

**Regulamento e Normas Gerais de Uso**

**da Sala de Cultura da Neuroquímica - 213C**

*Atualizado em 09/09/2019*

1. **Aspectos Gerais para a utilização da sala de cultura da Neuroquímica**

A sala de Cultura da Neuroquímica é uma sala compartilhada entre 3 laboratórios: Laboratório de Neuroquímica III, Laboratório de Neuroquímica IV e Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo. A profª Carla Tasca é a professora responsável pela sala de cultura da Neuroquímica, e a técnica Glorister é a técnica responsável pelo gerenciamento e supervisão da sala.

Para ser um **Usuário Credenciado,** que pode utilizar a sala de cultura com autonomia e ter **acesso ao Google agenda** (para a reserva das cabines de fluxos laminar de ar), o **novo usuário\*** **deve se inscrever**, obrigatoriamente, no treinamento intitulado **Curso de Boas Práticas em Cultivo Celular**, que será realizado pela **Técnica de Laboratório** do Departamento de Bioquímica **Glorister Alves Altê** durante **o início de cada semestre letivo.** Para que o **Novo Usuário** seja considerado um **Usuário Credenciado** da **Sala de Cultura de Células**, ele deve ter passado por, no mínimo, **dez sessões de treinamento,** onde 1 sessão é teórica e dez sessões são práticas e abrangem **os diferentes protocolos de manipulação de culturas celulares**, que são os seguintes:

1. **Introdução sobre Cultura Celular (Teórico) – 2h**
2. **Trabalho em ambiente asséptico e identificação de contaminação-2h;**
3. **Esterilização de materiais por Calor Úmido -2h;**

**Filtração de meio de cultura -1h;**

1. **Descongelamento de células -1h;**
2. **Troca do meio de cultura das células -2h;**
3. **Tripsinização celular -2h;**
4. **Congelamento de células -1h;**
5. **Contagem celular em câmara de Neubauer-2h;**
6. **Plaqueamento para experimentos -2h;**
7. **MTT e Análise de Dados-3h;**

- Os materiais utilizados no treinamento devem ser fornecidos pelo grupo de pesquisa/laboratório do Professor Orientador do aluno em questão. O treinamento tem duração média de uma à duas semanas, dependendo da facilidade de cada aluno em realizar as técnicas. Após o término do treinamento o aluno deve responder a uma pequena avaliação de desempenho para verificar a assimilação dos conhecimentos.

- A inscrição para realização dos treinamentos está disponível no site: http://saladeculturabqa.paginas.ufsc.br/novousuario/

\***Usuários credenciados** podem utilizar a sala normalmente; mas poderão passar por um processo de **acompanhamento** ou **avaliação de desempenho** para verificar se estão seguindo das normas da sala e, se não se esqueceram de realizar algum passo das etapas essenciais das técnicas de manutenção celular.

- As reservas devem ser feitas com antecedência na agenda online (Google agenda)

<. Em um primeiro momento, para ser adicionado à agenda, deve-se mandar e-mail para [saladecultura.bqa@gmail.com](mailto:saladecultura.bqa@gmail.com)>. Os alunos devem **respeitar os horários agendados** e caso desistam da utilização devem desmarcar o horário;

* Cada aluno pode colocar **um jaleco** na sala de cultura, que obrigatoriamente fica **mantido na antessala** e deve **ser lavado, no mínimo, 1 vez por mês** pelos respectivos alunos, principalmente quando houver o **DIA DO JALECO** (que sempre será na sexta-feira, quando todos os jalecos da sala de cultura devem ser recolhidos pelos usuários/donos e lavados, para que retornem à sala apenas quando estiverem limpos) O jaleco da sala de cultura é de uso exclusivo da sala de cultura, e **nunca** deve ser utilizado fora da sala de cultura.
* O **número máximo de pessoas na sala é 4.** O ideal é que permaneça **1 aluno por cabine de fluxo laminar de ar.** Pode-se ter **5 pessoas** na sala no momento em que a Técnica estiver realizando uma inspeção ou um treinamento/acompanhando de usuários novos/antigos.
* **Cada laboratório/aluno é responsável por seu material** (e isso inclui a solução de álcool 70% utilizada nas cabines de fluxo laminar de ar) e deve se responsabilizar pela

