Control  
Catalog Number MAK007F

1 vL

Aspartate Standard, 100 mM  
Catalog Number MAK007G

0.1 mL

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- 96 well flat-bottom plate – It is recommended to use black plates with clear bottoms for fluorescence assays and clear plates for colorimetric assays.
- Fluorescence or spectrophotometric multiwell plate reader

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Preparation Instructions

Briefly centrifuge vials before opening. Use ultrapure water for the preparation of reagents. To maintain reagent integrity, avoid repeated freeze/thaw cycles.

Asparaginase Assay Buffer – Allow buffer to come to room temperature before use.

Fluorescent Peroxidase Substrate – Allow reagent to come to room temperature before use. Mix well by pipetting, then aliquot and store, protected from light and moisture, at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Upon thawing, the Fluorescent Peroxidase Substrate is ready-to-use in the colorimetric assay.

For the fluorescence assay, dilute an aliquot of the Fluorescent Peroxidase Substrate 5 to 10-fold with Asparaginase Assay Buffer, just prior to use. This will reduce the background of the fluorescence assay.

Substrate Mix – Reconstitute in 0.5 mL of water. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Use within two months of reconstitution.

Aspartate Enzyme Mix and Conversion Mix – Reconstitute each in 220  $\mu\text{L}$  of Asparaginase Assay Buffer. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Use within two months of reconstitution.

Asparaginase Assay Positive Control – Reconstitute in 100  $\mu\text{L}$  of Asparaginase Assay Buffer. Mix well by pipetting, then aliquot and store at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Use within two months of reconstitution.

### Storage/Stability

The kit is shipped on wet ice. Storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protected from light, is recommended.

### Procedure

All samples and standards should be run in duplicate.

#### Aspartate Standards for Colorimetric Detection

Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 100 mM (100 nmole/ $\mu\text{L}$ ) Aspartate Standard Solution with 990  $\mu\text{L}$  of Asparaginase Assay Buffer to prepare a 1 mM (1 nmole/ $\mu\text{L}$ ) standard solution. Add 0, 2, 4, 6, 8, and 10  $\mu\text{L}$  of the 1 mM Aspartate standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 2, 4, 6, 8, and 10 nmole/well standards. Add Asparaginase Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

#### Aspartate Standards for Fluorometric Detection

Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 100 mM (100 nmole/ $\mu\text{L}$ ) Aspartate Standard Solution with 990  $\mu\text{L}$  of Asparaginase Assay Buffer to prepare a 1 mM (1 nmole/ $\mu\text{L}$ ) standard solution. Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 1 mM standard solution with 90  $\mu\text{L}$  of Asparaginase Assay Buffer to generate a 0.1 mM (0.1 nmole/ $\mu\text{L}$ ) standard solution. Add 0, 2, 4, 6, 8, and 10  $\mu\text{L}$  of the 0.1 mM Aspartate standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 nmole/well standards. Add Asparaginase Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

#### Sample Preparation

Both the colorimetric and fluorometric assays require 50  $\mu\text{L}$  of sample for each reaction (well).

Tissue or cells should be rapidly homogenized with 4 volumes of Asparaginase Assay Buffer. Centrifuge at  $15,000 \times g$  for 10 minutes to remove insoluble materials. Bring samples to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Asparaginase Assay Buffer.

Serum samples can be directly added to wells. Add 1–50  $\mu\text{L}$  samples into wells of a 96 well plate. Bring samples to final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Asparaginase Assay Buffer.

For unknown samples, it is suggested to test several sample volumes to make sure the readings are within the standard curve range.

For the positive control (optional), add 5  $\mu\text{L}$  of the Asparaginase Assay Positive Control to wells. Adjust well volume to 50  $\mu\text{L}$  with water.

Aspartate, oxaloacetate, and pyruvate in the samples will generate a background signal. To remove the effect of background, a sample blank may be set up by omitting the Aspartate Enzyme Mix. The blank readings can then be subtracted from the sample readings.

#### Assay Reaction

1. Set up the Reaction Mixes according to the scheme in Table 1. Prepare enough Reaction Mixes for the number of samples, positive controls, and standards to be performed.

**Table 1.**  
Reaction Mixes

Reagent	Samples and Standards	Sample Blank
Asparaginase Assay Buffer	40 $\mu\text{L}$	42 $\mu\text{L}$
Substrate Mix	4 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
Aspartate Enzyme Mix	2 $\mu\text{L}$	–
Conversion Mix	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Fluorescent Peroxidase Substrate	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

2. Add 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix to each well. Mix well using a horizontal shaker or by pipetting.
3. After 2–3 minutes, take the initial measurement ( $T_{\text{initial}}$ ). For colorimetric assays, measure the absorbance at 570 nm ( $A_{570}$ )<sub>initial</sub>. For fluorometric assays, measure fluorescence intensity ( $\text{FLU}_{\text{initial}}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ).
4. Incubate the plate at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  taking measurements every 5 minutes. Protect the plate from light during the incubation.

5. Continue taking measurements until the value of the most active sample is greater than the value of the highest standard. At this time the most active sample is near or exceeds the end of the linear range of the standard curve.
6. The final measurement for calculating the enzyme activity would be the penultimate reading or the value before the most active sample is near or exceeds the end of the linear range of the standard curve. The time of the penultimate reading is  $T_{\text{final}}$ .
7. Calculate the change in measurement from  $T_{\text{initial}}$  to  $T_{\text{final}}$ .

$$\Delta A_{570} = (A_{570})_{\text{final}} - (A_{570})_{\text{initial}}$$

or

$$\Delta \text{FLU} = (\text{FLU}_{\text{final}}) - (\text{FLU}_{\text{initial}})$$

**Note:** It is essential the initial and final measurements fall within the linear range of the reaction.

## Results

### Calculations

Correct for the background by subtracting the value obtained for the 0 (blank) standard from all readings. Plot the aspartate standard curve.

**Note:** A new standard curve must be set up each time the assay is run.

Compare the  $\Delta$ measurement value ( $\Delta A_{570}$  or  $\Delta \text{FLU}$ ) of each sample to the standard curve to determine the amount of aspartate generated (B) between  $T_{\text{initial}}$  and  $T_{\text{final}}$ .

The Asparaginase activity of a sample may be determined by the following equation:

$$\text{Asparaginase Activity} = \frac{B \times \text{Sample Dilution Factor}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}) \times V}$$

B = Amount (nmole) of aspartate generated between  $T_{\text{initial}}$  and  $T_{\text{final}}$

$T_{\text{initial}}$  = Time of first reading in minutes.

$T_{\text{final}}$  = Time of second reading in minutes.

V = sample volume (mL) added to well.

Asparaginase activity is reported as nmole/min/mL = milliunit/mL, where one milliunit (mU) of Asparaginase is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1.0  $\mu\text{mole}$  of aspartate per minute at 25 °C.

**Troubleshooting Guide**

<b>Problem</b>	<b>Possible Cause</b>	<b>Suggested Solution</b>
Assay Not Working	Cold assay buffer	Assay Buffer must be at room temperature
	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For fluorescence assays, use black plates with clear bottoms. For colorimetric assays, use clear plates
Samples with erratic readings	Samples prepared in different buffer	Use the Assay Buffer provided or refer to Technical Bulletin for instructions
	Cell/Tissue culture samples were incompletely homogenized	Repeat the sample homogenization, increasing the length and extent of homogenization step.
	Samples used after multiple freeze-thaw cycles	Aliquot and freeze samples if samples will be used multiple times
	Presence of interfering substance in the sample	If possible, dilute sample further
	Use of old or inappropriately stored samples	Use fresh samples and store correctly until use
Lower/higher readings in samples and standards	Improperly thawed components	Thaw all components completely and mix gently before use
	Use of expired kit or improperly stored reagents	Check the expiration date and store the components appropriately
	Allowing the reagents to sit for extended times on ice	Prepare fresh reaction mix before each use
	Incorrect incubation times or temperatures	Refer to Technical Bulletin and verify correct incubation times and temperatures
	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
Non-linear standard curve	Use of partially thawed components	Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix
	Pipetting errors in preparation of standards	Avoid pipetting small volumes
	Pipetting errors in the Reaction Mix	Prepare a master Reaction Mix whenever possible
	Air bubbles formed in well	Pipette gently against the wall of the plate well
	Standard stock is at incorrect concentration	Refer to the standard dilution instructions in the Technical Bulletin
	Calculation errors	Recheck calculations after referring to Technical Bulletin
	Substituting reagents from older kits/lots	Use fresh components from the same kit
Unanticipated results	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings
	Samples contain interfering substances	If possible, dilute sample further
	Sample readings above/below the linear range	Concentrate or dilute samples so readings are in the linear range

LS,MAM 10/12-1

## **ANEXO K**

Tradução – Kit enzimático para determinação da atividade da asparaginase





## Informação do produto

### Kit enzimático para determinação da atividade da asparaginase

Número de catálogo **MAK007**

Temperatura de armazenamento -20 °C

## FICHA TÉCNICA

### Descrição do produto

A asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da asparagina a aspartato. Embora a asparaginase seja sintetizada pelas plantas, microrganismos e por alguns animais, o mesmo não acontece nos humanos. Embora a maior parte das células tenha a capacidade para sintetizar a asparagina, muitas células hematopoiéticas não a têm e dependem da asparagina exógena para sintetizar as proteínas. O tratamento com asparaginase de certas malignidades hematopoiéticas, tais como a leucemia linfoblástica aguda (LLA), resulta na redução dos níveis de asparagina no sangue, que se traduz na paragem do ciclo celular e na consequente apoptose. A asparaginase é também utilizada na indústria alimentar para reduzir a formação de acrilamida em alimentos panados e fritos.

O kit enzimático para determinação da atividade da asparaginase oferece um procedimento simples e direto para medir a atividade da asparaginase em várias amostras biológicas. A atividade da asparaginase é determinada por um ensaio conjugado de enzimas, o qual resulta num produto colorimétrico (570 nm)/fluorimétrico ( $\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$  /  $\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$ ), proporcional à quantidade de aspartato produzido. Uma miliunidade (mU) de asparaginase é definida pela quantidade de enzimas que catalisam a formação de 1,0  $\mu\text{mol}$  de aspartato por minuto, a 25 °C.

### Componentes

O kit permite 100 ensaios em placas de 96 poços.

Solução de ensaio asparaginase Número de catálogo MAK007A	25 mL
Substrato de peroxidase fluorescente, em DMSO Número de catálogo MAK007B	0,2 mL
Mistura substrato Número de catálogo MAK007C	1 vL
Mistura de enzima aspartato Número de catálogo MAK007D	1 vL
Mistura de conversão Número de catálogo MAK007E	1 vL

Controlo positivo de ensaio da asparaginase Número de catálogo MAK007F	1 vL
---	------

Padrão aspartato, 100 mM Número de catálogo MAK007G	0,1 mL
--	--------

### Reagentes e equipamento necessários mas não fornecidos.

- Placa de 96 poços com fundo plano - recomenda-se o uso de placas pretas de fundo claro para ensaios por fluorescência e placas claras para ensaios colorimétricos.

- Leitor de fluorescência em placas multiusos ou espectrofotómetro

### Avisos e precauções

Este produto destina-se apenas para o uso exclusivo em I&D. Não deve ser usado como medicamento, em usos domésticos ou para outros fins. Por favor, consulte a ficha de dados de segurança de material (MSDS) para informação relativamente às práticas de segurança e riscos de manuseamento do material.

### Instruções de preparação

Centrifugue os frascos de vidro brevemente antes de abrir. Utilize água ultrapura para a preparação dos reagentes. Para manter a integridade do reagente, evite ciclos repetidos de congelação/descongelação.

Solução de ensaio asparaginase - Antes de usar, aguarde que o tampão esteja à temperatura ambiente.

Substrato de peroxidase fluorescente - Antes de usar, aguarde que o reagente atinja a temperatura ambiente. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene, ao abrigo da luz e da humidade, a -20 °C. Após a descongelação, o substrato de peroxidase fluorescente está pronto para ser usado no ensaio colorimétrico.

Para o ensaio de fluorescência, dilua uma alíquota de substrato de peroxidase fluorescente entre 5 a 10 vezes com solução de ensaio asparaginase, precisamente antes de usar. Desta forma, irá reduzir o sinal base do ensaio de fluorescência.

Mistura substrato - Dissolva em 0,5 mL de água. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Utilize no espaço de dois meses após a solubilização.

Mistura de enzima aspartato e mistura de conversão – Dissolva cada uma em 220 µL de solução de ensaio asparaginase. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Utilize no espaço de dois meses após a solubilização.

Controlo positivo de ensaio da asparaginase – Dissolva em 100 µL de solução de ensaio asparaginase. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Utilize no espaço de dois meses após a solubilização.

### **Armazenamento/Estabilidade**

O kit é enviado em gelo normal. Recomenda-se o seu armazenamento a -20 °C, ao abrigo da luz.

### **Procedimento**

Devem ser efetuados duplicados de todas as amostras e padrões.

#### Padrões aspartato para deteção colorimétrica

Para preparar uma solução padrão de 1 mM (1 nmol/µL), adicione 10 µL da solução padrão aspartato 100 mM (100 nmol/µL) a 990 µL de solução de ensaio asparaginase. Adicione 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL da solução padrão aspartato 1 mM numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 2, 4, 6, 8 e 10 nmol/poço. Adicione a solução de ensaio da asparaginase a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

#### Padrões aspartato para deteção fluorimétrica

Para preparar uma solução padrão 1 mM (1 nmol/µL), adicione 10 µL da solução padrão de aspartato 100 mM (100 nmol/µL) a 990 µL de solução de ensaio asparaginase. Para preparar uma solução padrão de 0,1 mM (0,1 nmol/µL), adicione 10 µL de solução padrão 1 mM a 90 µL da solução de ensaio asparaginase. Adicione 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL de solução padrão de aspartato 0,1 mM numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 nmol/poço. Adicione a solução de ensaio asparaginase a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

#### Preparação das amostras

Quer o ensaio colorimétrico quer o fluorimétrico requerem 50 µL de amostra para cada reação (poço).

Os tecidos e as células devem ser rapidamente homogeneizados com 4 volumes de solução de ensaio asparaginase. Centrifugue a 15.000 x g durante 10 minutos para remover material insolúvel. Perfazer para

um volume final de 50 µL, com solução de ensaio asparaginase.

As amostras de soro podem ser adicionadas diretamente aos poços. Adicione 1 – 50 µL de amostras nos poços da placa de 96 poços. Perfazer para um volume final de 50 µL, com solução de ensaio asparaginase.

Para amostras desconhecidas, sugere-se testar vários volumes de amostra para verificar se as leituras se encontram na gama da curva padrão.

Para o controlo positivo (opcional), adicione 5 µL de controlo positivo de ensaio da asparaginase aos poços. Ajuste o volume do poço com água até 50 µL.

O aspartato, o oxaloacetato e o piruvato presente nas amostras produzem um sinal base. Para corrigir a linha de base, prepare um branco, omitindo a mistura de enzima aspartato. As leituras do branco podem ser subtraídas às leituras da amostra.

#### Reação de ensaio

1. Prepare as misturas de reação de acordo com o esquema da Tabela 1. Prepare misturas de reação suficientes para que o número de amostras, os controlos positivos e os padrões possam ser efetuados.

**Tabela 1.**  
Misturas de reação

Reagente	Amostras e padrões	Branco
Solução de ensaio asparaginase	40 µL	42 µL
Mistura substrato	4 µL	4 µL
Mistura de enzima aspartato	2 µL	–
Mistura de conversão	2 µL	2 µL
Substrato de peroxidase fluorescente	2 µL	2 µL

2. Adicione 50 µL de mistura de reação adequada a cada um dos poços. Misture bem com um agitador horizontal ou com a ajuda de uma pipeta.
3. Após 2 – 3 minutos, anote a medida inicial ( $T_{inicial}$ ). Para ensaios colorimétricos, meça a absorvância a 570 nm ( $A_{570}$ )<sub>inicial</sub>. Para ensaios fluorimétricos, meça a intensidade de fluorescência ( $FLU_{inicial}$ ,  $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm).
4. Incube a placa a 25 °C, anotando as medidas a cada 5 minutos. Proteja a placa da luz durante a incubação.

5. Continue a anotar as medidas até que o valor da amostra mais ativa seja maior do que o valor do padrão mais alto. Neste momento, a amostra mais ativa está perto ou excede o fim da gama linear da curva padrão.
6. A medida final para calcular a atividade enzimática é a penúltima leitura ou quando o valor antes da amostra mais ativa estiver perto ou exceder o final da gama linear da curva padrão. O tempo da penúltima leitura é  $T_{\text{final}}$ .
7. Calcule a alteração na medida do  $T_{\text{inicial}}$  ao  $T_{\text{final}}$ .

$$\Delta A_{570} = (A_{570})_{\text{final}} - (A_{570})_{\text{inicial}}$$

ou

$$\Delta \text{FLU} = (\text{FLU})_{\text{final}} - (\text{FLU})_{\text{inicial}}$$

Nota: São necessárias as medições iniciais e finais da descida da gama linear da reação.

## Resultados

### Cálculos

Corrija o sinal base subtraindo o valor do branco a todas as leituras. Trace a curva padrão do aspartato.

Nota: Sempre que analise novas amostras, deverá traçar uma nova curva padrão.

Compare o  $\Delta$ valor de medição ( $\Delta A_{570}$  ou  $\Delta \text{FLU}$ ) de cada amostra com a curva padrão para determinar a quantidade de aspartato originada (B) entre o  $T_{\text{inicial}}$  e o  $T_{\text{final}}$ .

A atividade da asparaginase de uma amostra é determinada através da seguinte equação:

$$\text{Atividade da asparaginase} = \frac{B \times \text{Factor de diluição da amostra}}{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) \times V}$$

B = Quantidade (nmol) de aspartato originada entre o  $T_{\text{inicial}}$  e o  $T_{\text{final}}$

$T_{\text{inicial}}$  = Tempo da primeira leitura em minutos.

$T_{\text{final}}$  = Tempo da segunda leitura em minutos.

V = Volume da amostra (mL) adicionado ao poço.

A atividade da asparaginase é referida como nmol/min/mL = milliunit/mL, na qual uma miliunidade (mU) de asparaginase é definida pela quantidade de enzimas que catalisam a formação de 1,0  $\mu$ mol de aspartato por minuto, a 25 °C.

**Guia para resolução de problemas**

<b>Problema</b>	<b>Causa provável</b>	<b>Solução sugerida</b>
O ensaio não funciona	Solução do ensaio a temperatura baixa	A solução de ensaio deve estar à temperatura ambiente
	Omissão de um dos passos no procedimento	Consulte e siga exatamente a ficha técnica
	Leitor de placas a um comprimento de onda incorreto	Verifique as definições dos filtros dos instrumentos
	Tipo de placa de 96 poços utilizado	Para ensaios por fluorescência, utilize placas pretas de fundo claro
Amostras com leituras erráticas	Amostras preparadas em soluções diferentes	Utilize a solução de ensaio fornecida ou consulte as instruções na ficha técnica
	As amostras não foram desproteinizadas	Utilize a precipitação com ácido perclórico para desproteínizar as amostras
	As amostras de cultura de células ou tecidos não foram completamente homogeneizadas	Repita a homogeneização da amostra, aumentando a duração e a extensão do passo de homogeneização
	Amostras usadas após múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento	Faça alíquotas e congele as amostras, se estas tiverem de ser usadas várias vezes
	Presença de substâncias interferentes na amostra	Se possível, faça uma diluição adicional das amostras
	Uso de amostras velhas ou incorretamente armazenadas inapropriadamente	Utilize amostras recentes e armazene-as de forma adequada
Intensidades mais baixas/mais elevadas em amostras e padrões	Componentes descongelados incorretamente	Descongele completamente todos os componentes completamente e misture-os ligeiramente antes de usar
	Uso de kit fora de prazo de validade ou de reagentes armazenados incorretamente	Verifique a data de validade e armazene os componentes de forma adequada
	Reagentes deixados em gelo durante largos períodos de tempo	Prepare uma nova mistura de reação antes de cada utilização
	Tempos de incubação ou temperaturas incorretas	Consulte a ficha técnica e verifique os tempos de incubação e as temperaturas corretas
	Utilização de volumes incorretos	Utilize pipetas calibradas e prepare as alíquotas corretamente
Curva padrão fora da gama pretendida	Utilização de componentes parcialmente congelados	Descongele e volte a suspender todos os componentes antes de preparar a mistura de reação
	Erros de pipetagem durante a preparação de padrões	Evite pipetar volumes muito pequenos
	Erros de pipetagem na mistura de reação	Prepare uma mistura de reação sempre que possível.
	Bolhas de ar formadas no poço	Pipetar os poços da placa ligeiramente
	O padrão stock tem uma concentração incorreta	Consulte na ficha técnica as instruções de diluição de padrões
	Erros nos cálculos	Refaça os cálculos após consulta da ficha técnica
	Reagentes substituídos de lotes/kits antigos	Utilize componentes novos do mesmo kit
Resultados não esperados	Medição da fluorescência das amostras a comprimento de onda incorretos	Verifique as definições do equipamento e do filtro
	As amostras contêm substâncias interferentes	Se possível, faça mais uma diluição
	Valores das leituras da amostra acima/abaixo da gama linear da curva de calibração	Concentre ou dilua as amostras para que as leituras se encontrem no intervalo linear da reta de calibração

LS, MF, MAM 03/12-1

## **ANEXO L**

Texto 3 – HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit



## Product Information

### HDL and LDL/VLDL Quantitation Kit

Catalog Number **MAK045**

Storage Temperature –20 °C

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

Lipoproteins transport the majority of plasma lipids including cholesterol and triglycerides. High-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and very-low-density lipoprotein (VLDL) are the lipoproteins responsible for the vast majority of cholesterol transport in the blood. High LDL levels and low HDL levels are strongly associated with increased risk of adverse cardiovascular events.

In this kit, serum HDL and LDL/VLDL are first separated and then the cholesterol concentration of each is determined by a coupled enzyme assay, which results in a colorimetric (570 nm)/fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587$  nm) product, proportional to the cholesterol present. This kit can also be used to determine the concentration of free cholesterol and cholesteryl esters present in a sample. This kit is suitable for use with plasma and serum samples.

### Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Cholesterol Assay Buffer Catalog Number MAK045A	25 mL
2× LDL/VLDL Precipitation Buffer Catalog Number MAK045B	10 mL
Cholesterol Probe in DMSO Catalog Number MAK045C	0.2 mL
Enzyme Mix Catalog Number MAK045D	1 vL
Cholesterol Esterase Catalog Number MAK045E	1 vL
Cholesterol Standard, 2 µg/µL Catalog Number MAK045F	0.1 mL

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- 96 well flat-bottom plate – It is recommended to use black plates with clear bottoms for fluorescence assays and clear plates for colorimetric assays.
- Fluorescence or spectrophotometric multiwell plate reader
- Phosphate Buffered Saline (Catalog Number P5368 or equivalent)

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Preparation Instructions

Briefly centrifuge vials before opening. To maintain reagent integrity, avoid repeated freeze/thaw cycles.

Cholesterol Assay Buffer – Allow buffer to come to room temperature before use.

Cholesterol Probe – Warm to room temperature to thaw the solution prior to use. Store protected from light and moisture at –20 °C. Upon thawing, the Cholesterol Probe is ready-to-use in the colorimetric assay.

For the fluorescence assay, dilute an aliquot of the colorimetric Cholesterol Probe Solution 5 to 10-fold with Cholesterol Assay Buffer, just prior to use. This will reduce the background of the fluorescence assay.

Cholesterol Esterase and Enzyme Mix – Reconstitute each in 220 µL of Cholesterol Assay Buffer. Mix well by pipetting, then aliquot and store at –20 °C. Keep cold while in use and protect from light. Use within two months of reconstitution.

**Storage/Stability**

The kit is shipped on wet ice. Storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protected from light, is recommended.

**Procedure**

All samples and standards should be run in duplicate.

Cholesterol Standards for Colorimetric Detection

Dilute 20  $\mu\text{L}$  of the 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Cholesterol Standard Solution with 140  $\mu\text{L}$  of the Cholesterol Assay Buffer to prepare a 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  standard solution. Add 0, 4, 8, 12, 16, and 20  $\mu\text{L}$  of the 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Cholesterol Standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 1, 2, 3, 4, and 5  $\mu\text{g}/\text{well}$  standards. Add Cholesterol Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

Cholesterol Standards for Fluorometric Detection

Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Cholesterol Standard Solution with 790  $\mu\text{L}$  of the Cholesterol Assay Buffer to prepare a 25  $\text{ng}/\mu\text{L}$  standard solution. Add 0, 4, 8, 12, 16, and 20  $\mu\text{L}$  of the 25  $\text{ng}/\mu\text{L}$  Cholesterol Standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5  $\text{ng}/\text{well}$  standards. Add Cholesterol Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

Sample Preparation

Both the colorimetric and fluorometric assays require 50  $\mu\text{L}$  of sample for each reaction (well).

