

**AVALIAÇÃO E MODIFICAÇÃO DE PROTOCOLOS  
DE ROTINA PARA REDUÇÃO DA PRODUÇÃO  
DE RESÍDUOS NA UNIVERSIDADE**

**EVALUATION AND MODIFICATION  
OF THE ROUTINE PROTOCOLS TO REDUCTION  
OF WASTE PRODUCTION AT THE UNIVERSITY**

Felipe Maciel Zurlo<sup>1</sup>

Carlos Abrunhosa Tairum Junior<sup>2</sup>

Marcos Antonio de Oliveira<sup>3</sup>

Davis Gruber Sansolo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, Instituto de Biociências — UNESP CLP, São Vicente/SP. Bacharel em Ciências Biológicas.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, Instituto de Biociências — UNESP CLP, São Vicente/SP. Doutor em Biotecnologia.

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural, Instituto de Biociências — UNESP CLP, São Vicente/SP. Doutor em Genética e Biologia Molecular.

<sup>4</sup> Laboratório de Planejamento Ambiental e Gerenciamento Costeiro, Instituto de Biociências — UNESP CLP, São Vicente/SP. Doutor em Geografia Física.

**Resumo:** Pesquisas em Biologia Molecular necessitam de diversos reagentes químicos que representam um elevado risco à saúde humana e ao meio ambiente, além da considerável geração de resíduos tóxicos, cujo o armazenamento e destinação adequada representam um custo para a universidade. Neste contexto, a conscientização da toxicidade dos reagentes utilizados em protocolos experimentais pelos pesquisadores e a redução ou eliminação de resíduos é uma ação importante e representa um primeiro passo para a implementação de um sistema de gestão ambiental (SGA). O objetivo deste trabalho foi promover uma maior conscientização dos pesquisadores de um laboratório de Biologia Molecular para a organização de reagentes e resíduos gerados, de acordo com sua toxicidade e seus efeitos sobre a saúde humana e ambiental. Para atingir este objetivo, foram avaliados quais eram os protocolos experimentais de rotina utilizados no laboratório que geram resíduos tóxicos, o que revelou que os procedimentos de purificação de ácidos nucleicos (eletroforese) e proteínas (cromatografia e eletroforese) eram os mais relevantes. Em seguida, todos os reagentes laboratoriais foram organizados de acordo com as suas características tóxicas sobre o trabalhador e o ambiente, e também foram introduzidos protocolos que minimizam a utilização de reagentes tóxicos. Foi estimada que a quantidade de resíduos gerados foi ao longo de um ano, e foram implementados novos protocolos para reduzir os resíduos gerados. Durante todo o processo foram efetuados seminários e reuniões com os integrantes do laboratório para divulgação das ações. Como resultado, houve uma melhora na segurança do trabalho dos pesquisadores e na utilização consciente dos materiais. A otimização dos protocolos experimentais também levou a uma redução de 100% na utilização de reagentes para coloração/descoloração de géis e um decréscimo de 66% de reagentes utilizados, e 50% de resíduos gerados para purificação de proteínas. Também foram identificadas ações na reutilização de matérias plásticas, diminuindo o volume de resíduos sólidos gerado. Acreditamos que os esforços apresentados aqui representam um primeiro passo para a implementação de um sistema de gestão ambiental no laboratório em questão.

**Palavras-Chave:** Laboratório de Biologia Molecular; Geração de resíduos; Saúde ambiental e ocupacional.

**Abstract:** Research in molecular biology needs a high diversity of chemical reagents that present high dangerousness to human and environment health, besides