**limpeza e organização** da sala de cultura;

* Deve-se manter a porta da sala fechada para **evitar a formação de correntes de ar**, ou seja, nunca se deve manter as duas portas abertas (porta interna e externa);
* O ralo da antessala deve ficar **sempre** fechado;
* Os usuários são organizados em equipes responsáveis pela manutenção da limpeza e organização mensal da sala de cultura;
* Novos usuários **podem ser orientados** sobre a utilização correta e procedimentos da sala de cultura **por um usuário credenciado** de seu grupo e devem ser incluídos nas rotinas de limpeza e manutenção da sala. Entretanto, essa orientação **não substitui** o **treinamento teórico/prático de técnicas de cultivo celular** realizado para obtenção do **credenciamento.**

1. Procedimentos para utilização da sala de cultura

* Só é permitida a entrada na sala interna (na sala das cabines de fluxo laminar de ar) após a **lavagem das mãos.**
* Após lavar as mãos, o usuário, que deve estar com vestimenta adequada (**calça comprida e sapato fechado**) e com os **cabelos presos**, **deve utilizar** todos os equipamentos de proteção individual adequados (**jaleco, touca e luvas de nitrila**). Também **é obrigatório o uso de máscara** (tendo em vista que sua não-utilização é uma das principais fontes de contaminação, principalmente por *mycoplasma* spp.)
* A **lavagem das mãos** e **o uso de EPIs** **é obrigatória** **para todos os usuários**, e deve ser respeitada, mesmo que seja somente para a utilização do microscópio, ou retirada de material da incubadora ou da geladeira.
* Deve-**se limpar o fluxo com álcool 70%** **antes** de começar a trabalhar;

-Deve-se **Limpar todo material com álcool 70% antes** de colocar dentro do fluxo **Ligar a UV** por pelo menos **20 minutos antes** de utilizar o fluxo;

* **Limpar as mãos (com luvas) com álcool 70% antes de manipular material no fluxo** **e na incubadora**. Cada vez que retirar as mãos do interior da capela de fluxo passar novamente álcool;
* Passar álcool nas garrafas e placas antes de devolvê-las para a incubadora;
* Não falar quando a incubadora estiver aberta;
* Ter muito cuidado durante a manipulação dos cultivos para não haver contaminação (cuidar principalmente para não cruzar os braços ou materiais em cima das placas de cultura abertas ou por cima dos meios de cultura ou de qualquer material que esteja aberto dentro do fluxo. Também é importante cuidar as mangas do jaleco, caso o jaleco não tenha punhos, **o ideal é usar um jaleco com punhos.**
* **Limpar o fluxo e as pipetas com álcool 70% após a utilização;**
* **Limpar o descarte da bomba de vácuo sempre que utilizar a bomba** - não deixar líquido na mangueira. Ao terminar de usar com a bomba ainda ligada deve-se borrifar álcool na entrada da mangueira e após isso lavar o frasco com hipoclorito de sódio 5%;
* **Guardar os frascos e as mangueiras sempre após a utilização e limpeza**.
* **Antes de descarta**r material biológico na pia, **adicionar hipoclorito** de sódio 5%;
* Ao final de cada utilização, os materiais a serem descartados no lixo branco contaminante (placas, falcons, eppendorfs etc) **devem ser lavados** na pia antes do descarte. Resíduos de meio de cultura no lixo branco podem atrair baratas, por exemplo;
* Não colocar material com líquidos contaminados dentro do lixo;
* Não descartar luvas no lixo comum, descartar as luvas no lixo branco;
* **Não descartar papel/plástico (ou quaisquer embalagens do material da cultura) no lixo branco contaminante**;
* **Se for o último usuário do dia**, **desligar os fluxos, desligar a UV** dos fluxos e da sala, **desligar o banho-maria**.
* **NUNCA desligar a INCUBADORA DE CO2** (pois as células precisam dela para se manterem vivas à noite e nos fins de semana, além de que ao desligar a incubadora, pode-se desregular a pressão de CO2).

- **NUNCA desligar o ar condicionado** (pois ele é fundamental para a climatização da sala de cultura e manutenção de seus equipamentos).