Separation of HDL and LDL/VLDL: Mix 100  $\mu\text{L}$  of the 2 $\times$  Precipitation Buffer with 100  $\mu\text{L}$  of the serum sample in a microcentrifuge tube. Incubate for 10 minutes at room temperature and then centrifuge the samples at  $2,000 \times g$  for 10 minutes. Transfer the supernatant fraction (HDL) to a new tube. The precipitant contains the LDL/VLDL fraction. To measure LDL/VLDL, centrifuge the samples again at  $2,000 \times g$  for 10 minutes and remove any remaining trace HDL supernatant. Resuspend the precipitate in 200  $\mu\text{L}$  of PBS.

**Note:** If the supernatant is cloudy, the sample should be recentrifuged. If the sample remains cloudy, dilute the sample 1:1 with PBS and repeat the separation procedure.

For unknown samples, it is suggested to test several sample dilutions to ensure the readings are within the linear range of the standard curve.

Bring samples to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Cholesterol Assay Buffer.

Assay Reaction

1. Set up the Reaction Mixes according to the scheme in Table 1. 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix is required for each reaction (well).

**Table 1.**  
Reaction Mixes

Reagent	Total Cholesterol and Standards	Free Cholesterol
Cholesterol Assay Buffer	44 $\mu\text{L}$	46 $\mu\text{L}$
Cholesterol Probe	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Cholesterol Enzyme Mix	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Cholesterol Esterase	2 $\mu\text{L}$	–

**Note:** Cholesterol Esterase hydrolyzes cholesteryl esters to cholesterol. In the presence of Cholesterol Esterase, the assay detects total cholesterol, both free cholesterol and cholesteryl esters. To detect free cholesterol only, omit the Cholesterol Esterase from the reaction and add 46  $\mu\text{L}$  of the Cholesterol Assay Buffer to the Reaction Mix. To determine cholesteryl esters, subtract the free cholesterol value from the total cholesterol value.

The cholesterol standard contains a mixture of free cholesterol and cholesteryl esters. The Reaction Mix containing Cholesterol Esterase must be used in the reactions for the Cholesterol Standards to convert all of each standard to cholesterol.

2. Add 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix to each of the wells. Mix well using a horizontal shaker or by pipetting, and incubate the reaction for 60 minutes at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Protect the plate from light during the incubation.
3. For colorimetric assays, measure the absorbance at 570 nm ( $A_{570}$ ). For fluorometric assays, measure fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ).



## Results

### Calculations

The background for either assay is the value obtained for the 0 (blank) cholesterol standard. Correct for the background by subtracting the blank value from all readings. Background values can be significant and must be subtracted from all readings. Use the values obtained from the appropriate cholesterol standards to plot a standard curve. The amount of cholesterol present in the samples may be determined from the standard curve.

Note: A new standard curve must be set up each time the assay is run.

### Concentration of Cholesterol

$$(S_a/S_v) \times Df^* = C$$

$S_a$  = Amount of cholesterol in unknown sample ( $\mu\text{g}$ )  
from standard curve

$S_v$  = Sample volume ( $\mu\text{L}$ ) added into the wells

$C$  = Concentration of cholesterol in sample

$Df$  = The dilution factor will be 2 due to the 1:1 dilution with the 2 $\times$  Precipitation buffer. If the sample requires further dilution with PBS, the factor will need to be adjusted accordingly.

Cholesterol molecular weight: 386.65 g/mole.

### Sample Calculation

Amount of Cholesterol ( $S_a$ ) = 5.84  $\mu\text{g}$

Sample volume ( $S_v$ ) = 50  $\mu\text{L}$

$Df$  = 2

Concentration of cholesterol in sample

$$(5.84 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}) \times 2 = 0.2336 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

**Troubleshooting Guide**

<b>Problem</b>	<b>Possible Cause</b>	<b>Suggested Solution</b>
Assay not working	Cold assay buffer	Assay Buffer must be at room temperature
	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For fluorescence assays, use black plates with clear bottoms. For colorimetric assays, use clear plates
Samples with erratic readings	Samples prepared in different buffer	Use the Assay Buffer provided or refer to Technical Bulletin for instructions
	Cell/Tissue culture samples were incompletely homogenized	Repeat the sample homogenization, increasing the length and extent of homogenization step.
	Samples used after multiple freeze-thaw cycles	Aliquot and freeze samples if samples will be used multiple times
	Presence of interfering substance in the sample	If possible, dilute sample further
	Use of old or inappropriately stored samples	Use fresh samples and store correctly until use
Lower/higher readings in samples and standards	Improperly thawed components	Thaw all components completely and mix gently before use
	Use of expired kit or improperly stored reagents	Check the expiration date and store the components appropriately
	Allowing the reagents to sit for extended times on ice	Prepare fresh reaction mix before use
	Incorrect incubation times or temperatures	Refer to Technical Bulletin and verify correct incubation times and temperatures
	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
Non-linear standard curve	Use of partially thawed components	Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix
	Pipetting errors in preparation of standards	Avoid pipetting small volumes
	Pipetting errors in the Reaction Mix	Prepare a master Reaction Mix whenever possible
	Air bubbles formed in well	Pipette gently against the wall of the plate well
	Standard stock is at incorrect concentration	Refer to the standard dilution instructions in the Technical Bulletin
	Calculation errors	Recheck calculations after referring to Technical Bulletin
	Substituting reagents from older kits/lots	Use fresh components from the same kit
Unanticipated results	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings
	Samples contain interfering substances	If possible, dilute sample further
	Sample readings above/below the linear range	Concentrate or dilute samples so readings are in the linear range

LS,MAM 06/12-1

## **ANEXO M**

Tradução – Kit de quantificação de HDL e LDL/VLDL



## Informação do produto

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel.: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

### Kit de quantificação de HDL e LDL/VLDL

Número de catálogo **MAK045**

Temperatura de armazenamento -20 °C

## FICHA TÉCNICA

### Descrição do produto

As lipoproteínas transportam grande parte dos lípidos do plasma, incluindo o colesterol e os triglicerídeos. As lipoproteínas de alta densidade (HDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) são responsáveis pelo transporte da grande maioria de colesterol no sangue. Os altos níveis de LDL e os baixos níveis de HDL estão fortemente associados ao aumento de risco de acontecimentos adversos cardiovasculares.

Neste kit, no soro, HDL e LDL/VLDL são separados em primeiro e depois a concentração de colesterol de cada um é determinada através de um ensaio enzimático combinado, o qual resulta num produto colorimétrico (570 nm)/fluorimétrico ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm), proporcional ao colesterol presente na amostra. Este kit também pode ser usado para a determinação da concentração de colesterol livre e de éster de colesterol presente numa amostra. É adequado para usar com plasmas e amostras de soro.

### Componentes

O kit permite 100 ensaios em placas de 96 poços.

Solução de ensaio colesterol Número de catálogo MAK045A	25 mL
2x LDL/VLDL Tampão de precipitação Número de catálogo MAK045B	10 mL
Sonda de colesterol, em DMSO Número de catálogo MAK045C	0,2 mL
Mistura de enzima Número de catálogo MAK045D	1 vL
Colesterol esterase Número de catálogo MAK045E	1 vL
Solução padrão de colesterol, 2 µg/µL Número de catálogo MAK045F	0,1 mL

### Reagentes e equipamento necessários mas não fornecidos.

- Placa de 96 poços com fundo plano - recomenda-se o uso de placas pretas de fundo claro para ensaios por fluorescência e placas claras para ensaios colorimétricos.
- Leitor de fluorescência em placas multiusos ou espectrofotômetro
- Tampão fosfato salino (Número de catálogo P5368 ou equivalente)

### Avisos e precauções

Este produto destina-se apenas para o uso exclusivo em I&D. Não deve ser usado como medicamento, em usos domésticos ou para outros fins. Por favor, consulte a ficha de dados de segurança de material (MSDS) para informação relativamente às práticas de segurança e riscos de manuseamento dos materiais.

### Instruções de preparação

Centrifugue os frascos de vidro brevemente antes de abrir. Para manter a integridade dos reagentes, evite ciclos repetidos de congelação/descongelação.

Solução de ensaio colesterol - Antes de usar, aguarde que o reagente atinja temperatura ambiente.

Sonda de colesterol – Antes de usar, aqueça até atingir a temperatura ambiente para descongelar a solução. Armazenar ao abrigo da luz e da humidade a -20 °C. Após a descongelação, a sonda de colesterol está pronta para ser usada no ensaio colorimétrico.

Para o ensaio de fluorescência, dilua uma alíquota de solução sonda de colesterol colorimétrica entre 5 a 10 vezes, com solução de ensaio de colesterol, imediatamente antes de usar. Desta forma, irá reduzir o sinal base do ensaio de fluorescência.

Mistura de enzima e Colesterol esterase – Dissolva cada uma em 220 µL de solução de ensaio colesterol. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene a -20 °C. Manter frio e ao abrigo da luz durante a sua utilização. Utilize no espaço de dois meses após a solubilização.

### Armazenamento/Estabilidade

O kit é enviado em gelo normal. Recomenda-se o seu armazenamento a -20 °C, ao abrigo da luz.

### Procedimento

Devem ser efetuados duplicados de todas as amostras e padrões.

#### Padrões colesterol para deteção colorimétrica

Para preparar uma solução padrão 0,25 µg/µL, adicione 20 µL da solução padrão de colesterol 2 µg/µL a 140 µL de solução de ensaio colesterol. Adicione 0, 4, 8, 12, 16 e 20 µL de solução padrão de colesterol 0,25 µg/µL numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 1, 2, 3, 4 e 5 µg/poço. Adicione solução de ensaio colesterol a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

#### Padrões colesterol para deteção fluorimétrica

Para preparar uma solução padrão 25 µg/µL, adicione 10 µL da solução padrão colesterol 2 µg/µL a 790 µL de solução de ensaio colesterol. Adicione 0, 4, 8, 12, 16 e 20 µL de solução padrão colesterol 25 µg/µL numa placa de 96 poços, criando os padrões 0 (branco), 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 µg/poço. Adicione a solução de ensaio colesterol a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

#### Preparação das amostras

Quer o ensaio colorimétrico quer o fluorimétrico requerem 50 µL de amostra para cada reação (poço).

**Separação de HDL e LDL/VLDL:** Misture 100 µL de 2x tampão de precipitação com 100 µL de amostra de soro num tubo de microcentrífuga. Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente, e depois centrifugue as amostras a 2.000 x g durante 10 minutos. Transfira a fração de sobrenadante (HDL) para um novo tubo. O precipitante contém a fração de LDL/VLDL. Para medir o LDL/VLDL, centrifugue as amostras novamente, a 2.000 x g, durante 10 minutos e remova qualquer indício restante de HDL sobrenadante. Volte a suspender o precipitado em 200 µL de PBS.

**Nota:** Se o sobrenadante estiver turvo, a amostra deve ser centrifugada novamente. Se a amostra permanecer turva, dilua a amostra em 1:1 com PBS e repita o procedimento de separação.

Para amostras desconhecidas, sugere-se testar vários volumes de amostra para verificar se as leituras se encontram na gama de curva padrão.

Perfazer para um volume final de 50 µL, com solução de ensaio colesterol.

### Reação de ensaio

1. Prepare as misturas de reação de acordo com o esquema da Tabela 1. São necessários 50 µL da mistura de reação adequada para cada reação (poço).

**Tabela 1.**

Misturas de reação

Reagente	Colesterol total e padrões	Colesterol livre
Solução de ensaio de colesterol	44 µL	46 µL
Sonda de colesterol	2 µL	2 µL
Mistura de enzima colesterol	2 µL	2 µL
Colesterol esterase	2 µL	–

**Nota:** A Colesterol esterase hidrolisa o éster de colesteril a colesterol. Na presença de Colesterol esterase, o ensaio deteta o colesterol total, o colesterol livre e a éster de colesteril. Para detetar apenas colesterol livre, omite a colesterol esterase da reação e adicione 46 µL da solução de ensaio de colesterol à mistura de reação. Para determinar o éster de colesteril, subtraia o valor do colesterol livre ao valor total de colesterol.

O padrão colesterol contém uma mistura de colesterol livre e éster de colesteril. A mistura de reação que contém a colesterol esterase deve ser usada nas reações do padrão colesterol para converter todos os padrões em colesterol.

2. Adicione 50 µL de mistura de reação adequada a cada um dos poços. Misture bem com um agitador horizontal ou com a ajuda de uma pipeta, e incube a reação, durante 60 minutos, a 37 °C. Proteja a placa da luz durante a incubação.
3. Para ensaios colorimétricos, meça a absorvância a 570 nm (A<sub>570</sub>). Para ensaios fluorimétricos, meça a intensidade de fluorescência ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm).

## Resultados

### Cálculos

A linha de base para cada ensaio é o valor obtido para o padrão colesterol 0 (branco). Corrija o sinal base subtraindo o valor do branco em todas as leituras. Os valores do sinal base podem ser significativos e devem ser subtraídos a todas as leituras. Utilize os valores obtidos dos padrões de colesterol adequados para traçar uma curva padrão. A quantidade de colesterol presente na amostra é determinada através da curva padrão.

Nota: Sempre que analise novas amostras, deverá traçar uma nova curva padrão.

### Concentração de colesterol

$$(S_a/S_v) \times Df^* = C$$

$S_a$  = Quantidade de colesterol na amostra desconhecida ( $\mu\text{g}$ ) determinada a partir da curva padrão

$S_v$  = Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ ) adicionada aos poços

$C$  = Concentração de colesterol na amostra

$Df$  = O fator de diluição será 2 devido à diluição de 1:1 com o 2x tampão de precipitação. Se a amostra exigir uma diluição posterior com PBS, precisa de ajustar o fator de forma adequada.

Peso molecular do colesterol: 386,65 g/mol.

### Cálculo da amostra

Quantidade de colesterol ( $S_a$ ) = 5,84  $\mu\text{g}$

Volume de amostra ( $S_v$ ) = 50  $\mu\text{L}$

$Df = 2$

Concentração de colesterol na amostra

$$(5,84 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}) \times 2 = 0,2336 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

## Guia para resolução de problemas

Problema	Causa provável	Solução sugerida
O ensaio não funciona	Solução do ensaio a temperatura baixa	A solução de ensaio deve estar à temperatura ambiente
	Omissão de um dos passos no procedimento	Consulte e siga exatamente a ficha técnica
	Leitor de placas a um comprimento de onda incorreto	Verifique as definições dos filtros dos instrumentos
	Tipo de placa de 96 poços utilizado	Para ensaios por fluorescência, utilize placas pretas de fundo claro
Amostras com leituras erráticas	Amostras preparadas em soluções diferentes	Utilize a solução de ensaio fornecida ou consulte as instruções na ficha técnica
	As amostras não foram desproteinizadas	Utilize a precipitação com ácido perclórico para desproteinar as amostras
	As amostras de cultura de células ou tecidos não foram completamente homogeneizadas	Repita a homogeneização da amostra, aumentando a duração e a extensão do passo de homogeneização
	Amostras usadas após múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento	Faça alíquotas e congele as amostras, se estas tiverem de ser usadas várias vezes
	Presença de substâncias interferentes na amostra	Se possível, faça uma diluição adicional das amostras
	Uso de amostras velhas ou incorretamente armazenadas inapropriadamente	Utilize amostras recentes e armazene-as de forma adequada
Intensidades mais baixas/mais elevadas em amostras e padrões	Componentes descongelados incorretamente	Descongele completamente todos os componentes completamente e misture-os ligeiramente antes de usar
	Uso de kit fora de prazo de validade ou de reagentes armazenados incorretamente	Verifique a data de validade e armazene os componentes de forma adequada
	Reagentes deixados em gelo durante largos períodos de tempo	Prepare uma nova mistura de reação antes de cada utilização
	Tempos de incubação ou temperaturas incorretas	Consulte a ficha técnica e verifique os tempos de incubação e as temperaturas corretas
	Utilização de volumes incorretos	Utilize pipetas calibradas e prepare as alíquotas corretamente
Curva padrão fora da gama pretendida	Utilização de componentes parcialmente congelados	Descongele e volte a suspender todos os componentes antes de preparar a mistura de reação
	Erros de pipetagem durante a preparação de padrões	Evite pipetar volumes muito pequenos
	Erros de pipetagem na mistura de reação	Prepare uma mistura de reação sempre que possível.
	Bolhas de ar formadas no poço	Pipetar os poços da placa ligeiramente
	O padrão stock tem uma concentração incorreta	Consulte na ficha técnica as instruções de diluição de padrões
	Erros nos cálculos	Refaça os cálculos após consulta da ficha técnica
	Reagentes substituídos de lotes/kits antigos	Utilize componentes novos do mesmo kit
Resultados não esperados	Medição da fluorescência das amostras a comprimento de onda incorretos	Verifique as definições do equipamento e do filtro
	As amostras contêm substâncias interferentes	Se possível, faça mais uma diluição
	Valores das leituras da amostra acima/abaixo da gama linear da curva de calibração	Concentre ou dilua as amostras para que as leituras se encontrem no intervalo linear da reta de calibração

LS, MF, MAM 03/12-1



## **ANEXO N**

Texto 4 – L-Carnitine Assay Kit



## Product Information

### L-Carnitine Assay Kit

Catalog Number **MAK063**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

Carnitine is a metabolite synthesized from lysine and methionine. Carnitine is essential for fatty acid  $\beta$ -oxidation due to its role in fatty acid transport into the mitochondrial matrix via the carnitine/acylcarnitine shuttle. Carnitine exists in two stereoisomers but only the L-carnitine isomer is biologically active. Tissue levels of L-carnitine decrease with aging and decreased L-carnitine may contribute to age-related mitochondrial decline.

The L-Carnitine Assay Kit is a simple convenient means of measuring free L-Carnitine in biological samples such as serum. L-carnitine concentration is determined by a coupled enzyme assay, which results in a colorimetric (570 nm)/fluorometric ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ) product, proportional to the L-carnitine present. Typical detection range for this kit is 2–10 nmoles (colorimetric) and 0.2–1 nmoles (fluorometric).

### Components

The kit is sufficient for 100 assays in 96 well plates.

Carnitine Assay Buffer Catalog Number MAK063A	25 mL
Carnitine Probe, in DMSO Catalog Number MAK063B	0.2 mL
Carnitine Converting Enzyme Catalog Number MAK063C	1 vL
Carnitine Substrate Mix, in DMSO Catalog Number MAK063D	0.4 mL
Carnitine Development Mix Catalog Number MAK063E	1 vL
Carnitine Standard, 10 $\mu\text{mole}$ Catalog Number MAK063F	1 vL

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

- 96 well flat-bottom plate – It is recommended to use black plates with clear bottoms for fluorescence assays and clear plates for colorimetric assays.
- Fluorescence or spectrophotometric multiwell plate reader.
- 10 kDa Molecular Weight Cut-Off (MWCO) Spin Filter (optional for serum samples)

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Preparation Instructions

Briefly centrifuge vials before opening. Use ultrapure water for the preparation of reagents. To maintain reagent integrity, avoid repeated freeze/thaw cycles.

Carnitine Assay Buffer – Allow buffer to come to room temperature before use.

Carnitine Probe – Warm probe to room temperature to melt DMSO prior to use. Mix well by pipetting, then aliquot and store, protected from light and moisture, at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

For the fluorescence assay, dilute an aliquot of the Carnitine Probe Solution 5 to 10-fold with Carnitine Assay Buffer, just prior to use. This will reduce the background of the fluorescence assay.

Carnitine Converting Enzyme Mix and Carnitine Development Mix – Reconstitute in 220  $\mu\text{L}$  of Assay Buffer. Mix well by pipetting, then aliquot and store, protected from light and moisture, at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Use within 2 months of reconstitution.

Carnitine Substrate Mix – Ready to use as supplied.

Warm to room temperature to melt DMSO prior to use. Will show cloudiness, which does not interfere with assay.

Carnitine Standard - Reconstitute in 100  $\mu\text{L}$  of water to generate a 100 mM (100 nmole/ $\mu\text{L}$ ) solution. Mix well by pipetting, then aliquot and store, protected from light and moisture, at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Keep on ice while in use. Use within 2 months of reconstitution.

### Storage/Stability

The kit is shipped on wet ice and storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protected from light, is recommended.

### Procedure

#### Carnitine Standards for Colorimetric Detection

Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 100 mM carnitine standard with 990  $\mu\text{L}$  of water to prepare a 1 mM carnitine standard solution. Add 0, 2, 4, 6, 8, and 10  $\mu\text{L}$  of the 1 mM carnitine standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 2, 4, 6, 8, and 10 nmole/well standards. Add Carnitine Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

#### Carnitine Standards for Fluorometric Detection

Prepare a 1 mM standard solution as for the colorimetric assay. Dilute 10  $\mu\text{L}$  of the 1 mM standard solution with 90  $\mu\text{L}$  of the Carnitine Assay Buffer to make a 0.1 mM standard solution. Add 0, 2, 4, 6, 8, and 10  $\mu\text{L}$  of the 0.1 mM standard solution into a 96 well plate, generating 0 (blank), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 nmole/well standards. Add Carnitine Assay Buffer to each well to bring the volume to 50  $\mu\text{L}$ .

#### Sample Preparation

Both the colorimetric and fluorometric assays require 50  $\mu\text{L}$  of sample for each reaction (well).

Tissue or cells ( $1 \times 10^6$ ) can be homogenized in 100  $\mu\text{L}$  of the Carnitine Assay Buffer. Centrifuge the samples at  $13,000 \times g$  for 10 minutes to remove insoluble material. If enzymes present in the sample interfere with the assay, samples can be deproteinized with a 10 kDa MWCO spin filter.

The normal range for serum L-Carnitine is between 10–70  $\mu\text{M}$ . Serum samples should be deproteinized before with a 10 kDa MWCO spin filter.

Bring samples to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  with Carnitine Assay Buffer. For unknown samples, it is suggested to test several sample volumes to make sure the readings are within the standard curve range.

### Assay Reaction

1. Set up the Reaction Mixes according to the scheme in Table 1. 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix is required for each reaction (well).

Note: Acyl-CoA or free Coenzyme A in samples can generate background readings. To remove the Acyl-CoA or free Coenzyme A background, include a blank sample for each sample by omitting the Carnitine Converting Enzyme Mix. The blank control readings can then be subtracted from the sample readings.

**Table 1.**  
Reaction Mixes

Reagent	Samples and Standards	Blank Sample
Carnitine Assay Buffer	40 $\mu\text{L}$	42 $\mu\text{L}$
Carnitine Converting Enzyme	2 $\mu\text{L}$	–
Carnitine Development Mix	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
Carnitine Substrate Mix	4 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
Carnitine Probe (colorimetric or fluorescence)	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

2. Add 50  $\mu\text{L}$  of the appropriate Reaction Mix to each of the wells. Mix well using a horizontal shaker or by pipetting, and incubate the reaction for 30 minutes at room temperature. Protect the plate from light during the incubation.
3. For colorimetric assays, measure the absorbance at 570 nm ( $A_{570}$ ). For fluorometric assays, measure fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}} = 535/\lambda_{\text{em}} = 587\text{ nm}$ ).

## Results

### Calculations

The background for either assay is the value obtained for the 0 (blank) Carnitine standard. Correct for the background by subtracting the blank value from all readings. Background values can be significant and must be subtracted from all readings.

Use the values obtained from the appropriate Carnitine standards to plot a standard curve. The amount of carnitine present in the samples may be determined from the standard curve.

Note: A new standard curve must be set up each time the assay is run.

### Concentration of L-Carnitine

$$S_a/S_v = C$$

$S_a$  = Amount of carnitine in unknown sample (nmole) from standard curve

$S_v$  = Sample volume ( $\mu\text{L}$ ) added into the wells.