the considerable toxic residues generation whose storage and proper disposal represent a cost to the university. In this context, awareness of the toxicity of the reagents used in experimental protocols by the researchers and the reduction or elimination of waste is an important action and represents a first step towards the implementation of an environmental management system (EMS). The objective was to promote greater awareness of the researchers of a molecular biology laboratory for the organization of reagents and generated waste, according to its toxicity and its effects on human and environmental health. To achieve these objectives were evaluated which were routine experimental protocols used in the laboratory that generate toxic waste, which revealed that the nucleic acid purification procedures (electrophoresis) and proteins (chromatography and electrophoresis) were the most relevant. Then all laboratory reagents was organized according to their toxic characteristics of the worker and the environment and were also introduced protocols which minimize the use of toxic reagents. The amount of waste generated it was monitored over a year and new protocols have been implemented to reduce waste. Throughout the process seminars were conducted and meetings with lab members for disclosure of actions. As a result, there was an improvement in the safety of the researchers work and the conscious use of materials. The optimization of experimental protocols also led to a reduction of 100% in the use of reagents for coloring / bleaching gels and a 66% decrease of used reagents and 50% to waste generated for protein purification. They were also identified actions in the reuse of plastic materials, reducing the volume of solid waste generated. We believe that the efforts presented here represent a first step towards the implementation of an environmental management system at the laboratory in question.

**Keywords:** Molecular Biology Laboratory; Waste generation; Environmental and occupational health.

**Resumen:** La investigación en biología molecular necesita una alta diversidad de reactivos químicos que presentan alta peligrosidad para la salud humana y el medio ambiente, además de la gran generación de residuos tóxicos cuyo almacenamiento y eliminación adecuada suponen un coste para la universidad. En este contexto, el conocimiento de la toxicidad de los reactivos utilizados en los protocolos experimentales por los investigadores y la reducción o eliminación de los residuos es una acción importante y representa un primer paso hacia la implementación de un

sistema de gestión ambiental (SGA). Los objetivos de este estudio fueron una mayor conciencia de los investigadores de un laboratorio de biología molecular para la organización de los reactivos y de los residuos en función de su toxicidad de los residuos generados y sus efectos en la salud humana y del medio ambiente. Para lograr estos objetivos se evaluaron los cuales eran los protocolos experimentales de rutina utilizados en el laboratorio que generan residuos tóxicos, que revelaron que los procedimientos de purificación de ácidos nucleicos (electroforesis) y proteínas (cromatografía y electroforesis) fueron los más relevantes. A continuación, todos los reactivos de laboratorio se organizaron de acuerdo a sus características tóxicas a los trabajadores y el medio ambiente y también se introdujeron protocolos que minimicen el uso de reactivos tóxicos. La cantidad de residuos generados se controló durante un año y nuevos protocolos se han implementado para reducir los residuos. Durante todo el proceso se llevaron a cabo y reuniones con los miembros del laboratorio para la divulgación de las acciones seminarios. Como resultado se produjo una mejora en la seguridad del trabajo de los investigadores y el uso consciente de los materiales. La optimización de los protocolos experimentales también condujo a una reducción de 100% en el uso de reactivos para la coloración / blanqueo de los geles y una disminución de 66% de los reactivos utilizados y 50% a los desechos generado por la purificación de proteínas. También se identificaron acciones en la reutilización de materiales de plástico, que reduce el volumen de residuos sólidos generados. Creemos que los esfuerzos que se presentan aquí representan un primero paso hacia la implementación de un sistema de gestión ambiental en el laboratorio en cuestión.

**Palabras clave:** Laboratorio de Biología Molecular; Generación de residuos; Salud ambiental y ocupacional.

## 1 Introdução

O Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural do Instituto de Biociências da UNESP Campus do Litoral Paulista (LABIMES — UNESP/IB-

CLP), em São Vicente, tem como principais linhas de pesquisa o estudo do envolvimento de enzimas que possuem suas atividades biológicas centradas em processos redox e em biofármacos proteicos antitumorais. Estes estudos buscam compreender as funções bioquímicas/estruturais destas proteínas, com aplicações no conhecimento da biodiversidade e biotecnologia (LOPES et al., 2015; NETTO et al., 2016).

Os protocolos utilizados nas atividades diárias do LABIMES que geram resíduos podem ser divididos em quatro grupos:

- Purificação de proteínas por cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC);
- Eletroforese em gel para proteínas (poliacrilamida) e para ácidos nucléicos (agarose);
- Coloração e descoloração de géis de eletroforese, e
- Preparo de soluções diversas.