1. Procedimentos para limpeza periódica da sala de cultura

* 3.1. Laboratório Responsável do mês:

Cada equipe/laboratório fica responsável pela limpeza e organização da sala de cultura durante um mês, isto inclui:

-Limpeza do Chão e Bancadas (Laboratório responsável do mês – **1x por semana no mínimo**):

* Passar **pano com álcool ou hipoclorito ou detergente** no chão.
* **Nunca** passar vassoura na sala de cultura;

**- Nunca** retirar o rodo da sala de cultura.

**- Limpeza das bancadas** – **1 vez por semana** (álcool 70%);

-Limpeza mensal da sala (equipamentos, fluxos, centrífuga, incubadora, banho-maria, microscópios, bancadas, armários e chão)

**- Limpeza das 2 cabines de fluxo** laminar de ar com **detergente 3%**, seguida de **álcool 70% e** realização da **fumigação** nas mesmas (ver protocolo de fumigação nos Anexos) – 1 vez por mês;

* **Limpeza da incubadora** de CO2 com **detergente 3%** e **álcool 70%** e **realização do ciclo de esterilização da incubadora**- **1 vez por mês;**
* **Limpeza do banho-maria** – a cada **15 dias** – bem como a observação do nível de água:
* **Limpeza do microscópio e lupa**: limpar as objetivas com **solução álcool-éter (50% álcool e 50% éter**) obs.: utilizar papel soft (lenço de papel suave) para não riscar - **1 vez por mês, se estiver sujo;**

-**Fumegação mensal da sala;**

* Descarte do lixo branco (deve ser descartado até as 9 horas da manhã no MIP, andar térreo – no mínimo 1 vez por semana);
* Preparo, Manutenção e reposição das soluções (álcool 70%, hipoclorito 5% e detergente 3%) e da água destilada do barrilete – sempre que necessário;

-Reposição e troca da água destilada do banho-maria a cada 15 dias.

Completar com água destilada sempre que necessário, nunca ligar o banho-maria com o nível de água abaixo das resistências, pois isso pode queimar o equipamento.

* Observação dos níveis de CO2 e comunicação aos responsáveis (Técnica e Professores), (saladecultura.bqa@gmail.com) caso o conteúdo esteja no fim.
  + 1. **Limpeza das Cabines de Fluxo Laminar de Ar**
* Limpar todo o interior dos fluxos (base e paredes) com solução de detergente 3%, e depois com álcool 70%;
* As bases da bancada do fluxo 1 devem ser removidas para limpeza da parte inferior (atentar à montagem das mesmas: a placa com puxador fica no centro, com puxador virado para a parte frontal);
* Ligar a UV durante 30 min.
  + 1. **Limpeza da Incubadora de CO2**
* Desligar a incubadora (botão verde da frente da incubadora);
* Transferir as placas/garrafas para a capela de fluxo previamente limpa;
* A limpeza de todo o interior da incubadora - paredes e prateleiras removíveis - deve feita com solução de detergente 3%, seguida de álcool 70% (atentar à montagem das mesmas assegurando que fiquem retas);
* Lavar a bandeja e colocar 4 litros de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,05%(**2 g de SDS em 4 litros de água destilada)**;
* **Ligar a lâmpada UV**, conforme descrito abaixo:
  + Ligar a chave comutadora da UV (botão vermelho atrás da incubadora, lado esquerdo);
  + Ligar a incubadora (botão verde da frente da incubadora);
  + Utilize as teclas () e () para selecionar a função 222;
  + Solte a tecla () e a pressione novamente mantendo-a pressionada. Notará que o display do CO2 encontrará o número [ 0 ];
  + Utilize as teclas () para ajustar do display de CO2 no número [ 1 ];
  + Solte a tecla ();
  + Pressione a tecla [i] rapidamente (para iniciar a computação pelo microprocessador). O display do CO2 irá indicar [---] e continuará piscando por 30 minutos que é o tempo programado.
  + Ao término dos 30 minutos, o sistema retornará ao funcionamento normal automaticamente, fazendo o controle do sistema e as leituras dos valores de gás e temperatura que anteriormente foram ajustados.
  + Desligar a chave comutadora da UV (botão vermelho atrás da incubadora, lado esquerdo);
* Recolocar as placas/garrafas na incubadora. **3.2.3. Limpeza do banho-maria**
* Esvaziar o banho e lavar com água e detergente, passar álcool 70%;
* Encher o banho-maria com água destilada (acima do nível das resistências);
* Pode-se colocar um pouco de hipoclorito na água do banho-maria.