$C$  = Concentration of carnitine in sample

L-Carnitine molecular weight: 161.2 g/mole

### Sample Calculation

Amount of Carnitine ( $S_a$ ) = 5.84 nmole

Sample volume ( $S_v$ ) = 50  $\mu\text{L}$

Concentration of Carnitine in sample

$$5.84 \text{ nmole}/50 \mu\text{L} = 0.1168 \text{ nmole}/\mu\text{L}$$

$$0.1168 \text{ nmole}/\mu\text{L} \times 161.2 \text{ ng/nmole} = 18.83 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

**Troubleshooting Guide**

<b>Problem</b>	<b>Possible Cause</b>	<b>Suggested Solution</b>
Assay not working	Cold assay buffer	Assay Buffer must be at room temperature
	Omission of step in procedure	Refer and follow Technical Bulletin precisely
	Plate reader at incorrect wavelength	Check filter settings of instrument
	Type of 96 well plate used	For fluorescence assays, use black plates with clear bottoms. For colorimetric assays, use clear plates
Samples with erratic readings	Samples prepared in different buffer	Use the Assay Buffer provided or refer to Technical Bulletin for instructions
	Samples were not deproteinized	Use a 10 kDa MWCO spin filter to deproteinize samples
	Cell/Tissue culture samples were incompletely homogenized	Repeat the sample homogenization, increasing the length and extent of homogenization step.
	Samples used after multiple freeze-thaw cycles	Aliquot and freeze samples if samples will be used multiple times
	Presence of interfering substance in the sample	If possible, dilute sample further
	Use of old or inappropriately stored samples	Use fresh samples and store correctly until use
Lower/higher readings in samples and standards	Improperly thawed components	Thaw all components completely and mix gently before use
	Use of expired kit or improperly stored reagents	Check the expiration date and store the components appropriately
	Allowing the reagents to sit for extended times on ice	Prepare fresh Reaction Mix before each use
	Incorrect incubation times or temperatures	Refer to Technical Bulletin and verify correct incubation times and temperatures
	Incorrect volumes used	Use calibrated pipettes and aliquot correctly
Non-linear standard curve	Use of partially thawed components	Thaw and resuspend all components before preparing the reaction mix
	Pipetting errors in preparation of standards	Avoid pipetting small volumes
	Pipetting errors in the Reaction Mix	Prepare a Reaction Mix whenever possible
	Air bubbles formed in well	Pipette gently against the wall of the plate well
	Standard stock is at incorrect concentration	Refer to the standard dilution instructions in the Technical Bulletin
	Calculation errors	Recheck calculations after referring to Technical Bulletin
	Substituting reagents from older kits/lots	Use fresh components from the same kit
Unanticipated results	Samples measured at incorrect wavelength	Check the equipment and filter settings
	Samples contain interfering substances	If possible, dilute sample further
	Sample readings above/below the linear range	Concentrate or dilute samples so readings are in the linear range

LS,MAM 03/12-1

## **ANEXO O**

Tradução – Kit enzimático para determinação da L-Carnitina





## Informação do produto

### Kit enzimático para determinação da L-Carnitina

Número de catálogo **MAK063**

Temperatura de armazenamento -20 °C

## FICHA TÉCNICA

### Descrição do produto

A carnitina é um metabolito sintetizado a partir da lisina e da metionina. A carnitina é essencial para a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, devido ao seu papel no transporte de ácidos gordos para a matriz mitocondrial, através da ligação carnitina/acil-carnitina. A carnitina existe em dois estereoisómeros, mas apenas o isómero L-carnitina é biologicamente ativo. Os níveis de L-carnitina existentes no tecido celular diminuem com o envelhecimento e a consequente diminuição de L-carnitina contribui para o declínio mitocondrial que está relacionado com a idade.

O kit enzimático para determinação da L-carnitina é um método adequado e simples para medir a L-carnitina livre numa amostra biológica como por exemplo o soro. A concentração de L-carnitina é determinada por um ensaio conjugado de enzimas, o qual resulta num produto colorimétrico (570 nm)/fluorimétrico ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm), proporcional à quantidade de L-carnitina presente na amostra. A gama de deteção característica para este kit é 2 – 10 nmol (colorimétrico) e 0,2 – 1 nmol (fluorimétrico).

### Componentes

O kit permite 100 ensaios em placas de 96 poços.

Solução de ensaio carnitina Número de catálogo MAK063A	25 mL
Sonda carnitina, em DMSO Número de catálogo MAK063B	0,2 mL
Enzima de conversão carnitina Número de catálogo MAK063C	1 $\mu$ l
Mistura substrato de carnitina, em DMSO Número de catálogo MAK063D	0,4 mL
Mistura de desenvolvimento carnitina Número de catálogo MAK063E	1 $\mu$ l
Padrão carnitina, 10 $\mu$ mol Número de catálogo MAK063F	1 $\mu$ l

### Reagentes e equipamento necessários mas não fornecidos.

- Placa de 96 poços com fundo plano - recomenda-se o uso de placas pretas de fundo claro para ensaios por fluorescência e placas claras para ensaios colorimétricos.
- Leitor de fluorescência em placas multiusos ou espectrofotómetro
- Filtro spin de interrupção do peso molecular (MWCO) de 10 kDa (opcional para amostras de soro)

### Avisos e precauções

Este produto destina-se apenas para o uso exclusivo em I&D. Não deve ser usado como medicamento, em usos domésticos ou para outros fins. Por favor, consulte a ficha de dados de segurança de material (MSDS) para informação relativamente às práticas de segurança e riscos de manuseamento dos materiais.

### Instruções de preparação

Centrifugue os frascos de vidro brevemente antes de abrir. Utilize água ultrapura para a preparação dos reagentes. Para manter a integridade dos reagentes, evite ciclos repetidos de congelação/descongelação.

Solução de ensaio carnitina - Antes de usar, aguarde que o reagente atinja a temperatura ambiente.

Sonda carnitina - Antes de usar, aqueça até atingir a temperatura ambiente para fundir o DMSO. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene, ao abrigo da luz e da humidade, a -20 °C.

Para a análise de fluorescência, dilua uma alíquota de solução sonda carnitina entre 5 a 10 vezes com solução de ensaio carnitina, precisamente antes de usar. Desta forma, irá reduzir o sinal base do ensaio de fluorescência.

Mistura enzima de conversão carnitina e mistura de desenvolvimento carnitina – Dissolva em 220  $\mu$ L de solução de ensaio. Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene, ao abrigo da luz e da humidade, a -20 °C. Utilize no espaço de dois meses após a solubilização.

Mistura substrato de carnitina – Fornecido pronto a ser usado. Antes de usar, aqueça até atingir a temperatura ambiente para fundir o DMSO. Irá ficar com um aspeto turvo, que não interfere com o ensaio.

Padrão carnitina - Dissolva em 100 µL de água para produzir 100 mM de solução (100 nmol/µL). Misture bem com a ajuda de uma pipeta. De seguida, divida em alíquotas e armazene, ao abrigo da luz e da humidade, a -20 °C. Mantenha as soluções em gelo durante a utilização. Utilize no espaço de 2 meses após a solubilização.

#### Armazenamento/Estabilidade

O kit é enviado em gelo normal. Recomenda-se o seu armazenamento a -20 °C, ao abrigo da luz.

#### Procedimento

##### Padrões carnitina para deteção colorimétrica

Para preparar uma solução padrão carnitina 1 mM, adicione 10 µL do padrão carnitina 100 mM a 990 µL de água.

Adicione 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL da solução padrão carnitina 1 mM numa placa de 96 poços, criando padrões 0 (branco), 2, 4, 6, 8 e 10 nmol/poço. Adicione a solução de ensaio carnitina a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

##### Padrões carnitina para deteção fluorimétrica

Prepare uma solução padrão 1 mM da mesma forma que se prepara para o ensaio colorimétrico. Para fazer uma solução padrão 0,1 mM, adicione 10 µL da solução padrão 1 mM a 90 µL de solução de ensaio carnitina. Adicione 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µL da solução padrão 0,1 mM numa placa de 96 poços, criando padrões 0 (branco), 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 nmol/poço. Adicione a solução de ensaio carnitina a cada poço até perfazer volumes de 50 µL.

##### Preparação da amostra

Quer o ensaio colorimétrico quer o fluorimétrico requerem 50 µL de amostra para cada reação (poço).

Os tecidos e as células ( $1 \times 10^6$ ) podem ser homogeneizados em 100 µL de solução de ensaio carnitina. Centrifugue as amostras a 13.000 x g durante 10 minutos para remover material insolúvel. Se as enzimas presentes na amostra interferem com o ensaio, as amostras podem ser desproteinizadas com filtro spin de 10 kDa MWCO.

A gama normal para o soro L-Carnitina é entre 10 e 70 µM. As amostras do soro devem ser desproteinizadas antes com filtro spin de 10 kDa MWCO.

Perfazer para um volume de 50 µL com solução de ensaio carnitina. Para amostras desconhecidas, sugere-se testar vários volumes de amostra para verificar se as leituras se encontram na gama da curva padrão.

#### Reação de ensaio

1. Prepare as misturas de reação de acordo com o esquema da Tabela 1. São necessários 50 µL de mistura de reação para cada reação (poço).  
Nota: Acil-CoA ou Coenzima A livre presentes nas amostras podem gerar leituras com sinal base. Para corrigir a linha de base criada pela Acil-CoA ou pela Coenzima A livre, inclua um branco para cada uma das amostras, omitindo a enzima de conversão carnitina na mistura em reação. As leituras de controlo do branco podem ser subtraídas às leituras da amostra.

#### Tabela 1.

Misturas de reação

Reagente	Amostras e padrões	Branco
Solução de ensaio carnitina	40 µL	42 µL
Enzima de conversão carnitina	2 µL	-
Mistura de desenvolvimento carnitina	2 µL	2 µL
Mistura substrato de carnitina	4 µL	4 µL
Sonda carnitina (colorimétrica ou fluorescência)	2 µL	2 µL

2. Adicione 50 µL de mistura de reação adequada a cada um dos poços. Misture bem com um agitador horizontal ou com a ajuda de uma pipeta, e incube, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Proteja a placa da luz durante a incubação.
3. Para ensaios colorimétricos, meça a absorvância a 570 nm (A570). Para ensaios fluorimétricos, meça a intensidade de fluorescência ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$  nm).

## Resultados

### Cálculos

A linha de base para cada ensaio é o valor obtido para o padrão carnitina 0 (branco). Corrija o sinal base subtraindo o valor do branco em todas as leituras. Os valores de sinal base podem ser significativos e devem ser subtraídos a todas as leituras. Utilize os valores obtidos com os padrões de carnitina adequados para traçar a curva padrão. A quantidade de carnitina presente na amostra é determinada através da curva padrão.

Nota: Sempre que analise novas amostras, deverá traçar uma nova curva padrão.

### Concentração de L-carnitina

$$S_a/S_v = C$$

$S_a$  = Quantidade de carnitina na amostra desconhecida (nmol) determinada a partir da curva padrão

$S_v$  = Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ ) adicionada aos poços

C = Concentração da carnitina na amostra

Peso molecular da L-carnitina: 161,2 g/mol

### Cálculo da concentração da L-carnitina na amostra

Quantidade de carnitina ( $S_a$ ) = 5,84 nmol

Volume de amostra ( $S_v$ ) = 50  $\mu\text{L}$

Concentração de carnitina numa amostra

$$5,84 \text{ nmol}/50 \mu\text{L} = 0,1168 \text{ nmol}/\mu\text{L}$$

$$0,1168 \text{ nmol}/\mu\text{L} \times 161,2 \text{ ng/nmol} = 18,83 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

## Guia para resolução de problemas

Problema	Causa provável	Solução sugerida
O ensaio não funciona	Solução do ensaio a temperatura baixa	A solução de ensaio deve estar à temperatura ambiente
	Omissão de um dos passos no procedimento	Consulte e siga exatamente a ficha técnica
	Leitor de placas a um comprimento de onda incorreto	Verifique as definições dos filtros dos instrumentos
	Tipo de placa de 96 poços utilizado	Para ensaios por fluorescência, utilize placas pretas de fundo claro
Amostras com leituras erráticas	Amostras preparadas em soluções diferentes	Utilize a solução de ensaio fornecida ou consulte as instruções na ficha técnica
	As amostras não foram desproteinizadas	Utilize a precipitação com ácido perclórico para desproteinar as amostras
	As amostras de cultura de células ou tecidos não foram completamente homogeneizadas	Repita a homogeneização da amostra, aumentando a duração e a extensão do passo de homogeneização
	Amostras usadas após múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento	Faça alíquotas e congele as amostras, se estas tiverem de ser usadas várias vezes
	Presença de substâncias interferentes na amostra	Se possível, faça uma diluição adicional das amostras
	Uso de amostras velhas ou incorretamente armazenadas inapropriadamente	Utilize amostras recentes e armazene-as de forma adequada
Intensidades mais baixas/mais elevadas em amostras e padrões	Componentes descongelados incorretamente	Descongele completamente todos os componentes completamente e misture-os ligeiramente antes de usar
	Uso de kit fora de prazo de validade ou de reagentes armazenados incorretamente	Verifique a data de validade e armazene os componentes de forma adequada
	Reagentes deixados em gelo durante largos períodos de tempo	Prepare uma nova mistura de reação antes de cada utilização
	Tempos de incubação ou temperaturas incorretas	Consulte a ficha técnica e verifique os tempos de incubação e as temperaturas corretas
	Utilização de volumes incorretos	Utilize pipetas calibradas e prepare as alíquotas corretamente
Curva padrão fora da gama pretendida	Utilização de componentes parcialmente congelados	Descongele e volte a suspender todos os componentes antes de preparar a mistura de reação
	Erros de pipetagem durante a preparação de padrões	Evite pipetar volumes muito pequenos
	Erros de pipetagem na mistura de reação	Prepare uma mistura de reação sempre que possível.
	Bolhas de ar formadas no poço	Pipetar os poços da placa ligeiramente
	O padrão stock tem uma concentração incorreta	Consulte na ficha técnica as instruções de diluição de padrões
	Erros nos cálculos	Refaça os cálculos após consulta da ficha técnica
	Reagentes substituídos de lotes/kits antigos	Utilize componentes novos do mesmo kit
Resultados não esperados	Medição da fluorescência das amostras a comprimento de onda incorretos	Verifique as definições do equipamento e do filtro
	As amostras contêm substâncias interferentes	Se possível, faça mais uma diluição
	Valores das leituras da amostra acima/abaixo da gama linear da curva de calibração	Concentre ou dilua as amostras para que as leituras se encontrem no intervalo linear da reta de calibração

LS, MF, MAM 03/12-1

©2012 Sigma-Aldrich Co. LLC. Todos os direitos reservados. SIGMA-ALDRICH é uma marca da Sigma-Aldrich Co. LLC, registada nos EUA e em outros países. Os produtos da marca Sigma são vendidos através da Sigma-Aldrich, Inc. O cliente deve determinar a adequação do produto (s) para o seu uso particular. Podem ser aplicados termos e condições adicionais. Ver por favor a informação do produto no sítio da Sigma-Aldrich em [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) e/ou no verso da fatura ou na guia de remessa.

## **ANEXO P**

Texto 5 – Experiment no. 2 – Enzymes in Laundry Detergents



# EXPERIMENT NO. 2

## ENZYMES IN LAUNDRY DETERGENTS

*Prepared by*  
**Nam Sun Wang**  
Department of Chemical & Biomolecular Engineering  
University of Maryland  
College Park, MD 20742-2111  
ENCH485

---

### Table of Contents

- [Objectives](#)
  - [Introduction](#)
  - [List of Reagents and Instruments](#)
  - [Procedures](#)
  - [Discussions](#)
  - [Questions](#)
  - [References](#)
  - [Comments](#)
- 

### Objectives

To hydrolyze protein-based stains in fabrics into soluble amino acids.

---

### Introduction

In today's laundry detergents, enzymes such as proteases and amylases are some of the active ingredients. In the U.S., about 50% of liquid detergents, 25% of powder detergents, and almost all powdered bleach additives now contain enzymes to help break down stains that are otherwise hard to remove with conventional surfactants alone. For example, amylase catalyzes the breakdown of starch-based stains to smaller segments that make up the larger starch molecule. Oligosaccharides and dextrans released from the enzyme's hydrolytic action are soluble; thus, the stain is physically cut off from the surface of the fabric piece by piece, with the enzyme acting as scissors. The action of proteases, as implied by the name itself, is similar to that of amylase, except that a large protein molecule is hydrolyzed. During the process of hydrolysis, the peptide bonds that hold various amino acids together to form a protein molecule are broken down, releasing smaller polypeptides and individual amino acid units. Generally, polymers made of less than approximately one hundred amino acid monomer units are called polypeptides and larger ones are called proteins.

In this experiment, the same milk protein casein that we have experienced in the previous experiment on cheese making is bound with a blue dye. A small piece of fabric soiled by the dyed casein will be provided to each student. The purpose of this experiment is to observe the hydrolytic action of bacterial protease in removing protein-based stains. Because detergents, especially bath soaps, are generally formulated to degrade mainly oil and grease, protein-based stains have traditionally been among the hardest to remove. Proteins can act as strong natural bonding agents that make all sorts of dirt adhere stubbornly to textile fibers. Anyone trying to wash away blood stains can testify to this effect. Other proteinaceous dirt includes perspiration, grass, and slime stains. This exercise demonstrates that it takes protein to get out protein, as some television commercials claim.

---

## List of Reagents and Instruments

### A. Equipment

- Flasks, 250 ml
- Graduated cylinder
- Household clothing iron or drying oven
- Spectrophotometer
- Balance

### B. Reagents

- Household detergent, (to be supplied by the student)
  - Bacterial protease
  - Dyed casein cloth
- 

## Procedures

1. Dissolve 1 g of household laundry detergent in 200 ml of hot (60°C) water in a 250 ml flask. Colored detergent obviously interferes with the quantitative determination of the rate of protein degradation by the colorimetric method; thus, it should not be used if quantitative information is desired. Because the commercial detergent is not completely soluble in water, filter the detergent solution before use.
2. Similarly, mix 0.1 g of powder protease in 200 ml of hot water in a second flask. Because certain protease is not water soluble, removal of the insoluble solids by filtration or centrifugation, leaving behind only supernatant, may retain only very little protease activity.
3. Place a small piece of the dyed casein or gelatin cloth into each washing liquid.
4. Seal the top of each flask with paraffin or with a rubber stopper. Swirl both flasks gently to simulate the agitating washing motion. A thermostated flask shaker may be used for this purpose.
5. Periodically take out a small (5-10 ml) portion of the washing liquid and measure the absorbance with a spectrophotometer until the changes in the color



intensity level off. The stain should be removed in approximately 20-30 minutes, but sometimes it takes as long as a few hours for the complete removal of the color. Because of the small particles of protein released during the wash, one may need to filter the sample again with a 25mm syringe filtration unit fitted with a 10 ml plastic syringe. This should be done immediately before measuring the absorbance.

6. After briefly rinsing the cloth under running tap water, dry it with a clothing iron.
7. Compare the effectiveness of the protease with your detergent. Also compare the cloth washed with your detergent with the other students' to see how effective your detergent is in cutting the stain.
8. Simulate a "warm" (40°C) and a "cold" (20°C) wash cycle by repeating the above experiment at appropriate temperatures. (Note that all the temperatures can be run simultaneously.)

---

## Discussions

An enzyme was first used to improve the effectiveness of a laundry detergent in 1913 by a German named Otto RÖohm, the founder of the giant chemical company Rohm and Hass. The proteolytic enzyme he used, derived from milled animal pancreases, was quite crude and contained many impurities which, in turn, sometimes stained the very textile it was supposed to clean. Neither was the process of enzyme extraction economical enough to include it routinely in household detergents. Currently, these enzymes are manufactured commercially in large quantities through fermentation by common soil bacteria *Bacillus subtilis* or *Bacillus licheniformis*. This was made possible in the last two decades by the rapid advances in enzymology and fermentation technology. Although numerous other microorganisms produce proteases and amylases, the types secreted by the above strains have the advantage that they work best at the warm alkaline conditions prevailing in washing liquids. They also must not lose their activity in an environment which contains a multitude of potentially inhibitory chemicals routinely formulated into laundry detergents such as surface active agents, magnesium or calcium ions, builders (sodium tripolyphosphate), perfumes, and other additives.

---

## Questions

1. Plot the color intensity as a function of time for both washing liquids. Which one has stronger cleaning power, your detergent or protease? Explain the temperature effect.
2. From the above curve, comment on the possible rate expression for the enzymatic reaction.
3. How would you determine the amount of protein removed if no dye was used?
4. How does the temperature affect the rate of stain removal?
5. List some of the biological functions of the pancreas. What type of digestive fluid does it secrete? Is it surprising that one may obtain protease from milled dehydrated and defatted animal pancreas?

6. List ways in which enzymes can be utilized to break down toxic wastes, thus controlling pollution. Are there any commercial processes at the present that utilize the unique selective catalytic capability of an enzyme in waste treatment?
  7. There is a great concern over the phosphate content in a detergent because of the problems of eutrophication, the almost complete depletion of dissolved oxygen in a body of water resulting from the explosive growth of marine microorganisms in the presence of excess nutrient. Do you consider the enzymes contained in the laundry liquid as water pollutants? What about the possibility of the denatured protein as a source of scarce amino acids? Justify your answer.
  8. All enzymes are proteins, and protease is no exception. Does protease attack each other cannibalistically? If not, what prevents protease from digesting each other? (Hint: does protease digest all proteins, or can it recognize only some and exerts its action on only specific ones?)
  9. Comment on ways to improve the experiment.
- 

## References

1. Duffy, J.I., *Chemicals by Enzymatic and Microbial Processes*, Noyes Data Corp., New Jersey, 1980, p368-373.
- 

Return to Prof. Nam Sun Wang's [Home Page](#)

Return to [Biochemical Engineering Laboratory \(ENCH485\)](#)

### ***Enzymes in Laundry Detergents***

Forward comments to:

***Nam Sun Wang***

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering*

*University of Maryland*

*College Park, MD 20742-2111*

*301-405-1910 (voice)*

*301-314-9126 (FAX)*

*e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)*

## **ANEXO Q**

Tradução – Protocolo nº 2 – Enzimas em detergentes para a roupa



# PROTOCOLO Nº 2

## ENZIMAS EM DETERGENTES PARA A ROUPA

*Preparado por*

**Nam Sun Wang**

Department of Chemical & Biomolecular Engineering

University of Maryland

College Park, MD 20742-2111

ENCH485

---

### Tabela de conteúdos

- Objetivos
  - Introdução
  - Lista de reagentes e instrumentação
  - Procedimentos
  - Discussão
  - Questões
  - Referências
  - Comentários
- 

### Objetivos

Hidrolisar a aminoácidos solúveis nódoas em tecidos com origem em proteínas.

---

### Introdução

Hoje em dia, alguns dos ingredientes ativos nos detergentes para a roupa são enzimas, como por exemplo protéases e amílases. Nos Estados Unidos, cerca de 50% dos detergentes líquidos, 25% dos detergentes em pó e quase todos os aditivos de branqueamento com lixívia em pó contêm enzimas para ajudar a eliminar nódoas, que de outra forma são difíceis de remover apenas com os tensoativos convencionais. Por exemplo, a amílase catalisa a eliminação de nódoas de amido, quebrando-o nos segmentos mais pequenos, que compõem a molécula de amido. Os oligossacáridos e as dextrinas libertadas pela ação hidrolítica das enzimas são solúveis, portanto, a nódoa é aos poucos fisicamente eliminada, da superfície do tecido, com as enzimas atuando como “tesoura”. A ação das protéases, tal como o próprio nome implica, é similar à ação da amílase, com a exceção de que é hidrolisada uma molécula de proteína maior. Durante o processo de hidrólise, são dissolvidas as ligações peptídicas, que mantêm os vários aminoácidos ligados entre si para formar uma molécula de proteína, libertando polipeptídeos pequenos e moléculas individuais de aminoácidos. Em geral, os polímeros são constituídos por aproximadamente cem unidades de monómeros aminoácidos, chamados polipeptídeos, e com maior número de aminoácidos são proteínas.

Nesta experiência, a mesma proteína do leite, a caseína, que foi utilizada na experiência anterior referente à produção de queijo, liga-se a um corante azul. Será fornecido a cada aluno um pequeno pedaço de tecido manchado por caseína tingida com corante azul. O objetivo desta experiência é observar a ação hidrolítica da protéase bacteriana na remoção de nódos com origem em proteínas. As nódos com base proteica são, tradicionalmente, as mais difíceis de remover, porque os detergentes, especialmente o sabão, são em geral formulados para eliminar nódos de óleos e gorduras. As proteínas podem atuar como agentes fortes naturais de ligação aos tecidos, o que faz com que todo o tipo de sujidade adira obstinadamente às fibras têxteis. Qualquer pessoa que tente remover nódos de sangue pode confirmar este facto. Outras sujidades proteicas incluem nódos de transpiração, de relva e de lama. Este exercício mostra que são necessárias proteínas para remover proteínas, como alguma da publicidade em televisão anuncia.