Estas atividades necessitam da utilização de reagentes químicos que possuem caráter tóxico, podendo causar danos a tecidos e órgãos em caso de acidente durante a manipulação do reagente puro ou em solução. Adicionalmente, para os procedimentos experimentais, são utilizados insumos plásticos os quais em conjunto com os reagentes se comportam como poluentes para o meio ambiente, principalmente para o meio aquático (NRCC, 2011).

No final do século XX, a percepção de que a poluição química levava a grandes riscos à saúde humana e ao meio ambiente fomentou a necessidade de um conjunto de medidas tendo como meta a redução não só da produção e eliminação de resíduos, como também do melhor acompanhamento desde sua produção ao seu descarte, de forma a atingir um equilíbrio entre a necessidade de produção de resíduos e o seu impacto social e ambiental. Este conjunto de ações foi denominado de gestão ambiental (ONU, 1992).

No caso de químicos, cada reagente adquirido é acompanhado de suas instruções de uso e descarte, periculosidade, riscos para o meio ambiente e segurança no trabalho, uma vez que foram criadas diversas normas por órgãos e agências internacionais que visam a segurança do trabalhador e do meio ambiente (ALBERTINI et al., 2000; HALPERN et al., 2008; NIOSH, 2010; US-EPA, 2004; VOROSMARTY et al., 2010). Desta forma, a gestão ambiental tem ganhado importância na nossa sociedade incluindo as universidades, as quais implementaram diversos sistemas de gestão (WHO, 2000). Entretanto, no caso das universidades brasileiras, a

implementação é relativamente recente. Como exemplo, no estado de São Paulo foram implementados apenas nos últimos anos programas ou sistemas de gerenciamento de resíduos químicos e biológicos, onde são promovidas ações para a utilização racional de químicos, acondicionamento adequado de resíduos e destinação específica e apropriada visando evitar danos à saúde dos pesquisadores, da sociedade e do meio ambiente (DE CONTO, 2010; FONSECA, 2009).

Entretanto, a criação de espaços destinados à guarda, coleta, transporte e destinação representam um custo significativo para as universidades (FONSECA, 2009); DE CONTO et al., 2011). Desta forma, a redução de resíduos é estrategicamente importante não só para a economia de recursos financeiros para suas atividades de ensino, pesquisa e extensão, mas também para a própria conscientização sócio ambiental da importância do gerenciamento de resíduos. Neste contexto, existe uma necessidade premente da implementação de ações que visem reduzir ou eliminar protocolos que gerem resíduos químicos e biológicos, podendo resultar na criação de sistemas de gestão nos laboratórios das universidades, o que representa ganhos não só para a universidade, mas também para a sociedade e meio ambiente.

## **2 Objetivos**

Os objetivos deste trabalho residiram na avaliação das atividades desenvolvidas em um laboratório de Biologia Molecular através da análise minuciosa e sistemática dos protocolos, material de consumo plásticos e reagentes químicos utilizados, visando a otimização de processos experimentais e dos procedimentos de rotina. Esta análise teve o intuito de reduzir ou eliminar a geração de resíduos, bem como conferir uma maior percepção aos pesquisadores do risco de manipulação de reagentes químicos e da vantagem da redução na geração de resíduos, visando implementação futura de um sistema de gestão ambiental, baseando-se na norma NBR ISO 14001:2004 da ABNT.

## **3 Material e Métodos**

Para a descrição e compreensão por completo de cada etapa desenvolvida nas atividades diárias do laboratório, utilizou-se os manuais de operação dos equipamentos e dos reagentes, conforme as descrições e recomendações dos respectivos fabricantes. Em sequência, categorizou-se os reagentes utilizados de acordo com sua periculosidade (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida foram redigidos protocolos levando-se em

conta cada reagente utilizado e sua finalidade no contexto experimental, bem como os riscos associados ao composto químico.

Tendo em vista a variedade de resíduos gerados pelo laboratório, foi realizada uma estimativa da quantidade de reagentes utilizadas ao longo de um ano e o quanto de resíduo cada um gera, levando-se em consideração os reagentes: mais expressivos, poluentes (Lista RETP do Ministério do Meio Ambiente) e material de consumo plástico.