1. Utilização do microscópio

* Manter o microscópio limpo e sem resíduos;
* Nunca remover o microscópio da tomada (220v);
* Ligar o microscópio na lateral direita;
* Iniciar a observação com a objetiva de menor aumento;
* Sempre diminuir a luz quando for desligá-lo;
* **Voltar a objetiva para a de menor aumento**;
* Desligar o botão lateral.

1. Utilização da lupa

* Manter a lupa limpa e sem resíduos;
* Ligar a lupa na lateral direita;
* Após a utilização, desligar o botão lateral e colocar a capa sobre a lupa.

1. Geladeira

* Somente deve-se armazenar materiais para utilização na sala de cultura (por exemplo**: meio de cultura, PBS**, etc.);
* **Frascos sem identificação serão descartados.** Os frascos devem ser identificados com: nome da solução, concentração, data de preparo, quem preparou a solução e nome do professor orientador ou do laboratório.
* NUNCA UTILIZAR MATERIAL de outros usuários sem prévia autorização.
* NUNCA PASSAR ÁLCOOL nos materiais dos outros usuários (pois pode retirar os rótulos de identificação).

ANEXOS

**Cronograma de limpeza da sala de cultura ANO 2020**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **MÊS** | **PROFESSOR ORIENTADOR** | **LABORATÓRIO RESPONSÁVEL** |
| JANEIRO | CARLA | Laboratório de Neuroquímica IV |
| FEVEREIRO | ALEXANDRA | Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo |
| MARÇO | RODRIGO | Laboratório de Neuroquímica III |
| ABRIL | CARLA | Laboratório de Neuroquímica IV |
| MAIO | ALEXANDRA | Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo |
| JUNHO | RODRIGO | Laboratório de Neuroquímica III |
| JULHO | CARLA | Laboratório de Neuroquímica IV |
| AGOSTO | ALEXANDRA | Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo |
| SETEMBRO | RODRIGO | Laboratório de Neuroquímica III |
| OUTUBRO | CARLA | Laboratório de Neuroquímica IV |
| NOVEMBRO | ALEXANDRA | Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo |
| DEZEMBRO | RODRIGO | Laboratório de Neuroquímica III |

Fumigação das Cabines de Fluxo Laminar de Ar

* A fumigação dos fluxos deve ser realizada mensalmente, preferencialmente às sextas- feiras à tarde. Ambos os fluxos devem ser marcados na agenda como **FUMIGAÇÃO** no dia seguinte devido ao cheiro da evaporação do formaldeído que vai ficar na sala.
* Inicialmente os fluxos devem ser vedados com papel pardo por completo, inclusive a parte superior dos filtros - é importante para que o formaldeído fique concentrado no interior do fluxo.
* Ao vedar os fluxos, deixar uma lateral aberta para que o formaldeído seja colocado.
* **Colocar a respirador de proteção contra vapores orgânicos.**
* Em uma placa de petri de vidro, depositar formaldeído puro (37%) em uma quantidade suficiente para forrar o fundo da placa, aproximadamente 5ml (utilizar máscara durante todo o procedimento de manipulação). **É importante que o formaldeído seja colocado em um recipiente de vidro e que ele seja raso para facilitar o processo de evaporação no interior do fluxo laminar.**
* Após colocar o formaldeído, terminar de fechar o fluxo e sair do ambiente, pois neste momento o produto estará bem concentrado.
* No dia seguinte (aproximadamente 24h pós fumigação) os papeis devem ser retirados do fluxo e o ideal é que a sala seja utilizada apenas 48 horas após o inicio da fumigação.

Obs: Durante todo o procedimento o fluxo deverá permanecer desligado, assim como as lâmpadas UV, pois o produto deve ficar concentrado no fluxo e não ser disseminado.