---

## **Lista de reagentes e instrumentação**

### **A. Equipamento**

- Balões volumétricos de vidro, 250 mL
- Proveta graduada
- Ferro de engomar ou estufa de secagem
- Espectrofotómetro
- Balança

### **B. Reagentes**

- Detergente comercial (fornecido pelo aluno)
  - Protéase bacteriana
  - Tecido tingido com caseína com corante azul
- 

## **Procedimentos**

1. Dissolva 1 g de detergente para a roupa em 200 mL de água aquecida a 60 °C num balão volumétrico de vidro de 250 mL. Os detergentes coloridos interferem com a determinação quantitativa da taxa de degradação da proteína por método colorimétrico, não devendo ser usados caso se pretenda obter dados quantitativos. Filtre a solução de detergente antes de a usar, porque os detergentes comerciais não são totalmente solúveis em água.
2. De maneira semelhante misture 0,1 g de protéase em pó em 200 mL de água quente num segundo balão volumétrico de vidro. Uma vez que certas protéases não são solúveis em água, a remoção dos sólidos insolúveis por filtração ou centrifugação, deixando apenas o sobrenadante, poderá levar a que a protéase fique apenas com uma pequena atividade enzimática.
3. Coloque apenas um pequeno pedaço de tecido tingido com caseína com corante azul, ou gelatina, em cada líquido de lavar.

4. Sele o topo de cada balão volumétrico com parafina ou com uma rolha de borracha. Agite ambos os balões, suavemente, simulando o movimento de agitação da lavagem. Para isso, pode ser usado um agitador de balões termostatizado.
5. Periodicamente, retire pequenas porções (5-10 mL) do líquido de lavar e meça a respectiva absorvância apresentada num espectrofotómetro até não haver alterações na intensidade da cor. A nódoa deverá ser removida em aproximadamente 20-30 minutos, mas por vezes demora algumas horas até a cor ser completamente removida. Pode ser necessário filtrar novamente a amostra, com uma unidade de filtração em seringa, de 25 mm, adaptada a uma seringa de plástico de 10 mL, por causa das pequenas partículas de proteína libertadas durante a lavagem. Isto deve ser feito imediatamente antes de medir a absorvância da amostra.
6. Depois de enxaguar brevemente o tecido em água corrente, da torneira, seque-o com o ferro de engomar.
7. Compare a eficácia da ação da protéase com a do seu detergente. Compare também o tecido lavado com o seu detergente, com o dos outros alunos para ver quão eficiente é o seu detergente a remover a mancha.
8. Simule um ciclo de lavagem a «quente» (40 °C) e outro a «frio» (20 °C), repetindo a experiência acima referida, à temperatura adequada. (Note que as lavagens a todas as temperaturas podem ser efetuadas em simultâneo).

---

## Discussão

Uma enzima para melhorar a eficácia de um detergente da roupa foi utilizada, pela primeira vez, em 1913, por um alemão de nome Otto Röhm, o fundador da empresa química gigante Röhm & Hass. A enzima não tratada proteolítica usada, derivada de pancreases de animal, trituradas, era muito rudimentar e continha muitas impurezas, as quais, por sua vez, manchavam algumas vezes o próprio tecido que era suposto limparem. Nem sequer o processo de extração da enzima era suficientemente económico para a incluir, de forma rotineira, nos detergentes domésticos. Atualmente, estas enzimas são manufacturadas comercialmente em grandes quantidades, por fermentação de bactérias comuns do solo, a *Bacillus subtilis* ou a *Bacillus licheniformis*. Isto tornou-se possível nas duas últimas décadas, graças aos rápidos avanços nas tecnologias enzimológicas e de fermentação. Embora inúmeros outros microrganismos produzam proteases e amilases, os tipos segregados pelas estirpes acima referidas têm a vantagem de atuarem melhor em condições alcalinas a quente, que são predominantes nos líquidos de lavagem. Também não deverão perder a sua atividade em ambientes que contenham uma infinidade de potenciais inibidores químicos, rotineiramente incluídos nas fórmulas dos detergentes para a roupa, tais como agentes ativadores de superfícies, íons de magnésio ou cálcio, elemento reforçador (tripolifosfato de sódio), perfumes e outros aditivos.

---

## Questões

1. Faça um gráfico da intensidade da cor em função do tempo para ambos os líquidos de lavagem. Qual deles tem um maior poder de limpeza, o seu detergente ou a protéase? Explique o efeito da temperatura.

2. A partir da curva efetuada na questão anterior, proponha uma possível expressão da lei de velocidade para esta reação enzimática.
3. Como determinaria a quantidade de proteína removida se não tivesse sido usado nenhum corante?
4. Como é que a temperatura afeta a velocidade de remoção da nódoa?
5. Enumere algumas das funções biológicas do pâncreas. Que tipo de fluido digestivo segrega este órgão? Será surpreendente a possibilidade de obter protéase de pâncreas de animal, desidratado, e desengordurado?
6. Enumere formas de utilização de enzimas para remover desperdícios tóxicos, para controlo de poluição. Existem atualmente processos comerciais que utilizem a capacidade catalítica seletiva de enzima no tratamento de desperdícios?
7. Existe uma grande preocupação acerca do teor de fosfato nos detergentes, por causa dos problemas de eutrofização, ou seja da redução quase por completo do oxigénio dissolvido numa massa de água, como resultado do crescimento explosivo de microrganismos marinhos na presença de excesso de nutrientes. Considera que as enzimas existentes nos detergentes líquidos sejam poluentes da água? Qual a possibilidade da proteína desnaturada ser uma fonte de alguns aminoácidos escassos? Justifique a sua resposta.
8. Todas as enzimas são proteínas e a protéase não é uma exceção. As protéases atacam-se umas às outras de forma canibal? Se não, o que impede as protéases de se “digerirem” umas às outras? (Nota: a protéase digere todas as proteínas sem exceção, ou consegue reconhecer apenas algumas delas e exerce a sua ação apenas em algumas proteínas específicas?)
9. Comente formas de melhorar o protocolo desta experiência.

---

## Referências

1. Duffy, J.I., *Chemicals by Enzymatic and Microbial Processes*, Noyes Data Corp., New Jersey, 1980, p368-373.

---

### *Enzimas em detergentes para a roupa*

Enviar comentários para:

**Nam Sun Wang**

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering*

*University of Maryland*

*College Park, MD 20742-2111*

*301-405-1910 (voice)*

*301-314-9126 (FAX)*



e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)



## **ANEXO R**

Texto 6 – Experiment no. 13 – Continuous immobilized enzymes reactor



# EXPERIMENT NO. 13

## CONTINUOUS IMMOBILIZED ENZYME REACTOR

*Prepared by*  
**Nam Sun Wang**  
Department of Chemical & Biomolecular Engineering  
University of Maryland  
College Park, MD 20742-2111  
ENCH485

---

### Table of Contents

- [Objectives](#)
  - [Introduction](#)
  - [List of Reagents and Instruments](#)
  - [Procedures](#)
  - [Discussions](#)
  - [Questions](#)
  - [Data Forms](#)
  - [Comments](#)
- 

### Objectives

To demonstrate laboratory automation by studying the conversion and kinetics of sucrose hydrolysis in a continuous immobilized enzyme reactor.

---

### Introduction

Invertase from *Saccharomyces cerevisiae* is entrapped in calcium alginate by following the gel immobilization protocol. Other combinations of enzyme and immobilization procedures can be similarly adopted to this experiment. Although a packed-bed configuration is used in this experiment, a fluidized-bed configuration can also be used.

The main advantage of a continuous process over a batch process is the ease of automation and control. These modern engineering measures can lead to reduced operational cost and more consistent product quality. Despite the emphasis on enzyme immobilization, there are only a few established immobilized enzyme processes in industry. However, the use of immobilized enzymes should increase as better immobilization procedures that yield longer enzyme lifetime, improved stability, and increased activity are developed.

Thus, enzyme lifetime, stability, and volumetric activity are some variables that are routinely evaluated to indicate the effectiveness of a proposed immobilization procedure. As in any heterogeneous catalysis system, both external and internal diffusion of substrate and product can greatly affect the reaction rate. The mass transfer consideration indicates that particle shape, particle size, pore size, enzyme loading per particle, and substrate flow rate can all affect the reaction rate. The mass transfer limitation arising from immobilization is manifested in an increase in the apparent value of the Michaelis-Menten constant; thus, the value of this constant as compared to the corresponding intrinsic value of the solubilized enzyme is often recognized as a good indicator of the extent of mass transfer resistance. It is important that an experimenter recognizes the difference between intrinsic and apparent kinetic parameters. As a general rule, fast flow around a catalyst support at a high superficial velocity will reduce the external mass transfer resistance. Of course, a price must be paid to achieve this high superficial velocity in terms of a larger pressure drop across the column.

Many experiments may be performed with an immobilized enzyme reactor. In addition to the determination of kinetic parameters, temperature and pH optima can be investigated as was done with the solubilized enzyme. These optima may be different from the solubilized counterpart because the presence of positive or negative charges in the matrix can lead to a shift in the optimum pH. Likewise, the binding of enzymes can restrict enzyme movement, leading to a shift in the temperature optimum. One study that is important for a continuous reactor not investigated in this experiment is the recovery of the enzyme system from adverse conditions. For example, the feed solution's pH may fluctuate and not necessarily correspond to the optimum value. Without a pH controller, the feed solution may occasionally become too acidic or too basic. The immobilized enzyme must remain stable with respect to disturbances in the environment and quickly recover with minimum disruption in productivity. Otherwise, the loss of activity after such a disturbance may necessitate repacking the entire column.

---

## List of Reagents and Instruments

### A. Equipment

- Packed bed reactor made from a glass tubing (25~mm i.d.)
- Graduated cylinder
- Temperature bath, 90°C
- Thermometer
- Spectrophotometer
- See immobilization protocols for the equipment required to obtain beads of immobilized enzymes.

### B. Reagents

- Enzyme (invertase from baker's yeast)
  - Sucrose solution, 50~g/l in 0.02M sodium acetate buffer at pH 4.5.
  - See immobilization protocols for the reagents required to obtain beads of immobilized enzymes.
-

## Procedures

1. *Preparation of immobilized enzyme beads:* Follow the immobilization protocols provided to prepare 100 ml of immobilized invertase beads. See Note 1. The process of bead formation may be easily automated with a pump, as shown in Figure 1.
2. *Construction of immobilized enzyme reactor:* The construction of the reactor to be used in this experiment is schematically shown in Figure 2. First, plug the bottom end of the glass tubing and fill with immobilized enzyme beads. Place the top plug with the outlet tubing, whose end is screened to prevent the loss of beads. The optional water jacket for temperature studies can also be added.
3. *Construction of automated sugar analysis:* The automated continuous reducing sugar analysis is based on the same DNS wet chemical principle used in the previous experiments. The solution to be sampled and the DNS reagent are pumped with peristaltic pumps and mixed at a ratio of 1:1. The precise value of this mixing ratio is *not* critical as long as the user calibrates the automated analysis system with the same ratio as he uses during the run; otherwise the mixing ratio of the sample and color developing reagent must be determined by disconnecting the tubing before the point of mixing and measuring the flow rates individually with graduated cylinders. After sample and DNS reagent are mixed, air is added to the stream to segment the liquid, thus, ensuring a plug flow. The mixture is then passed through a water bath at 90°C. The water bath can be constructed from a 1000~ml beaker heated on a magnetic stirrer. The length of tubing to be immersed in this hot water bath is such that the sample stays in the heated bath for 10 minutes. It is critical that the color reaction is allowed to proceed to completion. (The best way to determine the length is simply to turn on the pumps for 10 minutes and note the front of the sample at the end of this period.) The tubing is cooled in the next water bath to room temperature. After passing through a bubble eliminator, the colored sample solution is pumped into a flow-through cell in a spectrophotometer. The absorbance is measured continuously with a computer. If the absorbance is not within the desired linear range of the spectrophotometer, either a flow-through cell with a smaller light path should be used or water may be mixed with the colored sample stream prior to absorbance measurement. For an optically dense sample, both strategies can be combined.
4. *Calibration of automated sugar analysis:* Dip the end of the sample tubing into a solution of equimolar mixture of glucose and fructose. The movement of the sample and the gradual development of the characteristic deep red-brown color in the heated bath can be followed visually if translucent silicone tubing or transparent Tygon tubing are used. The reacted sample can be seen reaching the spectrophotometer. While the transient response in the absorbance shows the inherent dynamics of the measurement system, the steady absorbance reading is used to generate a calibration curve to relate the measured absorbance to the concentration of the equivalent hydrolyzed sugar solution. After the stable absorbance reading, the end of the tubing is dipped into water for about 10 seconds. This cleans the tubing to avoid cross contamination. The end of the tubing is then transferred into the next standard sugar solution. Note that the small segment of water suctioned between two different standard solutions of sugar can be used as an indicator of the boundary between these solutions that may otherwise be difficult to follow visually. This calibration process is

- repeated until the concentration of the reducing sugar solution covers a range similar to that used in the main part of the experiment. See Table 1.
5. *On-line data acquisition:* The on-line data-acquisition program with graphic display capabilities is provided. You are encouraged to study its source code and perhaps make suggestions for improvements for future experiments. The program continues to take data until the end of the sampling interval is reached. At that time the voltage or absorbance values are averaged, and the program displays this averaged value on the screen, both numerically and graphically, and simultaneously sends it to a sequential file to be stored for later retrieval. The program then updates the count by one and goes on to the next sampling interval, and so on, until a pre-defined set of signals (i.e., the simultaneous pressing of left and right shift keys) is sent to the computer to indicate the end of the run.
  6. *Effect of flow rate:* Change the residence time to up to 10 minutes. The substrate volumetric flow rate needed to achieve the specified residence time depends on volume of the packed bed. Because the measurement of the extent of reaction is already automated, the entire experiment can be automated if the speed of the substrate feed pump can be programmed to shift in a stepwise manner. Table 2 suggests some flow rates to be used based on a packed bed volume of 100~ml.
  7. Due to time constraints, only the effect of flow rate is studied above. Other interesting experiments that can be conducted to reveal the performance of an immobilized enzyme reactor include varying the substrate concentration in the feed, pH, temperature, superficial liquid velocity (which depends on the reactor geometry: diameter, bed height), % polymer in the gel bead, matrix pore size, bead size, and bed fluidization. In addition, the enzyme reactor can be operated over many days/weeks to measure the rate of enzyme deactivation and leakage.
- 

## Notes

1. Note that the standard protocol produces only approximately 10 ml of beads. The amount of reagent can be multiplied accordingly to obtain the desired amount of immobilized enzymes. Enzyme immobilization should be completed before the class so that the students may concentrate on the measurement of enzyme kinetic parameters during the laboratory period. The beads should be prepared with enough time to allow the alginate beads to harden sufficiently.
- 

## Discussions

Because enzymes are biological catalysts that promote the rate of reactions but are not themselves consumed in the reactions in which they participate, they may be used repeatedly for as long as they remain active. However, in most of the industrial, analytical, and clinical processes, enzymes are mixed in a solution with substrates and cannot be economically recovered after the exhaustion of the substrates. This single use is obviously quite wasteful when the cost of enzymes is considered. Thus, there is an incentive to use enzymes in an immobilized or insolubilized form so that they may be retained in a biochemical reactor to catalyze further the subsequent feed. The use of an

immobilized enzyme makes it economically feasible to operate an enzymatic process in a continuous mode.

Numerous methods exist for enzyme immobilization, sometimes referred to as enzyme insolubilization. The overwhelming majority of the methods can be classified into four main categories: matrix entrapment, microencapsulation, adsorption, and covalent binding. Of these methods, matrix entrapment is the focus of this experiment.

Many entrapment methods are used today, and all are based on the physical occlusion of enzyme molecules within a "caged" gel structure such that the diffusion of enzyme molecules to the surrounding medium is severely limited, if not rendered totally impossible. What creates the "wires" of the cage is the cross-linking of polymers. A highly cross-linked gel has a fine "wire mesh" structure and can more effectively hold smaller enzymes in its cages. The degree of cross-linking depends on the condition at which polymerization is carried out. Because there is a statistical variation in the mesh size, some of the enzyme molecules gradually diffuse toward the outer shell of the gel and eventually leak into the surrounding medium. Thus, even in the absence of loss in the intrinsic enzyme activity, there is a need to replenish continually the lost enzymes to compensate for the loss of apparent activity. In addition, because an immobilized enzyme preparation is used for a prolonged period of operation, there is also a gradual, but noticeable, decline in the intrinsic enzyme activity even for the best method. Eventually, the entire immobilized enzyme packing must be replaced.

Besides the leakage of enzymes, another problem associated with the entrapment method of immobilization is the mass transfer resistance to substrates, products, and inhibitors. Because the average diameter of a typical bead of enzyme impregnated gel is much larger compared to the average diffusion length, substrate cannot diffuse deep into the gel matrix, as in any other conventional non-biological immobilized catalysts. At the same time, the diffusional resistance encountered by the product molecules can sometimes cause the product to accumulate near the center of the gel to an undesirable high level, leading to product inhibition for some enzymes. Thus, ideally the network of cross-linking should be coarse enough so that the passage of substrate and product molecules in and out of a gel bead is as unhindered as possible. For this reason, entrapment is not suitable for special cases where the substrate has a large molecular weight such that it cannot easily move freely in the gel matrix.

Unlike the adsorption and covalent bonding methods, most polymerization reactions that cause cross-linking and gel formation in entrapment methods do not directly involve the formation of bonds between the support material and the enzyme molecules. There are reports that these bonds change the conformation of the enzyme protein and modify the enzyme properties. Since the enzyme molecules do not themselves participate in the polymerization reaction in the entrapment methods, the same entrapment techniques can be successfully applied to a wide range of enzymes with only minor modifications between different enzymes.

---

## Questions

1. Plot the transient response of sucrose hydrolyzed as a function of time and estimate the time constant of the immobilized enzyme reactor. How does this compare with the residence time of the substrate?
2. Plot the degree of conversion (in %) and productivity as a function of flow rate.
3. From a plot of reaction rate versus residual substrate concentration, report the value for the apparent Michaelis-Menten constant.
4. Comment on ways to improve the experiment.

## Data Forms

**Table 1. AUTOMATED SUGAR ANALYSIS**

Invert Sugar Conc. (g/l)	Absorbance (A.U.)
0.0	
10.0	
15.0	
20.0	
25.0	
30.0	
35.0	
40.0	
50.0	

**Table 2. FLOW RATE**

Productivity Rate (ml/min- hr)	Volumetric Flow (ml/min)	Residence Time (min)	Absorbance (A.U.)	Invert Sugar Conc. (g/l)	Conversion (%)	(g/l-
	100.0	1.0				
	75.0	1.3				
	66.7	1.5				
	50.0	2.0				
	40.0	2.5				
	33.3	3.0				
	25.0	4.0				
	20.0	5.0				
	16.7	6.0				
	14.3	7.0				
	12.5	8.0				



11.1      9.0  
10.0      10.0

---

-----

---

*Return to Prof. Nam Sun Wang's [Home Page](#)  
Return to [Biochemical Engineering Laboratory \(ENCH485\)](#)*

***Continuous Immobilized Enzyme Reactor***

*Forward comments to:*

***Nam Sun Wang***

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering*

*University of Maryland*

*College Park, MD 20742-2111*

*301-405-1910 (voice)*

*301-314-9126 (FAX)*

*e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)*



## **ANEXO S**

Tradução – Protocolo nº 13 – Reator contínuo de enzimas imobilizadas



# PROTOCOLO Nº 13

## REATOR CONTÍNUO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS

*Preparado por*  
**Nam Sun Wang**  
Department of Chemical & Biomolecular Engineering  
University of Maryland  
College Park, MD 20742-2111  
ENCH485

---

### Tabela de conteúdos

- Objetivos
  - Introdução
  - Lista de reagentes e instrumentação
  - Procedimentos
  - Discussão
  - Questões
  - Formulário de dados
  - Comentários
- 

### Objetivos

Demonstrar a automação laboratorial, estudando a conversão e a cinética da hidrólise da sacarose num reator contínuo para enzimas imobilizadas.

---

### Introdução

A invertase de *Saccharomyces cerevisiae* é imobilizada em alginato de cálcio, seguindo o protocolo de imobilização em gel. Outras combinações de enzima e de procedimentos de imobilização podem ser igualmente adotadas para esta experiência. Embora nesta experiência seja usada uma configuração de leito fixo, também pode ser usada uma configuração de leito fluidizado.

A principal vantagem de um processo contínuo comparativamente a um processo descontínuo é a facilidade de automação e de controlo. Estas medidas de engenharia moderna podem levar à redução de custos operacionais e a uma qualidade de produto mais consistente. Apesar da ênfase na imobilização enzimática, existem apenas alguns processos estabelecidos de enzimas imobilizadas na indústria. No entanto, a utilização de enzimas imobilizadas deverá aumentar, tendo em conta que são otimizados os procedimentos de imobilização, os quais produzem um maior tempo médio de vida da enzima, melhoram a estabilidade e aumentam a atividade.

Portanto, o tempo médio de vida da enzima, a estabilidade e a atividade volumétrica são algumas das variáveis habitualmente avaliadas para indicar a eficácia de um procedimento de imobilização proposto. Como em qualquer sistema catalítico heterogêneo, ambas as difusões externas e internas do substrato e do produto podem afetar muito a taxa de reação. A consideração de transferência de massa indica que a forma e o tamanho da partícula, o tamanho do poro, o carregamento de enzima por partícula e a taxa de fluxo do substrato podem afetar a taxa de reação. A limitação da transferência de massa resultante da imobilização manifesta-se por um aumento no valor aparente da constante de Michaelis-Menten; portanto, o valor desta constante comparado com o valor intrínseco correspondente à solubilidade da enzima é frequentemente reconhecido como um bom indicador da extensão da resistência de transferência de massa. É importante que um investigador reconheça a diferença entre parâmetros cinéticos intrínsecos e aparentes. Regra geral, o fluxo rápido à volta do suporte catalítico, a uma velocidade superficial alta, irá reduzir a resistência de transferência de massa externa. No que se refere à diminuição de uma grande pressão através da coluna, certamente que deve ser pago um preço para alcançar esta velocidade superficial alta.

Podem ser realizadas muitas experiências com um reator de enzimas imobilizadas. Para além da determinação de parâmetros cinéticos, a temperatura e o pH ótimo podem ser investigados como foi feito com a enzima solubilizada. Esses valores ótimos podem ser diferentes das enzimas solubilizadas porque a presença de cargas positivas ou negativas na matriz pode levar a uma mudança no pH ótimo. Do mesmo modo, a ligação das enzimas pode restringir o movimento enzimático, levando a uma mudança na temperatura ótima. Um estudo importante para o reator contínuo, não investigado nesta experiência, é a recuperação do sistema enzimático em condições adversas. Por exemplo, o pH da solução de alimentação pode oscilar e não corresponder necessariamente ao valor ótimo. Sem um controlador de pH, a solução de alimentação pode ocasionalmente tornar-se muito ácida ou muito básica. A enzima imobilizada deve permanecer estável, no que se refere a alterações no ambiente, e deve recuperar rapidamente com o mínimo de interrupção na produtividade. Caso contrário, a perda de atividade após tais perturbações pode obrigar ao recondicionamento de toda a coluna.

---

## **Lista de reagentes e instrumentação**

### **A. Equipamento**

- Reator de leito fixo feito com tubos de vidro (25 mm i.d.)
- Proveta graduada
- Temperatura do banho, 90 °C
- Termómetro
- Espectrofotómetro
- Ver o equipamento requerido para obter esferas de enzimas imobilizadas nos protocolos de imobilização.

### **B. Reagentes**

- Enzima (invertase de fermento de padeiro)
- Solução de sacarose, 50 g/L em acetato de sódio 0,02 M com pH 4,5.
- Ver o equipamento requerido para obter esferas de enzimas imobilizadas nos protocolos de imobilização.