A otimização dos protocolos experimentais se deu tanto por meio de levantamentos bibliográficos em revistas e periódicos relacionados à metodologia científica na área de Biologia Molecular e bioquímica, assim como através de alguns testes realizados no próprio laboratório durante a execução dos protocolos. Os dados obtidos neste trabalho foram transmitidos aos pesquisadores e usuários do laboratório por meio eletrônico e seminários.

## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Descrição dos protocolos ressaltando a toxicidade dos reagentes**

#### **4.1.1 Protocolo para purificação de proteínas:**

Este protocolo tem como objetivo isolar proteínas recombinantes de interesse para a realização de ensaios analíticos referentes à sua atividade e/ou estrutura. Por meio de metodologias envolvendo clonagem e manipulação gênica, é inserida uma cauda de poli-histidina (seis resíduos do aminoácido histidina adjacentes à enzima), que possibilita a purificação da proteína. Para isto utiliza-se a técnica de cromatografia de afinidade por metais (IMAC). Nesta técnica, são utilizadas colunas compostas por resinas porosas (*Talon* ou *Sepharose* — GE Healthcare) nas quais são adsorvidos metais (cloreto de cobalto para *Talon* e sulfato de níquel para *Sepharose*). A proteína alvo, por meio da cauda de poli-histidina, se liga covalentemente ao metal, enquanto as demais biomoléculas presentes no extrato celular passam livremente pela coluna cromatográfica, isolando a enzima de interesse (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para romper a ligação da cauda de poli-histidina à coluna, utiliza-se uma solução contendo o reagente Imidazol, que compete fortemente com a histidina para se ligar ao metal, fazendo com que em concentrações

elevadas (300mM para o cobalto e 500mM para o níquel) a proteína se dissocie por completo da resina. Esta etapa é denominada de eluição, e o produto final é a proteína purificada em solução de Imidazol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A limpeza da coluna é feita com 10ml de solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que se liga a íons metálicos, fazendo com que estes se desprendam da resina. Para a reutilização da coluna esta é recarregada com 10 ml de solução contendo metal (50mM quando utilizado o cobalto e 100mM quando níquel) para que o metal fique adsorvido e a coluna esteja apta para nova purificação de proteínas.

O maior problema em relação à geração de resíduos relacionados a esta técnica envolve a utilização de íons derivados de níquel e cobalto. Estes metais podem gerar danos ao meio ambiente por serem bioacumulativos na cadeia alimentar, o que os tornam extremamente tóxicos, principalmente no meio aquático (MENDOZA-CARRANZA et al., 2016).

#### **4.1.2 Eletroforese**

A eletroforese é um processo que promove a separação de moléculas que possuem carga utilizando um substrato sólido (gel) e aplicando-se um campo elétrico, fazendo com que esta separação ocorra devido à diferenças de tamanho e carga entre as moléculas. As amostras contendo biomoléculas são aplicadas em um gel (composto de poliacrilamida para proteínas e agarose para ácidos nucleicos) que forma uma malha molecular porosa durante a sua polimerização (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em seguida, é aplicada uma corrente elétrica que faz com que moléculas maiores (e consequentemente de maior massa molecular) apresentem menor mobilidade na malha porosa do gel e, portanto, menor migração no gel. Por outro lado, as moléculas menores apresentam uma maior mobilidade, o que permite a separação das biomoléculas com massas moleculares distintas. Os protocolos de confecção desses géis envolvem a utilização de reagentes perigosos, que requerem cautela durante a sua manipulação (NRCC, 2011; WHO, 2000).

Para o preparo de géis de poliacrilamida, são utilizados: Tris, dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio (PSA) e tetrametiletlenodiamina (TEMED). O Tris é utilizado na produção de soluções de tamponamento para diversas finalidades, sendo necessário certos cuidados apenas na manipulação do reagente na forma sólida (pó), que pode ser danoso à saúde se inalado, ingerido ou absorvido pela pele.