## Procedimentos

1. *Preparação de esferas de enzimas imobilizadas:* Siga os protocolos de imobilização fornecidos para preparar 100 mL de esferas de invertase imobilizadas. Ver Nota 1. O processo de formação de esferas pode ser facilmente automatizado com uma bomba, como mostra a Figura 1.
2. *Construção de um reator de enzimas imobilizadas:* A construção do reator, para ser usado nesta experiência é apresentada esquematicamente na Figura 2. Primeiro, carregue no botão de desligar, do tubo de vidro, e encha-o com esferas de enzimas imobilizadas. Coloque a ficha de cima com o tubo de saída, cuja parte inferior está protegida para prevenir a perda de esferas. Pode também adicionar uma cobertura exterior de água, opcional para estudos com variação de temperatura.
3. *Construção de um método automatizado de análise de açúcares:* O método contínuo de análise de açúcares redutores automatizado baseia-se no mesmo princípio químico (em fase líquida) do DNS utilizado nos protocolos anteriores. A solução, que vai ser analisada e o reagente DNS são bombeados com uma bomba peristáltica e misturados na proporção de 1:1. O valor exato desta proporção de mistura não é crítico, desde que o utilizador calibre o sistema automatizado de análise com a mesma proporção que utiliza durante a experiência; ou, de outra forma, a proporção de mistura da amostra e do reagente revelador da cor devem ser determinados desligando o tubo antes do ponto de mistura, medindo individualmente a taxa de fluxo com provetas graduadas. Depois da amostra e DNS terem sido misturados, adiciona-se ar à corrente para separar o líquido, garantindo assim, um pistão de fluxo. A mistura é então passada por um banho de água a 90 °C. Pode ser utilizado um gobelé de 1.000 mL com água aquecida numa placa de agitação magnética, utilizada como banho. A duração de imersão do tubo neste banho de água quente é de 10 minutos. É crucial que se permita o desenvolvimento da cor para a conclusão do processo. (A melhor forma de determinar a duração deste processo é, simplesmente, ligar as bombas durante 10 minutos e observar a parte “da frente” da amostra no final deste tempo.) O tubo é então arrefecido num outro banho de água, até atingir a temperatura ambiente. Depois de passar por um eliminador de bolhas, a solução de amostra colorida é bombeada para uma célula de fluxo num espectrofotómetro. A absorvância é medida de forma contínua e registada num computador. Se o valor de absorvância não se encontrar dentro da zona linear desejada deve ser utilizada uma célula de fluxo com um percurso ótico menor ou pode misturar-se água com a amostra colorida, antes da medição da absorvância. Para amostras óticamente densas, devem ser combinadas ambas as estratégias.
4. *Calibração do método automatizado de análise de açúcares:* mergulhe o fundo do tubo da amostra numa solução-mistura de glucose e frutose equimolecular. O movimento da amostra e o desenvolvimento gradual das características de cor vermelho-acastanhado escuro no banho aquecido podem ser seguidos visualmente se for usado um tubo de silicone translúcido ou um tubo Tygon transparente. Pode ver-se a amostra em reação a chegar ao espectrofotómetro. Enquanto a resposta transitória na absorvância mostra as dinâmicas inerentes do sistema de medição, a leitura contínua da absorvância é utilizada para criar uma curva de calibração que relacione a absorvância medida com a concentração da solução hidrolisada de açúcar. Após leituras estáveis de absorvância, mergulha-se o fundo do tubo em água durante cerca de 10 segundos. Este procedimento limpa o tubo para evitar contaminação cruzada. A solução que se encontra no fundo do tubo é então transferida para a próxima solução padrão de açúcar. Note que o pequeno segmento de água, aspirado entre as duas diferentes soluções padrão de açúcar, pode ser usado como um indicador dos limites entre estas soluções, que de outra forma poderia ser difícil de seguir visualmente. Este

processo de calibração repete-se até que a concentração da solução de açúcar reduzido alcance uma concentração semelhante à usada na maior parte desta experiência. (Ver Tabela 1).

5. *Aquisição de dados em linha:* É fornecido o programa de aquisição de dados em linha, com capacidade de visualização de gráficos. Aconselha-se aos alunos estudar o código de origem e fazer sugestões de melhorias para experiências futuras. O programa continua a obter dados até ser alcançado o fim do intervalo de amostra. Naquele momento, os valores de voltagem ou de absorvância encontram-se na média, e o programa mostra este valor médio no ecrã, tanto numérica como graficamente, e simultaneamente envia-os para um ficheiro sequencial de armazenamento para recuperação posterior. O programa então atualiza a conta através de um intervalo de amostra e prossegue para o próximo, e por aí adiante, até ser enviado ao computador um conjunto de sinais pré-definidos (por exemplo, pressionar simultaneamente as teclas esquerda e direita do shift) para indicar o fim da experiência.
6. *Efeito da taxa de fluxo:* Altere o tempo de residência para 10 minutos. A taxa de fluxo volumétrico do substrato necessária para alcançar o tempo de residência especificado depende do volume do leito fixo. Toda a experiência pode ser automatizada se a velocidade da bomba de alimentação do substrato for programada para mudar por etapas, uma vez que a medição da extensão de reação já se encontra automatizada. A Tabela 2 sugere algumas taxas de fluxo para serem usadas com base num volume de leito fixo de 100 mL.
7. Apenas se estuda o efeito da taxa de fluxo devido a limitação de tempo. Outras experiências interessantes, que podem ser conduzidas para revelar o desempenho de um reator de enzimas imobilizadas, incluem a variação da concentração de substrato na alimentação, pH, temperatura, velocidade do líquido superficial (a qual depende da geometria do reator: diâmetro, peso do leito), % de polímero nas esferas de gel, tamanho do poro da matriz, tamanho da esfera e fluidificação do leito. Além disso, o reator enzimático pode trabalhar durante muitos dias/semanas para medir a taxa de desativação enzimática e de fuga.

---

## Notas

1. Note que o protocolo padrão produz apenas aproximadamente 10 mL de esferas. A quantidade de reagente pode ser multiplicada em conformidade para obter a quantidade desejada de enzimas imobilizadas. A imobilização enzimática deverá ser terminada antes da aula, para que os alunos possam concentrar-se na medição dos parâmetros cinéticos enzimáticos durante o período de laboratório. As esferas deverão ser preparadas com tempo suficiente, de forma a permitir que as esferas de alginato fiquem suficientemente duras.

---

## Discussão

As enzimas podem ser usadas repetidamente durante o tempo que se mantiverem ativas, porque são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de reações, mas que não se auto consomem nas reações em que participam. No entanto, na maior parte dos processos industriais, analíticos e clínicos, as enzimas são misturadas numa solução com substratos e não podem ser economicamente recuperadas após a exaustão dos substratos. Esta utilização única é obviamente dispendiosa quando o custo das enzimas é considerável. Portanto, existe um incentivo para o uso de enzimas numa



forma imobilizada ou insolubilizada, para que estas possam ser retidas num reator bioquímico para catalisar posteriormente a reação seguinte. A utilização de uma enzima imobilizada torna-a economicamente exequível para operar um processo enzimático de modo contínuo.

Existem muitos métodos de imobilização enzimática, muitas vezes referidos como insolubilização enzimática. A esmagadora maioria dos métodos podem ser classificados em quatro categorias: aprisionamento na matriz, microencapsulação, adsorção e ligação covalente. Destes métodos, o aprisionamento na matriz é o foco desta experiência.

Atualmente são utilizados diversos métodos de aprisionamento, e todos eles se baseiam na oclusão física das moléculas enzimáticas dentro de uma «gaiola» com uma estrutura em gel, de tal forma que a difusão das moléculas enzimáticas no espaço circundante é rigorosamente limitada, e até mesmo totalmente impossível. As ligações cruzadas dos polímeros criam as «barras» da gaiola. Um gel com muitas ligações cruzadas tem uma boa estrutura de «rede de barras» e pode segurar, com maior eficiência, enzimas mais pequenas nas suas gaiolas. O grau das ligações cruzadas depende das condições de polimerização. Algumas das moléculas enzimáticas espalham-se gradualmente em direção à parede exterior do gel e, eventualmente, passam para o espaço circundante, porque existe uma variação estatística no tamanho da rede. Assim, mesmo na ausência de perda da atividade enzimática intrínseca existe uma necessidade de reabastecer continuamente as enzimas perdidas para compensar a perda de atividade aparente. Além disso, existe também uma diminuição gradual, mas visível, na atividade enzimática intrínseca mesmo com o melhor método, porque uma preparação de enzimas imobilizadas é utilizada por um período prolongado de tempo operacional. No final todas as enzimas imobilizadas devem ser substituídas.

Para além da perda de enzimas, a resistência de transferência de massa para os substratos, produtos e inibidores é outro problema associado ao método de aprisionamento da imobilização. O substrato não se consegue espalhar profundamente na matriz de gel como em qualquer outro catalisador imobilizado não biológico convencional, porque o diâmetro médio de um leito típico de gel saturado de enzimas é muito maior comparado com a duração de difusão média. Ao mesmo tempo, a resistência à difusão encontrada pelas moléculas do produto pode, por vezes, causar a acumulação do produto perto do centro das esferas de gel a um nível inconvenientemente alto, levando, para algumas enzimas, à inibição de formação do produto. Portanto, idealmente a rede de ligações cruzadas deve ser suficientemente «grossa», para que a passagem de moléculas de substrato e de produto, para dentro e para fora da esfera de gel, seja tão impeditiva quanto possível. Por esta razão, o aprisionamento não é adequado em casos onde o substrato tem um peso molecular tão grande que não se possa mover livre e facilmente na matriz de gel.

Ao contrário dos métodos de adsorção e de ligação covalente, a maior parte das reações de polimerização que provocam as ligações cruzadas e a formação de gel nos métodos de aprisionamento, não envolvem diretamente a formação de ligações entre o material de suporte e as moléculas enzimáticas. Existem estudos que mostram que essas ligações alteram a adaptação de proteínas enzimáticas e modificam as propriedades da enzima. Podem ser aplicadas as mesmas técnicas de aprisionamento, com sucesso, a uma vasta gama de enzimas com apenas umas pequenas modificações para enzimas diferentes, uma vez que as moléculas enzimáticas não participam elas próprias na reação de polimerização nos métodos de aprisionamento.

## Questões

1. Faça o gráfico da resposta transitória da sacarose hidrolisada em função de tempo e faça uma estimativa da constante de tempo do reator de enzimas imobilizadas. Como é que isto se compara com o tempo de residência do substrato?
2. Faça o gráfico do grau de conversão (em %) e da produtividade em função da taxa de fluxo.
3. A partir de um gráfico da taxa de reação *versus* a concentração de substrato residual, refira o valor aparente da constante de Michaelis-Menten.
4. Comente formas de melhorar este protocolo.

## Formulário de dados

**Tabela 1. MÉTODO AUTOMATIZADO DE ANÁLISE DE AÇÚCARES**

Concentração de açúcar invertido (g/L)	Absorvância (UA)
0,0	
10,0	
15,0	
20,0	
25,0	
30,0	
35,0	
40,0	
50,0	

**Tabela 2. TAXA DE FLUXO**

Taxa de fluxo volumétrico (mL/min)	Tempo de residência (min)	Absorvância (UA)	Concentração de açúcar invertido (g/L)	Conversão (g/L)	Produtividade (g/L.h)
100,0	1,0				
75,0	1,3				
66,7	1,5				
50,0	2,0				
40,0	2,5				
33,3	3,0				
25,0	4,0				
20,0	5,0				
16,7	6,0				
14,3	7,0				
12,5	8,0				
11,1	9,0				
10,0	10,0				

***Reator contínuo de enzimas imobilizadas***

*Enviar comentários para:*

***Nam Sun Wang***

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering*

*University of Maryland*

*College Park, MD 20742-2111*

*301-405-1910 (voice)*

*301-314-9126 (FAX)*



*e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)*



## **ANEXO T**

Texto 7 – Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase



## Substrate Specificity of Invertase & Amylase and the Inhibition of Invertase

Diego D. Viteri & Jeff Orlinsky

### ABSTRACT

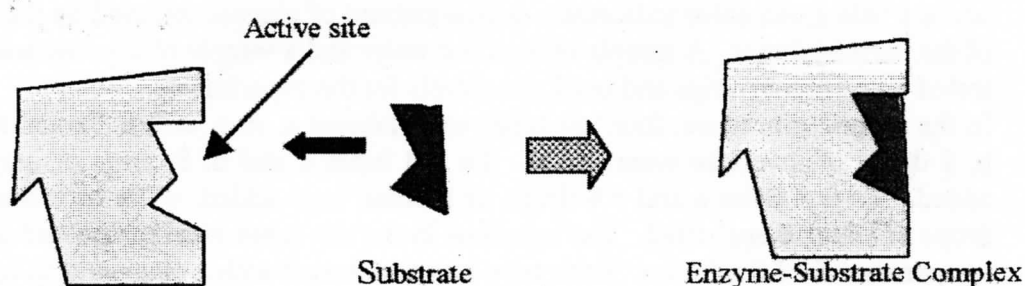
The specificity of enzymes arises because of their ability to recognize and bind a particular substrate. In some instances enzymes may bind substances, which are not substrates, and thus the enzymes become inhibited. In this experiment the specificity and inhibition of invertase and amylase were tested in order to understand the specificity of those two enzymes towards a particular set of substrates. It was found that invertase only hydrolyzed sucrose, while the carbohydrates maltose, lactose, and starch were not hydrolyzed. In the case of amylase, it only hydrolyzed starch. The inhibitor aniline limited the binding of invertase to sucrose. Conclusive evidence from the experiments indicates that the enzyme invertase is specific to sucrose, while amylase is specific to starch. The non-competitive inhibitor aniline did limit the action of invertase on sucrose.

**Key words:** enzyme, substrate, inhibitor.

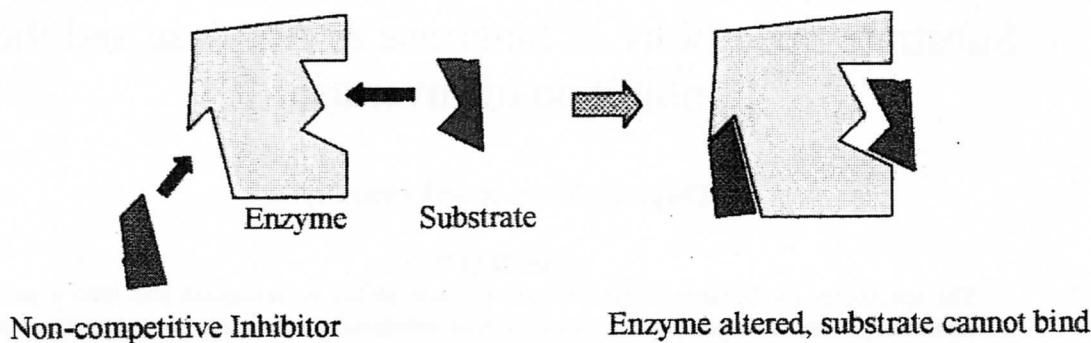
**Abbreviations:** DNS, dinitrosalicylic acid.

### INTRODUCTION

Enzymes are proteins that are specific for particular reactions. The substance on which the enzyme acts is called the substrate. Within the enzyme there is an active site with which the substrates readily interact because of the shape of this site. Enzymes are very specific towards a particular substrate, meaning that the enzyme will only react with substrates that fit the shape of the enzyme. In the case of invertase the substrates are compounds containing fructose, in the furanose ring form, in linkage with certain other compounds.



In some instances enzymes may bind substances, which are not substrates. In this way, the active site of the enzyme molecule may be blocked or may become distorted. In this form, the enzyme becomes inhibited. There are three different kinds of inhibitors: competitive, non-competitive, and uncompetitive. A non-competitive inhibitor, such as the one used in this experiment, binds to the enzyme at a location away from the active site, but alters the shape of the enzyme so that the active site is no longer functional.



#### MATERIALS AND METHODS **Reagents**

The reagents used in the experiments were purchased from Kemtec Educational Corporation (West Chester, OH). The reagents—buffer 1, buffer 11, glucose, maltose, lactose, sucrose, starch, aniline, invertase, and DNS were prepared as indicated in the *Vial Making* protocol of the *Enzyme Kit*. Reagent strips were used to detect the activity of invertase by measuring the amount of glucose released from the carbohydrates. Each strip was used only once. The test area of the strip was dip into the solution and removed immediately. Twenty seconds after wetting the strip, its color was observed. A deep green color in the tip of the strip indicated that hydrolysis occurred, and therefore a great amount of glucose was released from a particular carbohydrate. A light green or yellow color indicated that hydrolysis did not occur and that little or no glucose was released during the reaction.

**Specificity of Invertase and Amylase** In this experiment, two procedures were performed. In the first procedure, 8 drops (0.5 ml) of invertase solution were added to four test tubes. To one tube, 8 drops of sucrose solution were added, to another 8 drops of maltose solution, to another 8 drops of lactose solution, and to the fourth tube 8 drops of starch solution. After thoroughly mixing the solutions in the four test tubes, they were left at room temperature for 10 minutes. Each solution in the test tubes was tested with a reagent strip. A deep green color indicated a great amount of glucose released, while a pale green color indicated a scarce amount of glucose released by the hydrolysis of the carbohydrates. A sample of distilled water and a sample of glucose solution were tested with reagent strips and used as controls for the experiments.

In the second procedure, four test tubes were labeled *a*, *b*, *c*, and *d*. To test tubes *a* and *b*, 8 drops of invertase were added. To test tubes *c* and *d*, 8 drops of amylase were added. To test tubes *a* and *c* 8 drops of sucrose were added, while to tubes *b* and *d* 8 drops of starch were added. The solutions in the test tubes were mixed and left at room temperature for 10 minutes. Each tube was then tested with a reagent strip to detect the release of glucose.

#### **Inhibition of Invertase**

For this experiment, five test tubes were labeled 1 - 5. Buffer 1 was added to test tube 4 (8 drops), and to test tube 5 (16 drops). To each of the five tubes, 8 drops of sucrose was added, 8 drops of 3mM aniline, 8 drops of 9mM aniline, and 8 drops of 18 mM aniline, were added to test tubes 1, 2 and 3, respectively. After adding buffer, substrate, and aniline to each test tube, the tubes were left at room temperature. The enzyme



solution was also held for about 5 minutes at room temperature. This holding at the incubation temperature was designed to ensure that the mixing of enzyme and substrate solutions did not result in a temperature change, as if cold enzyme were added to warm substrate. To test tubes I - 4, 8 drops of the enzyme solution were added. The incubation period was terminated by the addition of 16 drops of DNS to each tube. The addition of DNS was performed in the same sequence and at the same time intervals as was used in adding enzyme solution to the tubes to start the assay.

The tubes containing the assay and DNS were placed in a boiling water bath for 10 minutes. The tubes were covered with foil to minimize evaporation. After the water bath, 8 drops of distilled water were added to each tube and observations were recorded.

Table 1		
Sample	Reagent	Hydrolysis (yes or no)
Sucrose	Light green	Yes
Maltose	Yellow	No
Lactose	Yellow	No
Starch	Yellow	No
Water	Yellow	--
Glucose	Green	--

## RESULTS

By testing the effects of invertase and amylase in particular carbohydrates, it was possible to determine the specificity of those two enzymes. In the same way, by the addition of aniline in the hydrolysis reactions of certain carbohydrates and invertase, it was possible to test the effects of enzyme inhibition. The results from experiment 1 show that the enzyme invertase was only specific to sucrose (Table 1). This means that during the reaction of invertase with the particular carbohydrates, the enzyme was only able to hydrolyze sucrose. For maltose, lactose, and starch, hydrolysis did not take place.

In experiment 2, the specificity of invertase and amylase was tested with the carbohydrates sucrose and starch (Table 2) in the case of invertase, it hydrolyzed sucrose, but it did not hydrolyze starch. This means the obtained were the same as those from experiment 1. Once again, evidence for sucrose but not for starch. On the other hand, amylase was only specific for starch. Amylase was able to hydrolyze starch, but it did not hydrolyze sucrose.

Table 2		
Sample	Reagent Strip color	Hydrolysis (Yes or No)
Invertase & Sucrose (tube a)	Light green	Yes
Invertase & Starch (tube b)	Yellow	No
Amylase & Sucrose (tube c)	Pale Green	No
Amylase & Starch (tube d)	Yes	Yes

In experiment 3, DNS was used to measure invertase activity. In order to understand the way inhibitors work, it is necessary to measure enzyme activity by the reducing power of glucose and fructose released during an enzymatic reaction. In test tubes 1 - 3, three different concentrations of the inhibitor aniline were used to test its effects on invertase (Table 3). In the experiment tube 5 was a blank, and therefore had a minimum observable color. Tube 4 was a standard and had maximum observable color. After the assay was completed, the colors of the three experimental tubes were compared to those of the control tubes (tubes 4 and 5). For test tubes 1, 2 and 3, the colors of the solutions were of lesser intensity than the color of the solution in test tube 4, and of greater intensity than the color of the solution in test tube 5. Out of the three experimental test tubes, test tube 1 had the greatest color intensity, followed by test tube 2 with a lesser color intensity, and finally by test tube 3 with the least color intensity.

Table 3					
Tube #	1	2	3	4	5
Intensity	+++	++	+	++++	+
(+ ) Denotes least color intensity (++++) Denotes greatest color intensity					

## DISCUSSION

By the reaction of certain carbohydrates with invertase and amylase, the specificity of those two enzymes was determined. In similar fashion, aniline was proven to be an inhibitor of invertase. In experiment 1, evidence showed that invertase was only specific for sucrose, it was not specific for maltose, lactose, and starch. The results obtained make sense because the substrates of invertase are compounds known to contain unsubstituted fructose, in the furanose ring form, in linkage with certain other compounds. Sucrose is a disaccharide composed of fructose and glucose. Invertase was specific for sucrose because it was able to recognize the fructose ring, breaking the bonds between fructose and glucose, and therefore making hydrolysis occur. Although maltose, lactose, and starch contain glucose, they do not have any fructose in their structures. For that reason, invertase was not able to break down the carbohydrates due to the lack of the fructose ring in them.

In experiment 2, amylase was tested in starch and sucrose to determine if the enzyme was specific for either of those two compounds. Evidence after the experiment showed that amylase was specific for starch and not specific for sucrose. Once again, the results made sense because starch is composed of amylose. The structures of amylose and amylase are very similar, and that is why amylase is able to recognize the amylose in starch, breaking the bonds of the carbohydrate and releasing the glucose molecules present in starch. Sucrose does not have any amylose and that is why amylase is not able to hydrolyze sucrose.

The effects of aniline in invertase were tested in experiment 3, and it was found that aniline was an inhibitor of the enzyme invertase. Evidence for this is supported by the results obtained. The data gathered is reasonable because the intensity of color in the different test tubes came out as expected. Tube 4 was a standard; it contained invertase and sucrose without aniline acting as an inhibitor. Because of this, hydrolysis occurred normally as proven by the deep brown color that the reaction yielded. All three experimental test tubes had a lesser color intensity than the solution in test tube 4 because they contained the inhibitor aniline. Aniline does not allow invertase to properly break down starch, and that is why the experimental tubes did not match the color intensity of tube 4. Out of the three experimental tubes, tube 1 had the greatest

color intensity. This is reasonable because in tube 1, aniline was in a concentration of 3mM, which is less than the concentration of aniline in tubes 2 and 3. At this concentration of aniline, invertase was still able to work on the substrate but not with the efficiency presented in tube 4 which did not have aniline. Tube 2 had a lesser color intensity than tube 1 because tube 2 had a higher concentration of aniline. This means that in tube 2, aniline impeded the work of the enzyme to a greater extent than in tube 1. The same logic applies to tube 3 which had a concentration higher than tubes 1 and 2. Because tube 3 had a much greater concentration of aniline, invertase was inhibited more easily and sucrose was not broken down effectively.

## CONCLUSION

Enzymes are catalysts, which act with marked specificity towards their substrates.

This specificity arises because an enzyme molecule has a binding area, which recognizes and binds the substrate. The specificity so ensured is of central importance in the control of metabolism in living organisms. In some occasions enzymes may bind to substances, which are not substrates. When this happens, the active site of the enzyme may be blocked or may become distorted. This process is known as inhibition. The purpose of these experiments was to identify whether invertase and amylase were specific to certain carbohydrates. In the same way, the effects of aniline were tested to identify its inhibition to invertase.

The results are significant because it was found that enzymes are specific to certain compounds. This means that enzymes only recognize those substrates that can fit in the enzyme's active site. It was also found that inhibitors, which are molecules that do not allow the substrates to bind to the active site, may distort the work of enzymes on substrates,

There are many practical applications and uses that can be derived from the specificity of enzymes. The specificity of an enzyme in a metabolic pathway and the potential for its inhibition provide organisms with mechanisms for the control of metabolic pathways. Enzyme specificity is employed in hospitals and in industry for the analysis of single components of mixtures without need for their isolation; and also for the catalysis of single specific reactions. Inhibition of an enzyme is used as a tool for the study of its mechanism of catalysis and represents the mode of many pharmaceuticals. Much of the research done on enzymes involves the understanding of the role of enzymes in viral infections and in cancer.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Sung-Woo Cho for his assistance in proofreading the paper.

## REFERENCES

1. White, Abraham; Handler, Philip; Smith, Emil L.; Principles of Biochemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 1959.
2. Friedman, Paul Jay; Biochemistry; Little, Brown and Company; Boston, 1982.



## **ANEXO U**

Tradução – Especificidade do substrato da invertase e da amílase e a inibição da invertase



## Especificidade do substrato da invertase e da amilase e a inibição da invertase

Diego D. Viteri & Jeff Orlinsky

### RESUMO

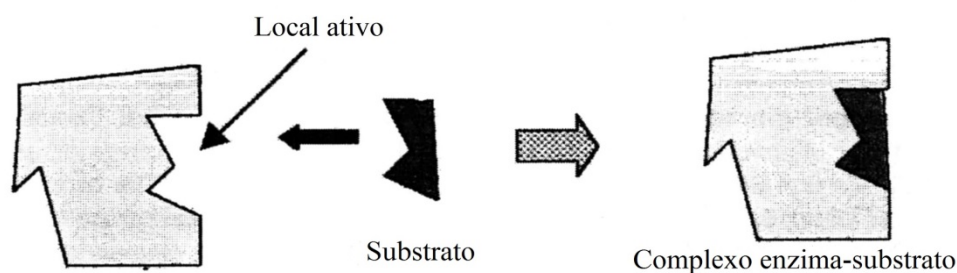
A especificidade das enzimas surge devido à sua capacidade de reconhecerem e de se ligarem a um substrato específico. Em alguns casos, as enzimas podem ligar-se a substâncias que não são substratos e, por conseguinte, tornam-se inibidas. Nesta experiência foi testada a especificidade e a inibição da invertase e da amilase, de forma a compreender a especificidade dessas duas enzimas relativamente a um determinado conjunto de substratos. Descobriu-se que a invertase apenas hidrolisou a sacarose, enquanto que os hidratos de carbono maltose, lactose e amido não foram hidrolisados. No caso da amilase, esta apenas hidrolisou o amido. O inibidor anilina limitou as ligações da invertase à sacarose. A conclusão evidente das experiências indica que a enzima invertase é específica para a sacarose, enquanto que a amilase é específica para o amido. O inibidor não-competitivo anilina limitou a ação da invertase na sacarose.

**Palavras-chave:** enzima, substrato, inibidor.

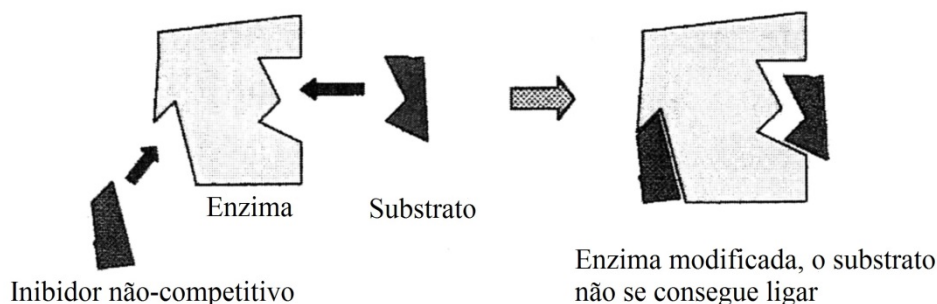
**Abreviaturas:** DNS, ácido dinitrosalicílico.

### INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas específicas para determinadas reações. A enzima atua numa substância a que se dá o nome de substrato. A enzima tem um local ativo com o qual os substratos interagem facilmente por causa do formato desse local. As enzimas são muito específicas relativamente a determinados substratos, o que significa que a enzima irá reagir apenas com substratos que se ajustem ao seu formato. No caso da invertase os substratos são compostos que contêm frutose, na forma de anel de furanose, em ligação com alguns compostos.



Em alguns casos, as enzimas podem ligar-se a substâncias que não são substratos. Desta forma, o local ativo da molécula de enzima pode ser bloqueado ou ficar deformado. Assim, a enzima torna-se inibida. Existem três tipos diferentes de inibidores: competitivo, não-competitivo e incompetitivo. Um inibidor não-competitivo, tal como aquele que é usado nesta experiência, liga-se à enzima num local longe do local ativo, mas altera a forma da enzima de tal forma que o local ativo deixa de ser funcional.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes

Os reagentes usados nesta experiência foram adquiridos à Kemtec Educational Corporation (West Chester, OH). Os tampões tampão I, tampão II, a glucose, a maltose, a lactose, a sacarose, o amido, a anilina, a invertase e o DNS foram preparados conforme indicado no protocolo *Vial Making* do kit enzimático. As tiras-reagentes foram utilizadas para detetar a atividade da invertase, através da medição da quantidade de glucose libertada dos hidratos de carbono. Cada tira foi utilizada apenas uma vez. A área de teste da tira foi mergulhada na solução e retirada imediatamente. Vinte segundos depois de se ter molhado a tira, observou-se a sua cor. Uma cor verde-escuro na ponta da tira mostrou que tinha ocorrido a hidrólise e, portanto, uma grande quantidade de glucose foi libertada a partir de um determinado hidrato de carbono. Uma cor verde-clara ou amarelo mostrou que a hidrólise não ocorreu e que pouca ou nenhuma glucose foi libertada durante a reação.

**Especificidade da invertase e da amílase.** Esta experiência consistiu em dois procedimentos distintos. No primeiro procedimento foram adicionadas 8 gotas (0,5 mL) de solução de invertase a quatro tubos de ensaio. A um dos tubos foram adicionadas 8 gotas de solução de sucrose; a outro, 8 gotas de solução de maltose; a um outro, 8 gotas de solução de lactose, e ao quarto tubo, 8 gotas de solução de amido. Após misturar cuidadosamente as soluções nos quatro tubos de ensaio, estes ficaram a uma temperatura ambiente durante 10 minutos. Cada solução nos tubos de ensaio foi testada com uma tira-reagente. Uma cor verde-escura mostrou que uma grande quantidade de glucose tinha sido libertada, enquanto uma cor verde-clara mostrou que tinha sido libertada uma pequena quantidade de glucose por hidrólise dos hidratos de carbono. Uma amostra de água destilada e uma amostra de solução de glucose foram testadas com tiras-reagente e usadas como controlo para as experiências.

No segundo procedimento, foram etiquetados quatro tubos de ensaio com as letras A, B, C e D. Foram adicionadas 8 gotas de invertase aos tubos de ensaio A e B e foram adicionadas 8 gotas de amílase aos tubos de ensaio C e D. Aos tubos de ensaio A e C foram adicionadas 8 gotas de sacarose, enquanto aos tubos B e D foram adicionadas 8 gotas de amido. As soluções nos tubos de ensaio foram homogeneizadas e deixadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. Cada tubo foi então testado com uma tira-reagente para detetar a libertação de glucose.

### Inibição da invertase

Para esta experiência etiquetaram-se cinco tubos de ensaio de 1 a 5. Foi adicionado tampão I ao tubo de ensaio 4 (8 gotas) e ao tubo de ensaio 5 (16 gotas). A cada um dos cinco tubos, foram adicionadas 8 gotas de sacarose e aos tubos 1, 2 e 3 foram



adicionadas 8 gotas de anilina 3 mM, 8 gotas de anilina 9 mM e 8 gotas de anilina 18 mM, respetivamente. Após a adição de tampão, substrato e anilina a cada tubo de ensaio, estes foram colocados a temperatura ambiente. A solução de enzima foi também colocada à temperatura ambiente, durante cerca de 5 minutos. Este compasso de espera a uma temperatura de incubação foi concebido para assegurar que a mistura das soluções de enzima e de substrato não resultasse numa alteração de temperatura, por se adicionarem solução fria de enzima a uma solução quente de substrato. Aos tubos de ensaio de 1 a 4 foram adicionadas 8 gotas de solução enzima. O período de incubação foi terminado pela adição de 16 gotas de DNS a cada tubo. A adição de DNS foi realizada na mesma sequência e no mesmo intervalo de tempo usado na adição da solução de enzima aos tubos para iniciar o ensaio.

Os tubos que continham o ensaio e o DNS foram colocados num banho de água a ferver, durante 10 minutos, tendo sido cobertos com papel de alumínio para minimizar a evaporação. Depois de estarem no banho de água, foram adicionadas 8 gotas de água destilada a cada tubo e registadas as observações.

Tabela 1		
Amostra	Reagente	Hidrólise (sim ou não)
Sacarose	Verde-claro	Sim
Maltose	Amarelo	Não
Lactose	Amarelo	Não
Amido	Amarelo	Não
Água	Amarelo	--
Glucose	Verde	--

## RESULTADOS

Foi possível determinar a especificidade destas duas enzimas, testando os efeitos da invertase e da amílase em determinados hidratos de carbono. Da mesma forma, foi possível testar os efeitos da inibição enzimática através da adição de anilina nas reações de hidrólise da invertase com certos hidratos de carbono. Os resultados da experiência 1 mostram que a enzima invertase apenas foi específica para a sacarose (Tabela 1). Isto significa que durante a reação da invertase com os outros hidratos de carbono, a enzima apenas foi capaz de hidrolisar a sacarose. No que diz respeito à maltose, à lactose e ao amido, não ocorreu hidrólise.

Na experiência 2 foi testada a especificidade da invertase e da amílase com os hidratos de carbono sacarose e amido (Tabela 2). No caso da invertase, esta hidrolisou a sacarose mas não o amido. Isto significa que os resultados obtidos foram os mesmos que os da experiência 1. Uma vez mais, a sacarose manifesta-se, mas não o amido. Por outro lado, a amílase foi específica apenas para o amido, tendo sido capaz de hidrolisar o amido mas não a sacarose.

Tabela 2		
Amostra	Cor da tira-reagente	Hidrólise (sim ou não)
Invertase e Sacarose (tubo A)	Verde-claro	Sim
Invertase e Amido (tubo B)	Amarelo	Não
Amílase e Sacarose (tubo C)	Verde-claro	Não
Amílase e Amido (tubo D)	Sim	Sim

Na experiência 3 foi usada a solução de DNS para medir a atividade da invertase. De forma a compreender como atuam os inibidores, é necessário medir a atividade enzimática pelo poder de redução da glucose e da frutose libertadas durante uma reação enzimática. Nos tubos de ensaio de 1 a 3, foram usadas três concentrações diferentes de anilina inibidora para testar os seus efeitos na invertase (tabela 3). Nesta experiência, o tubo 5 era um branco e, por conseguinte, tinha uma cor observável mínima. O tubo 4 era um padrão e tinha uma cor observável máxima. Depois do ensaio ter sido completado, foram comparadas as cores dos três tubos experimentais com as dos tubos controlo (tubos 4 e 5). Nos tubos de ensaio 1, 2 e 3, as cores das soluções tinham uma intensidade de cor menor que a da solução no tubo de ensaio 4 e maior que a da solução no tubo de ensaio 5. Dos três tubos de ensaio experimentais o tubo 1 tinha a maior intensidade de cor, seguido pelo tubo 2 e por último pelo tubo 3 com a menor intensidade de cor.

Tabela 3											
Tubo #	1	2	3	4	5						
Intensidade	+++	++	+	++++	+						
(+)			Indica a menor intensidade de cor			(++++)			Indica a maior intensidade de cor		

## DISCUSSÃO

A especificidade da invertase e da amílase foi determinada pela reação de alguns hidratos de carbono com estas duas enzimas. De forma semelhante, provou-se que a anilina é um inibidor da invertase. Na experiência 1 as provas mostraram que a invertase apenas foi específica para a sacarose. Não foi específica para a maltose, a lactose e o amido. Os resultados obtidos fazem sentido, porque os substratos da invertase são compostos conhecidos por conterem frutose não-substituída, na forma de anel de furanose, em ligação com alguns compostos. A sacarose é um dissacarídeo composto por frutose e glucose. A invertase foi específica para a sacarose, porque foi capaz de reconhecer o anel frutose, hidrolisar as ligações entre a frutose e a glucose e, por conseguinte, fazer com que ocorresse a hidrólise. Embora a maltose, a lactose e o amido contenham glucose, não têm qualquer frutose na sua composição. Por essa razão, a invertase não foi capaz de dividir os hidratos de carbono devido à falta do anel de frutose.

Na experiência 2, a amílase foi testada no amido e na sacarose para determinar se a enzima era específica para cada um desses dois componentes. Depois da experiência demonstrou-se que a amílase foi específica para o amido mas não para a sacarose. Uma vez mais os resultados fizeram sentido porque o amido é composto por amilose. As estruturas da amilose e da amílase são bastante semelhantes e é por isso que a amílase é capaz de reconhecer a amilose no amido, hidrolisar as ligações do hidrato de carbono e libertar as moléculas da glucose presentes no amido. A sacarose não tem amilose e é por isso que a amílase não é capaz de hidrolisar a sacarose.

Foram testados na experiência 3 os efeitos da anilina na invertase e foi descoberto que a anilina era um inibidor da enzima invertase. As provas disto são suportadas pelos resultados obtidos. Os dados reunidos são aceitáveis porque a intensidade de cor nos diferentes tubos de ensaio foram as esperadas. O tubo 4 continha uma solução padrão, que era constituído por invertase e sacarose, sem a anilina que atua como um inibidor. Por causa disso, a hidrólise ocorreu normalmente como foi provado pela cor castanho-escura produzida na reação. Todos os três tubos de ensaio experimentais tinham

intensidade de cor menores que a da solução no tubo de ensaio 4, porque continham o inibidor anilina. A anilina não permite que a invertase divida o amido devidamente, e é por isso que a intensidade de cor das soluções nos tubos experimentais não coincidia com a do tubo 4. Dos três tubos experimentais, o 1 tinha a maior intensidade de cor. Isto é aceitável, porque neste tubo a anilina adicionada tinha uma concentração de 3 mM, que é menor que a concentração de anilina nos tubos 2 e 3. Nesta concentração de anilina, a invertase ainda foi capaz de atuar no substrato, mas não com a eficiência apresentada no tubo 4, o qual não continha anilina. O tubo 2 tinha menor intensidade de cor que o tubo 1, porque o 2 tinha uma maior concentração de anilina. Isto significa que no tubo 2, a anilina impediu a atuação da enzima numa escala maior do que no tubo 1. A mesma lógica aplica-se ao tubo 3, que tinha uma maior concentração do que os tubos 1 e 2. A invertase foi inibida mais facilmente e a sacarose não foi dividida eficazmente, porque o tubo 3 tinha uma maior concentração de anilina.

## CONCLUSÃO

As enzimas são catalisadoras que atuam com evidente especificidade relativamente aos seus substratos.

Esta especificidade surge porque uma molécula de enzima tem um local de ligação que reconhece e liga o substrato. A especificidade assegurada é de importância essencial no controlo do metabolismo dos organismos vivos. Em alguns casos, as enzimas podem ligar-se a substâncias que não são os seus substratos. Quando isto acontece o local ativo da enzima pode ser bloqueado ou pode ficar deformado. Este processo é conhecido por inibição. O objetivo destas experiências era identificar se a invertase ou a amílase eram específicas para certos hidratos de carbono. De igual forma, foram testados os efeitos da anilina para identificar a sua inibição na invertase.

Os resultados são significativos porque foi descoberto que as enzimas são específicas de certos compostos. Isto significa que as enzimas apenas reconhecem aqueles substratos que conseguem “encaixar” no local ativo da enzima. Foi descoberto também que os inibidores, moléculas que não permitem que os substratos encaixem no local ativo, podem deformar as enzimas a impedir a sua atuação nos substratos.

Existem muitas aplicações e utilizações práticas que podem ser derivadas da especificidade das enzimas. A especificidade de uma enzima num trajeto metabólico e a sua capacidade de inibição proporcionam aos organismos mecanismos para o controlo de vias metabólicas. A especificidade enzimática é usada nos hospitais e na indústria para a análise de componentes simples de misturas sem ser preciso isolá-los; e também para a catálise de reações específicas simples. A inibição de uma enzima é usada como uma ferramenta para o estudo do seu mecanismo de catálise e representa o método usado por muitas farmacêuticas. Muita da investigação feita sobre enzimas envolve a compreensão do papel das enzimas em infeções virais e no cancro.

## AGRADECIMENTOS

Agradece-se a Sung-Woo Cho pela sua ajuda na revisão do protocolo.

## REFERÊNCIAS

1. White, Abraham; Handler, Philip; Smith, Emil L.; Principles of Biochemist, McGraw-Hill Book Company, New York, 19S9.
2. Friedman, Paul Jay; Biochemistry; Little, Brown and Company; Boston, 1982.



## **ANEXO V**

Texto 8 – Experiment no. 4 – Cellulose degradation



# EXPERIMENT NO. 4

## CELLULOSE DEGRADATION

*Prepared by*  
**Nam Sun Wang**  
Department of Chemical & Biomolecular Engineering  
University of Maryland  
College Park, MD 20742-2111  
ENCH485

---

### Table of Contents

- [Objectives](#)
  - [Introduction](#)
  - [List of Reagents and Instruments](#)
  - [Procedures](#)
  - [Discussions](#)
  - [Notes](#)
  - [Questions](#)
  - [References](#)
  - [Comments](#)
- 

### Objectives

To compare the enzymatic and acid hydrolysis of cellulose.

---

### Introduction

Currently, there are two major ways of converting cellulose to glucose: chemical versus enzymatic. The research on both methods has for decades occupied the attention of many investigators world wide. Because each cellulose molecule is an unbranched polymer of 1000 to 1 million D-glucose units, linked together with beta-1,4 glycosidic bonds, cellulose from various sources are all the same at the molecular level. However, they differ in the crystalline structures and bindings by other biochemicals. It is this difference that make possible a persistent research on cellulose. The model chemical compounds most commonly used in today's research are carboxymethyl cellulose (CMC), which has a generally amorphous structure, and Avicel, which has a highly crystalline structure. In this experiment, cellulose from a variety of sources will be subjected to depolymerization conditions.

There are two types of hydrogen bonds in cellulose molecules: those that form between the C<sub>3</sub> OH group and the oxygen in the pyranose ring within the same molecule and those that form between the C<sub>6</sub> OH group of one molecule and the oxygen of the

glucosidic bond of another molecule. Ordinarily, the beta-1,4 glycosidic bonds themselves are not too difficult to break. However, because of these hydrogen bonds, cellulose can form very tightly packed crystallites. These crystals are sometimes so tight that neither water nor enzyme can penetrate them; only *exoglucanase*, a subgroup of cellulase that attacks the terminal glucosidic bond, is effective in degrading it. The inability of water to penetrate cellulose also explains why crystalline cellulose is insoluble. On the other hand, amorphous cellulose allows the penetration of *endoglucanase*, another subgroup of cellulase that catalyzes the hydrolysis of internal bonds. The natural consequence of this difference in the crystalline structure is that the hydrolysis rate is much faster for amorphous cellulose than crystalline cellulose. The process of breaking the glucosidic bonds that hold the glucose basic units together to form a large cellulose molecule is called *hydrolysis* because a water molecule must be supplied to render each broken bond inactive. In addition to crystallinity, the chemical compounds surrounding the cellulose in plants, e.g. lignin, also limit the diffusion of the enzyme into the reaction sites and play an important role in determining the rate of hydrolysis. Sometimes, wood chips are pretreated with acid at approximately 160°C to strip hemicellulose and lignin before they are treated with an enzyme or a mixture of enzymes. In general, 20 to 70% yield of glucose can be expected after 24 hours.

The conversion of cellulose into glucose is now known to consist of two steps in the enzyme system of *Trichoderma viride*. In the first step, beta-1,4 glucanase breaks the glucosidic linkage to *cellobiose*, which is a glucose dimer with a beta-1,4 bond as opposed to maltose, a counterpart with an alpha-1,4 bond. Subsequently, this beta-1,4 glucosidic linkage is broken by beta-glucosidase:



The kinetics of cellulose hydrolysis has been widely studied, and Michaelis-Menten types of rate expressions with substrate or product inhibition terms have been proposed to describe the observed reaction kinetics.

A wide variety of fungal and bacterial species produce cellulase and transport the enzyme across the cell membrane to the outside environment. Although it is common to refer to a mixture of compounds that can degrade cellulose as cellulase, it is really composed of more than one distinctive enzymes. Recent research has shown that one of the components is relatively inert with the ability of recognizing and attaching itself to the surface of the cellulose mass, in addition to the ability of recognizing and holding onto another protein component that exhibits enzymatic activities. Thus, the chance of reaction is significantly enhanced by a proximity effect, because the active enzyme is held onto the surface of a solid substrate by an inert protein which acts as a glue.

The species most often used to study the production of cellulase are white-rot fungal cultures of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma viride*. We all have seen a piece of rotting wood. And perhaps without knowing it, we are actually quite accustomed to the appearance and action of this fungi. As in Experiment No. 1, it is only natural that the most promising place to search for cellulase is in a piece of rotting wood. The microorganisms responsible for this enzyme can easily be isolated from a piece of rotting wood, or from a termite's gut if bacterial species are desired. Other fungal species often used are *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, and *Cellulomonas* sp. The bacterial species *Clostridium thermocellum* and *Clostridium*



*thermosaccharolyticum* also represent promising candidates for cellulase production because they are thermophilic (less contamination problem and faster rate at a high temperature), anaerobic (no oxygen transfer limitation), and ethanologenic (conversion of cellulose to ethanol via glucose with a single culture). In general, different species of microorganisms produce different cellulolytic enzymes.

---

## List of Reagents and Instruments

### A. Equipment

- Erlenmeyer flasks
- Graduated cylinder
- Pipets, 1ml, 10ml
- Test tubes
- Incubator or thermostated shaker
- Temperature bath (or heat source -- Bunsen burner or hot plate)
- Thermometer
- Balance
- Syringe
- Filter holder
- Filter paper
- Spectrophotometer

### B. Reagents

- Cellulose source (filter paper, wood chips, carboxymethyl cellulose, cotton)
  - Cellulase, buffered at pH=5.00±0.01, 10g/l solution
  - HCl, 5% solution
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5% solution
  - KOH
  - Reagents for sugar analysis
- 

## Procedures

1. *Enzymatic Hydrolysis*: Repeat the same procedures for shredded wood chips (a complex and impure mixture of cellulose, lignin, and a variety of others), carboxymethyl cellulose (a model amorphous-structured cellulose), and cotton (90 % cellulose, mostly crystalline-structured). If time permits and if there is extra enzyme solution, try other sources of biomass and waste materials such as newsprint, grass, straw, and corn stalk. See Note 1.
  - Shred a 10 cm<sup>2</sup> piece of cellulose filter paper and weigh 0.1 g. (As opposed to other type of papers with binding materials, a piece of cellulose filter paper without wetting agents has minimum impurities and is almost pure in cellulose. The result of a quantitative analysis using a filter paper would have been very unreliable had impurities leached out into the filtrate.)

- Submerge the shredded paper in 10 ml of the buffered cellulase solution in a test tube. Note the starting time.
  - Incubate the mixture at 40°C. (The enzyme is most active at a temperature of 40°C and a pH of approx. 4.5.)
  - This reaction should last for approximately 24 hours. Take 1 ml samples at some predetermined appropriate intervals. Note that one does not have much to waste because the starting sample is small. (A volume of 1 ml is actually considered as a huge sample when working with biochemicals.)
  - Stop the hydrolysis reaction in the sample. The first method of stopping the reaction is to deprive the mixture of substrate. This can be easily achieved by filtering out the residual solid material from the solution. The individual samples may be stored frozen for later analysis. The samples are thawed and brought to room temperature before they are subjected to measurements. However, this first method is not applicable to soluble cellulose, e.g., CMC. Alternatively, the enzymatically catalyzed reactions can be halted either by adding a strong enzyme inhibitor or by raising the temperature of the mixture to 90°C for 5-10 minutes in a heated bath to inactivate the enzyme.
  - Measure the glucose concentrations of the samples with the dinitrosalicylate colorimetric method. (Reference: Gail Lorenz Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, **31**, 427, 1959.) See Note 2.
2. *Acid Hydrolysis (Sulfuric Acid)*: Use the same cellulose sources as in enzymatic hydrolysis.
- Add 0.2g cellulose to 10ml of 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in a lightly capped test tube. See Note 3. One may choose to carry out the reaction at 90°C instead of at room temperature.
  - This reaction should last for 2 hours. Take 1 ml samples at some predetermined appropriate intervals.
  - Stop the hydrolysis reaction in the sample by neutralizing the acid and slightly reversing the pH with the addition of a small volume of a concentrated potassium hydroxide solution. Make a quick calculation to see how much KOH is needed for this purpose. Note that one has to keep a close track of the volume of KOH solution added because this information will be needed to calculate the glucose concentration in the original undiluted sample.
  - Measure the glucose concentration of the alkaline sample.
3. *Acid Hydrolysis (Hydrochloric Acid)*: Substitute 5% sulfuric acid with 5% hydrochloric acid and repeat the same procedures as in sulfuric acid.

---

## Discussions

The most abundant organic compound on earth is cellulose, which provides the primary structural component for plants. (Chitin, present in insects, crustacean, and bones, is the second most abundant organic compound.) Like starch, cellulose is a polymer of glucose monomer units, linked together at the beta-1,4 locations as opposed to the alpha-1,4 locations for amylose (insoluble starch). Enzymes are generally extremely specific in their catalytic actions. They can recognize even the subtlest difference in the

substrate structure and often exhibit no measurable catalytic behavior toward other similarly structured substrates. The difference in the glucose linkage between starch and cellulose makes it impossible for the starch digesting enzymes, e.g. alpha-amylase, to break down cellulose. The direct consequence of this specificity is that various organisms, including humans, cannot use cellulose to satisfy their nutritional requirement for carbohydrates. However, some animals and insects, such as cattle, sheep, horses, termites, and caterpillars, can subsist on wood and grass, although they themselves do not produce cellulolytic enzymes. This is due to the synergistic effect of the bacteria present in their digestive tracts. These gut bacteria flora secrete the necessary cellulolytic enzymes to digest cellulose, and the hosts, in turn, provide them with a shelter as well as nutrient. The inability of most organisms in attacking cellulose is not necessarily undesirable. For example, wood, which is mostly cellulose bound together by lignin, has traditionally been used as building materials due to its relatively stable microscopic structures. Wouldn't it be terrible if your home could be digested by bugs too easily? Perhaps, that is why no one uses bread (starch material) or candy (easily digestible saccharides) to build a durable house except in fairy tales.

There has been a large amount of research work done on the digestion of cellulose into glucose. The generated glucose can be used to produce single cell protein as food for livestock or even for humans. Glucose can also be used as the starting raw material in the production of a wide variety of chemicals and fuels. This is usually carried out with the help of microorganisms. For example, glucose can be easily fermented to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) or *Pseudomonas mobilis* (bacterium). Ethanol can be used as gasoline or processed further to make other common petrochemicals. Another example is the conversion of glucose into solvents such as acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. Because the volume of cellulose is so overwhelming and because the resource is renewable, the world will likely to depend on it more heavily for food, fuel, chemical supplies, and raw materials in the future. It has the great potential of alleviating the need for petroleum, whose supply is fast dwindling.

Thus, the ability to manipulate this organic chemical has extremely important implications. A breakthrough in the investigation of cellulose digestion processes will not only have an enormous impact on the world food supply, economy, and geopolitical balance of power, it will also greatly influence the various types and ways products are produced by the chemical industry and enjoyed by the end users. This experiment introduces a student in biochemical engineering to one of tomorrow's technologies with the most far-reaching impacts.

As demonstrated in this experiment, the breaking down some of the cellulose is really not very difficult. However, translating a process from a laboratory scale to a commercial scale is not so trivial. First of all, the entire operation has to be *both* technically sound and economically feasible. In order for a process to be actually adapted, it, of course, has to be technically possible first. In addition, it must offer some clear advantage over all other competing processes. This advantage is almost always measured in the form of a larger profit margin, irrespective of the political system in which the process is to be employed. Note that in calculating the profit, one must duly include various costs that are sometimes not obvious nor easy to estimate, e.g. the public images, institutional responsibilities, and environmental impacts. Unprofitable processes are a waste of natural and human resources and must not survive. As a

chemical engineers, whether conducting basic research or designing a plant, one is continually reminded of the economical impact.

Two typical approaches to effect a similar end result are studied in this experiment. However, one should keep in mind that there are numerous other competing approaches, and one is constantly faced with multiple choices. For example, acetic acid can be produced by fermentation means or chemical synthesis. So are a wide range of pharmaceuticals. As a matter of fact, life is rarely simple and straight forward enough that there is only one choice.

---

## Notes

1. As in any other experiments, remember to include simultaneously a control experiment or a blank solution. An enzyme solution without any solid substrate can be used as one of the controls which will yield the level of glucose entrainment, if any, originally present in the enzyme preparation. This is especially important when one is unsure of the content of a complex solution. Furthermore, the result of enzymatic actions should be compared to another control experiment in which only water is added to the solid substrate. This second control will give the background leaching out of glucose from the substrate, if there is any at all. One should always guard against these possibilities.
  2. One needs to outline how to measure the glucose concentration with the dinitrosalicylate colorimetric method. The extent of disclosure of the procedures associated with a particular analytical method in science communication is commonly comparable to, if not less than, what is said in this manual. It is critical that the student learns how to read scientific literature and obtain the necessary information from it.
  3. Concentrated hydrochloric and sulfuric acids are among the most corrosive, dangerous chemicals. They are more so when heated. We all know how a splash of these acids can ruin one's clothing (cotton) and permanently and severely disfigure one's face. In an actual process, much more concentrated acids are used at even higher temperatures (180°C). Be sure to wear a pair of safety glasses to protect your eyes. Put on a lab coat or an apron to protect your expensive clothing. Thoroughly wipe up any chemical spill immediately before someone else puts his elbow over it.
  4. Other assay methods may be used to measure the reducing sugar concentration. When the substrate is soluble, viscosity measurements in lieu of sugar measurements may be used to indicate enzyme activities. When the substrate is insoluble, turbidity and weight loss are sometimes used as indicators of enzyme activities.
  5. The solution of commercially available cellulase can easily support the growth of molds and cannot be kept long at room temperature.
- 

## Questions

1. Based on sound engineering economics principles, you, as an engineer, now must make the choice between the two hydrolysis methods studied in this experiment. Justify your choice, preferably backed by a rough estimate for the unit cost associated with the glucose production. Compare this to the current market price of a related compound, say, sucrose (table sugar) or ethanol. (Make sure that your comparison is fair.) Is the proposed process profitable? What items or processing steps contribute significantly to the final cost? How can these costs be drastically reduced to make the process more attractive?
2. If you had the time and resources, what other experiments would you perform to reach better conclusions on the merits of acid hydrolysis versus an enzymatic one? %T and pH effects, percent acid used, source of enzyme, etc.
3. Is it possible to introduce a suitable bacterial flora into our intestinal tract so that we can digest grass as cattle do? If yes, why has it not been done to solve the problem of food shortage in some of the developing countries? If no, what makes it possible for cattle but not for humans?
4. With the help of better screening techniques and recombinant DNA technology, many scientists are actively engaged in the isolation/creation of a super bug that can digest lignocellulose at an extremely high rate. What are the potential damages if this organism is released to the outside environment? What safety features can a scientist deploy to minimize the impact of such an event that is certainly unavoidable if the organism is put to use in a large scale process?
5. Comment on ways to improve the experiment.

---

## References

1. Bailey, J.E. and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Ed., p163-172, McGraw-Hill, 1986.
2. Bertran, M.S. and Dale, B.E., Enzymatic hydrolysis and recrystallization behavior of initially amorphous cellulose, *Biotech. Bioeng.*, **27**, 177, 1985.
3. Linko, M., An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, in *Advances in Biochemical Engineering*, **5**, 39, 1977.
4. Ghose, T.K., Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances, in *Advances in Biochemical Engineering*, **6**, 25, 1977.
5. Grethlein, H.E., Comparison of the economics of acid and enzymatic hydrolysis of newsprint, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 503, 1978. Erickson, L.E., *Energetic efficiency of biomass and product formation*, *Biotech. Bioeng.*, **21**, 725, 1979.

---

Return to Prof. Nam Sun Wang's [Home Page](#)

Return to [Biochemical Engineering Laboratory \(ENCH485\)](#)

### **Cellulose Degradation**

Forward comments to:

**Nam Sun Wang**

Department of Chemical & Biomolecular Engineering

University of Maryland

College Park, MD 20742-2111

301-405-1910 (voice)

301-314-9126 (FAX)  
e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)

## **ANEXO W**

Tradução – Trabalho nº 1 – A degradação da celulose





# TRABALHO Nº 1

2

## A. DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

### Objectivos

Comparar a hidrólise enzimática da celulose, com a hidrólise ácida.

### Introdução

Existem actualmente duas formas principais de converter a celulose em glucose: a conversão química versus enzimática. A pesquisa acerca de ambos os métodos tem captado a atenção de muitos investigadores em todo o mundo. Devido ao facto de cada molécula de celulose ser um polímero não ramificado de 1000 para 1 milhão de unidades de D-glicose, ligadas por pontes glicosídicas  $\beta$ -1,4, a celulose proveniente de várias fontes é igual a nível molecular. Contudo, esta difere a nível das estruturas cristalinas e das pontes por outros bioquímicos. É esta diferença que torna as pesquisas acerca da celulose persistentes.

Os modelos dos compostos químicos mais frequentemente utilizados nas pesquisas actuais são a carboximetilcelulose (CMC), que possui uma estrutura geralmente amorfa, e Avicel, que possui uma estrutura altamente cristalina. Nesta experiência, a celulose proveniente de uma variedade de fontes será sujeita a condições de despolimerização.

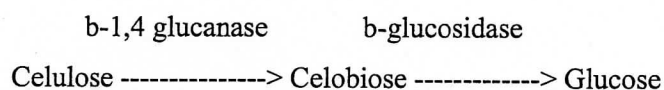
Até 24

As moléculas de celulose possuem dois tipos de pontes de hidrogénio: as que se formam entre o grupo  $C_3$  OH e a de oxigénio no anel piranose no interior da mesma molécula e as que se formam entre o grupo  $C_6$  OH de uma molécula e a molécula de oxigénio da ponte glicosídica de outra molécula. Geralmente, as pontes glicosídicas  $\beta$ -1,4 não são muito difíceis de quebrar entre elas. Contudo, devido a estas pontes de hidrogénio, a celulose pode formar micelas fortemente empacotadas. Estes cristais são, por vezes, tão apertados que nem a água ou uma enzima os consegue penetrar; apenas a *exoglucanase*, um subgrupo de celulase que ataca o terminal da ponte glucosídica, é eficaz na sua degradação. A incapacidade da água penetrar a celulose, também explica a razão pela qual a celulose cristalina é insolúvel. Por outro lado, a celulose amorfa permite a penetração por parte da *endoglucanase*, outro subgrupo da celulase que catalisa a hidrólise nas ligações internas. A consequência natural desta diferença na estrutura cristalina é o facto da taxa de hidrólise ser muito mais rápida no caso da celulose amorfa do que na celulose cristalina. O processo de quebrar as pontes glicosídicas que mantêm as unidades básicas da glucose juntas, para formar uma grande molécula de celulose é chamado de hidrólise. Isto devido a que a molécula de água deve ser fornecida para tornar inactiva cada ligação quebrada. Para além da cristalinidade, os compostos químicos

ver p. 18

que envolvem a celulose nas plantas, como por exemplo a lignina, também limitam a difusão da enzima para dentro do local de reacção e desempenham um papel importante para determinar a taxa de hidrólise. Por vezes, as aparas de madeira são pré-tratadas com ácido a aproximadamente 160°C de forma a retirar por completo a hemicelulose e a lignina, antes de serem tratadas com uma enzima ou com uma mistura de enzimas. Em geral, depois de 24 horas, pode esperar-se de 20 a 70% do rendimento de glucose.

A conversão da celulose em glucose é agora conhecida por basear-se em dois passos no sistema enzimático da *Trichoderma viride*. No primeiro passo, a  $\beta$ -1,4 glucanase quebra a ligação glicosídica em celobiose, que é um dímero com uma ligação  $\beta$ -1,4 em oposto à maltose, um equivalente com uma ligação  $\alpha$ -1,4. Subsequentemente, esta ligação  $\beta$ -1,4 é quebrada pela  $\beta$ -glucosidase:



A cinética de hidrólise da celulose tem sido extremamente estudada e os tipos de expressões de taxa Michaelis-Menten, com os termos de inibição do substrato ou do produto, têm sido propostos de forma a descrever a reacção cinética observada.

Uma grande variedade de espécies de fungos e bactérias produzem celulase e transportam a enzima através da membrana celular para o ambiente exterior. Embora seja comum dizer-se que a mistura de compostos que consegue degradar a celulose é a celulase esta é, na verdade, composta por mais do que uma enzima distinta. Pesquisas recentes demonstraram que um dos componentes é relativamente inerte com a capacidade de reconhecer e de se ligar à superfície da massa celulósica, para além da capacidade de reconhecer e fixar-se por cima de outro componente proteico que apresente actividades enzimáticas. Assim, a probabilidade de reacção é significativamente aumentada por um efeito de proximidade, devido a que a enzima activa é fixada à superfície de um substrato sólido por uma proteína inerte que actua como uma cola.

As espécies mais frequentemente utilizadas para o estudo da produção da celulase são as culturas de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma viride*, fungos da podridão branca. Já todos vimos um pedaço de madeira podre, e provavelmente sem saber, estamos, na verdade, bastante habituados à aparência e acção destes fungos. Como na experiência número 1, é lógico que o melhor lugar para se encontrar celulase é num pedaço de madeira podre. Os microorganismos responsáveis por esta enzima podem ser facilmente isolados de um pedaço de madeira podre, ou do intestino de uma térmita, caso se prefiram espécies bacterianas. Outras espécies de fungos frequentemente utilizadas são a *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, e *Cellulomonas* sp. As espécies bacterianas *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* também representam candidatas promissoras para a produção de celulase, já que estas são termofílicas (constituem um problema menor a nível de contaminação e uma taxa mais rápida a temperaturas elevadas), anaeróbicas (sem limitação de transferência de oxigénio) e

etanogénicas (conversão da celulose para etanol via glucose, apenas com uma cultura). No geral, as diferentes espécies de microorganismos produzem diferentes enzimas celulíticas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Equipamento e Reagentes

Frascos de Erlenmeyer

Proveta graduada

Pipetas, 1ml, 10ml

Tubos de ensaio

Incubador ou agitador termostático

Banho termostático (ou fonte de calor – Bico de Bunsen ou placa aquecedora)

Termómetro

Balança

Seringa

Porta-filtros

Papel-filtro

Espectrofotómetro

Fonte de celulose (papel-filtro, aparas de madeira, carboximetilcelulose, algodão)

Celulase, tampão a  $\text{pH}=5.00\pm 0.01$ , 10g/l de solução.

HCl, solução a 5%.

$\text{H}_2\text{SO}_4$ , solução a 5%.

KOH

Reagentes para análise do açúcar

## Procedimento

### 1. *Hidrólise Enzimática:*

Repita os mesmos procedimentos para as aparas de madeira trituradas (uma mistura complexa e impura de celulose, lignina, e uma variedade de outras), carboximetilcelulose (um modelo de celulose de estrutura amorfa), e algodão (90% de celulose, se possuir, sobretudo, uma estrutura cristalina). Se o tempo assim o permitir e se ainda houver solução enzimática extra, experimente outras fontes de biomassa e resíduos de materiais tais como papel de jornal, ervas e canas de milho. Cf. Nota 1.

Triture um pedaço de papel de filtro de celulose com 10cm<sup>2</sup> e com 0.1g. (Ao contrário dos outros tipos de papel com materiais de ligação, um pedaço de papel de filtro de celulose sem agentes de molhagem possui o mínimo de impurezas e é quase puro em celulose. O resultado de uma análise quantitativa usando um papel-filtro teria sido muito inexacto devido às impurezas que são retidas no filtro.

Submerja o papel triturado em 10ml de solução tampão de celulase num tubo de ensaio. Anote o tempo inicial. Coloque a mistura na incubadora a 40°C. (A enzima é mais activa à temperatura de 40°C e a um pH de aproximadamente 4.5.)

Esta reacção deve demorar aproximadamente 24 horas. Retire amostras de 1ml com intervalos de tempo determinados e apropriados. Note que não deve desperdiçar, visto que a amostra inicial já é pequena. (1ml de volume é, na verdade, considerada como uma amostra enorme quando se trata de bioquímica.) Pare a reacção de hidrólise na amostra. O primeiro método para impedir a reacção é privar a mistura de substrato. Isto pode conseguir-se facilmente filtrando os materiais residuais sólidos, retirando-os da solução. As amostras individuais podem ser conservadas no gelo para analisar mais tarde. As amostras são descongeladas de forma a ficarem à temperatura ambiente antes de serem sujeitas a medições. Contudo, o primeiro método não é aplicável à celulose solúvel, como por exemplo, à CMC. Em alternativa, as reacções catalizadas enzimaticamente podem ser paradas, tanto através da adição de um forte inibidor enzimático, como através do aumento da temperatura da mistura até aos 90°C, entre 5 a 10 minutos em água quente para tornar a enzima inactiva.

Meça as concentrações de glucose das amostras através do método de colorimétrico baseado em dinitrosalicilato. (Referência: Gail Lorenz Miller, *Utilização do reagente do ácido dinitrosalicílico para determinação do açúcar redutor*, *Química Analítica* 31, 427, 1959) cf. Nota 2.

2. *Hidrólise Ácida (Ácido Sulfúrico)*: Utilização das mesmas fontes de celulose utilizadas na Hidrólise Enzimática.

Adicione 0.2g de celulose a 10ml de solução  $H_2SO_4$  a 5% num tubo de ensaio levemente rolhado. Cf. Nota 3. Fica ao seu critério levar a cabo a reacção a  $90^\circ C$  em vez de ser à temperatura ambiente. Esta reacção deverá demorar 2 horas. Retire amostras de 1ml com intervalos de tempo determinados e apropriados. Pare a reacção de hidrólise na amostra através da neutralização do ácido e revertendo ligeiramente o pH através da adição de um pequeno volume de solução concentrada de hidróxido de potássio. Faça um breve cálculo de forma a saber quanto KOH é necessário para este objectivo. Note que terá de estar bem ciente acerca do volume da solução KOH adicionada, já que esta informação será necessária para calcular a concentração de glucose na amostra original não diluída. Meça a concentração de glucose da amostra alcalina.

3. *Hidrólise Ácida (Ácido Hidroclórico)*:

Substitua 5% de ácido sulfúrico por 5% de ácido hidroclórico e repita os mesmos procedimentos dos adoptados para o ácido sulfúrico.

**Pontos a discutir no relatório:**

O composto orgânico mais abundante na terra é a celulose, que fornece às plantas o componente estrutural primário. (A quitina, presente nos insectos, crustáceos e ossos, é o segundo composto orgânico mais abundante). Tal como o amido, a celulose é um polímero de unidades monoméricas de glucose, ligadas entre si por ligações  $\beta \rightarrow 1,4$  em oposto à ligação  $\alpha \rightarrow 1,4$  para a amilose (amido insolúvel). As enzimas são, no geral, extremamente específicas quanto às suas acções catalíticas. Estas podem reconhecer até a mais ínfima das diferenças na estrutura do substrato e muitas vezes não exibem qualquer comportamento catalítico em relação a outros substratos estruturados de forma similar. A diferença entre as ligações de glucose do amido e da celulose faz com que seja impossível às enzimas de digestão do amido, como por exemplo a  $\alpha$ -amilase, decompor a celulose. A consequência directa desta particularidade é que vários organismos, incluindo humanos, não podem utilizar a celulose para satisfazer as suas necessidades nutricionais de hidratos de carbono.

Contudo, muitos animais e insectos tais como gado, ovelhas, cavalos, térmitas e lagartas podem subsistir através de madeira e erva, embora estes não produzam enzimas celulíticas. Isto deve-se ao efeito sinérgico das bactérias que se encontram nos seus <sup>estômagos</sup> tractos digestivos. Esta flora bacteriana presente no intestino segrega as enzimas celulíticas necessárias para digerir a celulose e os hospedeiros, por sua vez, oferecem-lhes abrigo e nutrientes. A incapacidade da maioria dos organismos de atacar a celulose não é

necessariamente indesejável. Por exemplo, a madeira que é maioritariamente <sup>celulose</sup> ligada por lignina tem sido usada, tradicionalmente, como material de construção devido às suas estruturas microscópicas relativamente estáveis. Não seria terrível se a sua casa pudesse ser digerida por insectos assim tão facilmente? Talvez, por isso é que ninguém utiliza pão (material de amido) ou doces (sacarídeos facilmente digeríveis) para construir uma casa resistente, excepto nos contos de fadas. ←

Existe uma grande quantidade de trabalhos de pesquisa acerca da digestão da celulose para a transformar em glucose. A glucose produzida pode ser utilizada para produzir uma única célula de proteína para alimentar gado ou até os humanos. A glucose pode também ser utilizada como matéria-prima inicial na produção de uma grande variedade de químicos e combustíveis, o que é normalmente levado a cabo com a ajuda de microorganismos. Por exemplo a glucose, pode ser facilmente fermentada para formar etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) ou pela *Pseudomonas mobilis* (bactéria). O etanol pode ser utilizado como gasolina ou posteriormente processado para fabricar outros petroquímicos comuns. Outro exemplo é a conversão de glucose noutros solventes tais como a acetona e o butanol através da *Clostridium acetobutylicum*. Devido ao facto do volume da celulose ser tão excessivo e sendo uma fonte renovável, o mundo irá provavelmente depender da celulose mais fortemente para alimento, combustível, reservas químicas e matérias primas no futuro. A celulose apresenta um grande potencial para diminuir a necessidade de petróleo, cuja reserva está a diminuir rapidamente.

Deste modo a capacidade de manipular este químico orgânico possui implicações extremamente importantes. Um avanço na investigação acerca dos processos de digestão da celulose não terão somente um enorme impacto nas reservas de alimento mundiais, economia, e balanço geopolítico de poder, mas terá também uma grande influência nos vários tipos e formas como os produtos são produzidos, <sup>pela</sup> com ajuda da indústria química e usufruída <sup>os</sup> pelos utilizadores finais. Esta experiência apresenta ao estudante de engenharia bioquímica, uma das tecnologias futuras com impactos de grande alcance. ←

Como se demonstra nesta experiência, a decomposição das várias celulosas não é muito difícil. Contudo, a conversão do processo de uma escala laboratorial para a escala comercial não é assim tão banal. Em primeiro lugar, toda a operação tem de fazer sentido tecnicamente e de ser economicamente realizável. É claro que, de forma a um processo ser efectivamente adaptado, este tem de, em primeiro lugar, ser tecnicamente possível. Além disto, deve oferecer uma clara vantagem sobre todos os outros processos concorrentes. Esta vantagem é quase sempre medida na forma de uma grande margem de benefício, independentemente do sistema político no qual o processo será empregue. É de notar que ao calcular-se o benefício, devem incluir-se devidamente os vários custos, que por vezes nem são óbvios nem fáceis de estimar, como por exemplo as imagens públicas, as responsabilidades institucionais e os impactos ambientais. Os processos não rentáveis são uma perda de recursos naturais e humanos e não deverão subsistir. Como <sup>Tudo o</sup> qualquer engenheiro químico, quer <sup>esteja a realizar</sup> este organize uma pesquisa básica, quer desenhe uma planta, <sup>for sempre em atenção a</sup> deverá ser continuamente lembrado acerca do impacto económico. <sup>planear esta a desenhar a</sup>

de uma instalação  
fabril

Nesta experiência são estudadas duas abordagens típicas para se chegar a um resultado final similar. Contudo, deve <sup>mo</sup> estar ciente <sup>a ser confrontados com</sup> que existem muitas outras propostas concorrentes e <sup>atalmos</sup> que cada uma é constantemente ~~enfrentada~~ por múltiplas escolhas. Por exemplo, o ácido acético pode ser produzido através de processos de fermentação ou através da síntese química. Na verdade a vida raramente é simples e recta o suficiente para que exista somente uma escolha.

Mad  
trador

So are a wide range  
of pharmaceuticals

## Notas

1. Como em qualquer outra experiência, lembre-se de incluir simultaneamente uma experiência de controlo e uma solução neutra. Uma solução de enzima sem qualquer substrato sólido pode ser usada como um dos controlos que irão fornecer o nível de indução da glucose, caso exista algum, originalmente presente na preparação enzimática. Este facto é particularmente importante quando não se tem a certeza do conteúdo de uma solução complexa. Além disso, o resultado de acções enzimáticas deve ser comparado com outra experiência de controlo na qual apenas água é adicionada ao substrato sólido. Este segundo controlo fará filtração, separando a glucose do substrato, caso ainda exista algum. Deve existir sempre alguma protecção contra estas possibilidades.
2. É necessário definir maneiras de medir a concentração de glucose utilizando o método colorimétrico baseado em dinitrosalicilato. A dimensão da revelação dos procedimentos associados a um método particular analítico em ciências da comunicação é comumente comparável a, se não menor, do que é dito neste manual. Torna-se crucial que o aluno aprenda como ler literatura científica e dela obtenha a informação necessária.
3. Os ácidos hidroclórico e sulfúrico concentrados estão entre os químicos mais corrosivos e perigosos. E ainda mais quando aquecidos. Todos sabemos como um salpico destes ácidos pode destruir roupas (algodão) e desfigurar de forma grave e permanente <sup>os olhos de alguém.</sup> a sua cara. Num processo real, são utilizados muitos mais ácidos a temperaturas ainda mais elevadas (180°C). Utilize sempre um par de óculos de segurança para proteger os seus olhos.
4. Vista uma bata ou um avental para proteger as suas roupas. Limpe imediata e cuidadosamente qualquer químico derramado antes que alguém coloque o cotovelo em cima.
5. Podem ser utilizados outros métodos de análise para medir a diminuição da concentração de açúcar. Quando o substrato é solúvel podem ser utilizadas medições da viscosidade em vez de medições do açúcar para indicar as actividades enzimáticas. Caso o substrato seja insolúvel, a turvação e a perda de peso são, por vezes, usadas como indicadores das actividades enzimáticas.
6. A solução de celulase disponível comercialmente pode suportar facilmente o crescimento de bolores e não pode ser mantida por muito tempo à temperatura ambiente.

## Questionário

1. Com base nos princípios de Engenharia Económica, como engenheiro, deverá agora fazer a escolha entre os dois métodos de hidrólise estudados nesta experiência. Justifique a sua escolha, baseando-se preferencialmente num cálculo aproximado para o custo unitário associado à produção de glucose. Compare (este cálculo) com o preço do mercado actual de um composto relacionado, como por exemplo a sacarose (açúcar de mesa) ou etanol. (Certifique-se que a sua comparação é feita correctamente). O processo proposto é vantajoso? Que itens ou passos do processo contribuem significativamente para o custo final? Quanto podem ser reduzidos os custos drasticamente de forma a tornar o processo mais atractivo?
2. Se tivesse tempo e recursos, que outras experiências iria fazer para alcançar conclusões melhores acerca dos méritos da hidrólise ácida versus hidrólise enzimática? Resultados da %T e pH, percentagem de ácido usada, fonte da enzima, etc.
3. É possível introduzir flora bacteriana apropriada no nosso tracto intestinal de forma a que este possa digerir erva, como o gado? Se sim, porque é que ainda não se utilizou este método para resolver a escassez de alimentos em alguns dos países em desenvolvimento? Se não, porque razão é possível para o gado e não para nós humanos?
4. Com a ajuda de técnicas mais avançadas de varrimento da tecnologia do ADN recombinante, muitos cientistas estão activamente empenhados na criação de um “super bug” que possa digerir linho-celulose a uma taxa extremamente elevada. Quais os potenciais danos que este organismo causará, caso seja libertado para o ambiente exterior? Que medidas de segurança pode um cientista adoptar de forma a minimizar o impacto de tal acontecimento que é certamente inevitável, caso o organismo seja utilizado num processo em larga escala?
5. Comente acerca de formas de melhorar a experiência.

## Bibliografia

1. Bailey, J.E. and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Ed., p163-172, McGraw-Hill, 1986.
2. Bertran, M.S. and Dale, B.E., Enzymatic hydrolysis and recrystallization behavior of initially amorphous cellulose, *Biotech. Bioeng.*, **27**, 177, 1985.
3. Linko, M., An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, in *Advances in Biochemical Engineering*, **5**, 39, 1977.
4. Ghose, T.K., Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances, in *Advances in Biochemical Engineering*, **6**, 25, 1977.
5. Grethlein, H.E., Comparison of the economics of acid and enzymatic hydrolysis of newsprint, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 503, 1978. Erickson, L.E., *Energetic efficiency of biomass and product formation*, *Biotech. Bioeng.*, **21**, 725, 1979.



## **ANEXO X**

Revisão – Protocolo nº 4 – Degradação da celulose



# PROTOCOLO Nº 4

## DEGRADAÇÃO DA CELULOSE

*Preparado por*

**Nam Sun Wang**

Department of Chemical & Biomolecular Engineering

University of Maryland

College Park, MD 20742-2111

ENCH485

---

### Tabela de conteúdos

- [Objetivos](#)
  - [Introdução](#)
  - [Lista de reagentes e instrumentação](#)
  - [Procedimentos](#)
  - [Discussão](#)
  - [Notas](#)
  - [Questões](#)
  - [Referências](#)
  - [Comentários](#)
- 

### Objetivos

Comparar a hidrólise enzimática da celulose com a hidrólise ácida.

---

### Introdução

Atualmente existem duas formas principais de converter a celulose em glucose: a conversão química *versus* a enzimática. Há várias décadas que a pesquisa sobre ambos os métodos tem atraído a atenção de muitos investigadores em todo o mundo. A celulose proveniente de diferentes fontes é a mesma a nível molecular, porque cada molécula de celulose é um polímero não ramificado de 1.000 a 1 milhão de unidades de D-glucose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Contudo, estas diferem entre si na estrutura cristalina e nas ligações com outras moléculas bioquímicas. É devido a esta diferença que a constante pesquisa sobre celulose é tão contínua. Os compostos químicos modelo mais frequentemente utilizados na investigação são a carboximetilcelulose (CMC), que, em geral, possui uma estrutura amorfa, e a Avicel, que possui uma estrutura altamente cristalina. Nesta experiência a celulose proveniente de várias fontes será submetida a condições de despolimerização.

Existem dois tipos de ligação de hidrogénio nas moléculas de celulose: as que se formam entre o grupo  $C_3OH$  e o oxigénio no anel de piranose na mesma molécula, e as que se formam entre o grupo  $C_6OH$  de uma molécula e o oxigénio da ligação glicosídica de outra molécula. De um modo geral, as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 não são muito difíceis de quebrar. Contudo, a celulose pode

formar cristalitos muito densos devido a essas ligações de hidrogénio. Estes cristais estão, por vezes, tão compactados que nem a água nem as enzimas os conseguem penetrar; apenas a *exoglucanase*, um subgrupo das celulases ataca a ligação glicosídica terminais, é eficaz na degradação dos cristais. A incapacidade da água penetrar a celulose explica também o porquê da celulose cristalina ser insolúvel. Por outro lado, a celulose amorfa permite a penetração da *endoglucanase*, outro subgrupo das celulases que catalisa a hidrólise das ligações internas. A consequência natural desta diferença na estrutura cristalina é o facto da velocidade de hidrólise ser muito mais rápida na celulose amorfa do que na celulose cristalina. O processo de quebra das ligações glicosídicas, que mantêm as unidades básicas da glucose juntas de modo a formarem uma molécula de celulose maior, tem o nome de hidrólise, porque é necessário fornecer uma molécula de água para inativar cada ligação quebrada. Para além da cristalinidade, os compostos químicos que envolvem a celulose nas plantas, como por exemplo a lignina, também limitam a difusão da enzima para os locais de reação e desempenham um papel importante na determinação da velocidade de hidrólise. Por vezes, as aparas de madeira são pré-tratadas com ácido, a aproximadamente 160 °C, para se remover completamente a hemicelulose e a lignina, antes de serem tratadas com uma enzima ou com uma mistura de enzimas. Em geral, pode esperar-se 20 a 70% do rendimento na obtenção de glucose, após 24 horas de reação.

Sabe-se atualmente que a conversão da celulose em glucose é efetuada em dois passos no sistema enzimático da *Trichoderma viride*. No primeiro passo, a  $\beta$ -1,4 glucanase quebra a ligação glicosídica em *celobiose*, que é um dímero da glucose com uma ligação  $\beta$ -1,4, contrariamente à maltose que é equivalente mas com uma ligação  $\alpha$ -1,4. Subsequentemente, esta ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 é quebrada pela  $\beta$ -glucosidase:



A cinética da hidrólise da celulose tem sido amplamente estudada e têm sido propostas as expressões da velocidade do tipo Michaelis-Menten, que incluem termos de inibição de substrato ou de produto, de forma a descreverem a cinética da reação observada.

Uma grande variedade de espécies de fungos e de bactérias produzem celulase e transportam esta enzima através da membrana celular para o ambiente exterior. Embora seja comum dizer-se que uma mistura de compostos que consegue degradar a celulose é uma celulase, esta é, na verdade, composta por mais do que uma enzima distinta. Pesquisas recentes demonstraram que um dos componentes desta mistura é relativamente inerte quanto à capacidade de reconhecer e de se ligar a superfície da massa da celulose, para além da capacidade de reconhecer e de se fixar a outro componente proteico que apresente atividade enzimática. Assim, a probabilidade de reação aumenta significativamente por um efeito de proximidade, porque a enzima ativa fixa-se à superfície de um substrato sólido, através de uma proteína inerte que atua como “cola”.

As espécies mais frequentemente utilizadas para estudar a produção da celulase são as culturas de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma viride*, fungos de “podridão branca”. Já todos vimos um pedaço de madeira apodrecida e, provavelmente sem saber, estamos bastante habituados à aparência e à ação destes fungos. Tal como no protocolo nº 1, é lógico que o melhor lugar para se encontrar celulase é num pedaço de madeira podre. Os microrganismos responsáveis por esta enzima podem ser facilmente isolados a partir de um pedaço de madeira podre, ou do intestino de uma térmita, caso se pretendam espécies bacterianas. Outras espécies de fungos frequentemente utilizadas são a *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*

*funicolsum*, e *Cellulomonas* sp. As espécies bacterianas *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* também se apresentam como candidatas promissoras para a produção de celulase, uma vez que são termofílicas (apresentam menores problemas de contaminação e maior velocidade de produção a temperaturas elevadas), anaeróbicas (sem limitação de transferência de oxigênio) e etanológicas (conversão da celulose em etanol via glucose com apenas uma cultura). No geral, espécies diferentes de microrganismos produzem também enzimas celulósicas diferentes.

---

## Lista de reagentes e instrumentação

### A. Equipamento

- Balões de vidro Erlenmeyer
- Proveta graduada
- Pipetas, 1 mL, 10 mL
- Tubos de ensaio
- Incubadora ou agitador termostatizado
- Banho termostatizado (ou fonte de calor – bico de Bunsen ou placa de aquecimento)
- Termómetro
- Balança
- Seringa
- Porta-filtros
- Papel de filtro
- Espectrofotómetro

### B. Reagentes

- Fonte de celulose (papel de filtro, aparas de madeira, carboximetilcelulose, algodão)
  - Celulase, tampão a pH=5,00±0,01, 10 g/L solução
  - HCl, solução a 5%
  - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solução a 5%
  - KOH
  - Reagentes para análise de açúcares
- 

## Procedimentos

1. *Hidrólise enzimática*: Repita os mesmos procedimentos para as aparas de madeira trituradas (uma mistura complexa e impura de celulose, lignina, e uma variedade de outras), carboximetilcelulose (um modelo da celulose de estrutura amorfa), e algodão (90% de celulose, maioritariamente com estrutura cristalina). Se houver tempo disponível, e se houver uma solução enzimática extra, experimente outras fontes de biomassa e de resíduos de materiais, tais como papel de jornal, ervas, palha e canas de milho. Ver Nota 1.
  - Triture um pedaço de papel de filtro de celulose com 10 cm<sup>2</sup> e com 0,1 g. (Um pedaço de papel de filtro de celulose sem agentes molhantes tem um mínimo de impurezas e é quase puro em celulose, contrariamente a outros tipos de papel com materiais de ligação. O resultado de uma análise quantitativa utilizando um papel de filtro teria sido muito inexato, devido às impurezas que são retidas no filtro.

- Submerja o papel triturado em 10 mL de solução tampão de celulase num tubo de ensaio. Anote o tempo inicial.
  - Incube a mistura a 40 °C. (A enzima é mais ativa à temperatura de 40 °C e a um pH de aproximadamente 4,5).
  - Esta reação deve demorar aproximadamente 24 horas. Retire amostras de 1 mL em intervalos de tempo adequados, determinados previamente. Evite desperdícios, porque a amostra inicial é pequena (na verdade, o volume de 1 mL é considerado uma amostra enorme quando se trabalha com materiais bioquímicos).
  - Pare a reação de hidrólise na amostra. O primeiro método de interrupção da reação é privar a mistura de substrato. Isto pode ser facilmente alcançado filtrando da solução os materiais sólidos residuais da solução. As amostras individuais podem ser armazenadas congeladas para análise posterior. As amostras devem ser descongeladas até à temperatura ambiente, antes de serem sujeitas a medições. Contudo, o primeiro método não é aplicável à celulose solúvel, como por exemplo, à CMC. Em alternativa, as reações catalisadas enzimaticamente podem ser interrompidas, quer pela adição de um inibidor enzimático forte, quer aumentando a temperatura da mistura até aos 90 °C, colocando-a 5 a 10 minutos num banho quente, de modo a tomar a enzima inativa.
  - Meça as concentrações de glucose das amostras pelo método colorimétrico com ácido dinitrosalicílico (Referência: Gail Lorenz Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 427, 1959.) Ver Nota 2.
2. *Hidrólise ácida (ácido sulfúrico)*: Utilize as mesmas fontes de celulose que usou na hidrólise enzimática.
- Adicione 0,2 g de celulose a 10 mL de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5% num tubo de ensaio “levemente rolhado”. Ver Nota 3. Fica ao seu critério efetuar a reação a 90 °C ou à temperatura ambiente.
  - Esta reação deverá demorar 2 horas. Retire amostras de 1 mL em intervalos de tempo adequados, determinados previamente.
  - Pare a reação de hidrólise na amostra neutralizando o ácido, e revertendo ligeiramente o pH por adição de um pequeno volume de solução concentrada de hidróxido de potássio. Faça um cálculo rápido para saber a quantidade de KOH necessária para este efeito. Tome nota do volume de solução KOH adicionada, uma vez que essa informação será necessária para calcular a concentração de glucose na amostra original não diluída.
  - Meça a concentração de glucose da amostra alcalina.
3. *Hidrólise ácida (ácido clorídrico)*: Substitua ácido sulfúrico a 5% por ácido clorídrico a 5% e repita o mesmo procedimento efetuado com o ácido sulfúrico.

## Discussão

O composto orgânico mais abundante na terra é a celulose, a qual fornece o componente estrutural primário às plantas. (A quitina, presente nos insetos, crustáceos e ossos, é o segundo composto orgânico mais abundante). Tal como o amido, a celulose é um polímero de unidades monoméricas de glucose, ligadas entre si nos locais  $\beta$ -1,4 em contraste com os locais  $\alpha$ -1,4 para a amilose (amido insolúvel). No geral, as enzimas são extremamente específicas quanto às suas ações catalíticas. Estas podem reconhecer até a mais ínfima diferença na estrutura do substrato e

frequentemente não exibem qualquer comportamento catalítico em relação a outros substratos estruturados de forma similar. A diferença nas ligações de glucose entre o amido e a celulose torna impossível a digestão de enzimas pelo amido, por exemplo a  $\alpha$ -amilase, decompor a celulose. A consequência direta desta especificidade é que vários organismos, incluindo humanos, não podem utilizar a celulose para satisfazer as suas necessidades nutricionais de hidratos de carbono. Contudo, alguns animais e insetos tais como bovinos, ovelhas, cavalos, térmitas e lagartas podem viver de madeira e erva, embora não produzam enzimas celulolíticas. Isto deve-se ao efeito sinérgico das bactérias presentes nos seus tratos digestivos. Esta flora bacteriana, presente no intestino, segrega enzimas celulolíticas necessárias para digerir a celulose, e os hospedeiros, por sua vez, oferecem-lhes abrigo e nutrientes. A incapacidade da maioria dos organismos de atacar a celulose não é necessariamente indesejável. Por exemplo, a madeira, que é maioritariamente celulose ligada por lignina, tem sido usada, tradicionalmente, como material de construção devido as suas estruturas microscópicas relativamente estáveis. Não seria terrível se a sua casa pudesse ser digerida por insetos assim tão facilmente? Talvez por isso é que ninguém utiliza pão (material de amido) ou doces (sacarídeos facilmente digeríveis) para construir uma casa resistente, exceto nos contos de fada.

Existe uma grande quantidade de trabalho de pesquisa sobre a digestão da celulose para a transformar em glucose. A glucose originada pode ser utilizada para produzir uma única célula de proteína como alimento para o gado ou até para os humanos. A glucose pode também ser utilizada como matéria-prima na produção de uma grande variedade de químicos e combustíveis, efetuados normalmente com a ajuda de microrganismos. Por exemplo, a glucose pode ser facilmente fermentada para formar etanol pela *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) ou pela *Pseudomonas mobilis* (bactéria). O etanol pode ser utilizado como gasolina ou posteriormente processado para fabricar outros petroquímicos comuns. Outro exemplo é a conversão de glucose noutros solventes tais como a acetona e o butanol pela *Clostridium acetobutylicum*. Provavelmente o mundo irá depender da celulose para alimento, combustível, reservas químicas e matérias-primas no futuro, por causa do volume da celulose ser tão excessivo e por se tratar de uma fonte renovável. A celulose apresenta um grande potencial para diminuir a necessidade de petróleo, cuja reserva está a diminuir rapidamente.

Portanto, a capacidade de manipular este químico orgânico tem implicações extremamente importantes. Um avanço na investigação sobre processos de digestão da celulose não terá somente um enorme impacto nas reservas de alimento mundiais, na economia e no balanço de poder geopolítico, mas também terá uma grande influência nos vários tipos e formas de produção de produtos pela indústria química e usufruídos pelos utilizadores finais. Esta experiência apresenta, ao estudante de engenharia bioquímica, umas das tecnologias futuras com impactos de grande alcance.

Como se demonstra nesta experiência, a decomposição de várias celulosas não é muito difícil. Contudo, a conversão de um processo de escala laboratorial para uma escala comercial não é assim tão banal. Em primeiro lugar, toda a operação tem de ser técnica e economicamente exequível. É claro que para um processo ser efetivamente adaptado, este tem de, em primeiro lugar, ser tecnicamente possível. Além disso, deve oferecer uma clara vantagem sobre todos os outros processos concorrentes. Esta vantagem é quase sempre medida na forma de uma grande margem de lucro, independentemente do sistema político no qual o processo será empregue. Repare que ao calcular o lucro, devem incluir-se os vários custos que por vezes não são óbvios nem fáceis de estimar como por exemplo as imagens públicas, as responsabilidades institucionais e os impactos

ambientais. Os processos não lucrativos são uma perda de recursos naturais e humanos e não devem subsistir. Todo o engenheiro químico, quer esteja a realizar uma pesquisa básica, quer esteja a desenhar a planta de um imóvel, deverá ter sempre em atenção o impacto ambiental.

Nesta experiência são estudadas duas abordagens típicas para se chegar a um resultado final similar. Contudo devemos estar cientes que existem muitas outras propostas concorrentes e estamos constantemente a ser confrontados com múltiplas escolhas. Por exemplo, o ácido acético pode ser produzido por processos de fermentação ou através da síntese química. Assim como a produção de uma grande variedade de fármacos. Na verdade, a vida raramente é simples e de sentido único para que exista apenas uma escolha.

---

## Notas

1. Como em qualquer outra experiência, lembre-se de incluir simultaneamente uma experiência controlo ou uma solução branco. Pode ser usada uma solução de enzima sem qualquer substrato sólido para um dos controlos, que irá fornecer o nível de indução de glucose, caso exista algum, originalmente presente na preparação enzimática. Este facto é particularmente importante quando não se tem a certeza do conteúdo de uma solução complexa. Além disso, o resultado de ações enzimáticas deve ser comparado com outra experiência de controlo na qual apenas é adicionada água ao substrato sólido. Este segundo controlo irá fazer uma filtração, separando a glucose do substrato, caso ainda exista algum. Deve existir sempre alguma proteção contra estas possibilidades.
  2. É necessário definir maneiras de medir a concentração de glucose utilizando o método colorimétrico com ácido dinitrosalicílico. A dimensão da revelação dos procedimentos associados a um método analítico particular em ciências da comunicação é comumente comparável a, se não menos, do que é dito neste manual. É crucial que o aluno aprenda a ler literatura científica e dela obtenha a informação necessária.
  3. Os ácidos clorídrico e sulfúrico concentrados estão entre os químicos mais corrosivos e perigosos. E ainda mais quando aquecidos. Todos sabemos como um salpico destes ácidos pode estragar roupas (algodão) e desfigurar de forma grave e permanente o rosto de alguém. Num processo real são utilizados muitos mais ácidos concentrados a temperaturas ainda mais elevadas (180 °C). Utilize sempre um par de óculos de segurança para proteger os seus olhos. Vista uma bata ou um avental para proteger as suas roupas caras. Limpe imediata e cuidadosamente qualquer salpico químico antes que alguém coloque o cotovelo em cima.
  4. Podem ser utilizados outros métodos de análise para medir a diminuição da concentração de açúcar. Quando o substrato é solúvel, podem ser utilizadas medições de viscosidade em vez de medições de açúcar para indicar as atividades enzimáticas. Quando o substrato é insolúvel, são por vezes utilizadas a turvação e a perda de peso como indicadores de atividades enzimáticas.
  5. A solução de celulase disponível comercialmente pode suportar facilmente o crescimento de bolores e não pode ser mantida durante muito tempo à temperatura ambiente.
- 

## Questões



1. Com base nos princípios de engenharia económica, como engenheiro que é, deve fazer agora a escolha entre os dois métodos de hidrólise estudados nesta experiência. Justifique a sua escolha baseando-se preferencialmente num cálculo aproximado do custo unitário associado à produção de glucose. Compare esse cálculo com o preço do mercado atual de um composto relacionado, como por exemplo a sacarose (açúcar de mesa) ou etanol. (Certifique-se que a sua comparação é correta). O processo proposto é vantajoso? Que itens ou passos do processo contribuem significativamente para o custo final? Como podem ser drasticamente reduzidos os custos para tornar o processo mais atrativo?
  2. Se tivesse tempo e recursos, que outras experiências iria fazer para alcançar conclusões melhores nos valores de hidrólise ácida *versus* hidrólise enzimática? Resultados da % T e pH, percentagem de ácido usada, fonte da enzima, etc.
  3. É possível introduzir uma flora bacteriana apropriada no nosso trato intestinal para que possamos digerir erva, como o gado faz? Se sim, porque é que ainda não foi feito para resolver a escassez de alimentos em alguns dos países em desenvolvimento? Se não, por que razão é possível para o gado e não para os humanos?
  4. Com a ajuda de técnicas de rastreio mais avançadas e de tecnologia de ADN recombinante, muitos cientistas estão ativamente empenhados no isolamento/criação de um "super bug" que possa digerir lignocelulose a uma taxa extremamente elevada. Quais são os danos potenciais que este organismo pode causar se for libertado no meio ambiente? Que medidas de segurança podem ser utilizadas por um cientista para minimizar o impacto de tal acontecimento, que é certamente inevitável, se o organismo for utilizado num processo de larga escala?
  5. Comente formas de melhorar o protocolo.
- 

## References

1. Bailey, J.E. and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Ed., p163-172, McGraw-Hill, 1986.
  2. Bertran, M.S. and Dale, B.E., Enzymatic hydrolysis and recrystallization behavior of initially amorphous cellulose, *Biotech. Bioeng.*, **27**, 177, 1985.
  3. Linko, M., An evaluation of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials, in *Advances in Biochemical Engineering*, **5**, 39, 1977.
  4. Ghose, T.K., Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances, in *Advances in Biochemical Engineering*, **6**, 25, 1977.
  5. Grethlein, H.E., Comparison of the economics of acid and enzymatic hydrolysis of newsprint, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 503, 1978. Erickson, L.E., *Energetic efficiency of biomass and product formation*, *Biotech. Bioeng.*, **21**, 725, 1979.
- 

## A degradação da celulose

Enviar comentários para:

**Nam Sun Wang**

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering*

*University of Maryland*

*College Park, MD 20742-2111*

*301-405-1910 (voice)*

*301-314-9126 (FAX)*

*e-mail: [nsw@umd.edu](mailto:nsw@umd.edu)*