O SDS é um potente detergente que promove a desnaturação de proteínas (fazendo com que estas fiquem na forma de uma cadeia linear), que pode ser adquirido comercialmente na forma em pó. Por ser um pó muito fino, pode ser facilmente inalado durante a sua manipulação, podendo causar irritações nas vias superiores do sistema respiratório. A acrilamida e a bis-acrilamida são neurotoxinas potentes de caráter cumulativo que podem ser facilmente absorvidas tanto pela pele (seja em pó ou em solução) quanto pelas vias aéreas (na forma de pó).

O PSA e o TEMED reagem entre si e promovem a polimerização da acrilamida, sendo estes comercializados na forma de pó e em solução, respectivamente. Ambos são altamente destrutivos para membranas biológicas, tecidos e mucosas, podendo ser fatais se inalados. O TEMED é extremamente volátil e inflamável, sendo capaz de se dissipar a uma distância considerável e sofrer ignição e "flash back" caso encontre uma chama. Durante a polimerização do gel, a acrilamida é transformada em poli(acrilamida), que é atóxica. Entretanto, no gel podem haver resquícios de acrilamida não polimerizada, necessitando cuidados durante a sua manipulação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para a execução da técnica de eletroforese são necessários os seguintes reagentes: Tris, azul de bromofenol e glicerol. Como mencionado anteriormente, o Tris é utilizado para tamponar as amostras em pH adequado, enquanto o glicerol (que é atóxico), por possuir densidade maior do que a água, é utilizado para fazer com que a amostra contendo a proteína fique mais densa e se aloque no fundo dos poços moldados no gel, que servem para evitar o espalhamento e conseqüente perda da amostra. Já o azul de bromofenol é um corante utilizado para a monitoramento a olho nu do processo de eletroforese. Os maiores riscos relacionados ao seu uso estão ligados a acidentes durante a manipulação do reagente em pó, podendo ser tóxico se inalado, ingerido ou em contato com a pele. Adicionalmente, após a eletroforese, é necessário realizar a coloração do gel para observar a presença de bandas com proteínas, o que será explorado no próximo tópico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para o processo de eletroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose são utilizados os seguintes reagentes: azul de bromofenol, Tris, EDTA, agarose, ácido acético e brometo de etídeo. Dentre estes reagentes, o mais perigoso é o brometo de etídeo, um potente agente carcinogênico e teratogênico. Este composto é utilizado para a visualização dos ácidos nucleicos, uma vez que ele se intercala às bases de DNA e emite uma cor alaranjada intensa quando exposto a luz ultravioleta, permitindo a verificação de bandas onde está concentrado o DNA/RNA. Devido à sua característica intercaladora de ácidos nucleicos, o brometo de etídeo é um

reagente bastante tóxico, apresentando elevado caráter carcinogênico/mutagênico, que se agrava no caso de contaminações durante a gestação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O azul de bromofenol é utilizado da mesma forma que nos géis de acrilamida, ou seja, para monitorar o processo de migração das bandas na eletroforese. O EDTA é utilizado em solução com o intuito de manter estável a estrutura dos ácidos nucleicos, uma vez que possuem a capacidade de interagir com metais, impedindo assim a ação de enzimas que utilizam esses íons metálicos como um co-fator para sua ativação e podem causar danos ao DNA/RNA. Assim como o Tris, os perigos relacionados ao uso do EDTA se restringem à manipulação do reagente em pó. A agarose é um polissacarídeo atóxico solúvel apenas em água fervente, e após o resfriamento e consequente polimerização é responsável pela formação do gel propriamente dito. O ácido acético é utilizado para reduzir o pH (que fica básico devido as propriedades do Tris) e fornecer íons para a eletroforese. (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

#### **4.1.3 Coloração de géis de eletroforese**

Este procedimento é feito com o intuito de observar se o processo de purificação de proteínas ou extração/isolamento de DNA/RNA obteve êxito. A coloração dos géis de agarose é feita durante a eletroforese por meio do brometo de etídeo contido no gel, o qual já foi explicado anteriormente. Portanto, neste tópico, será abordada apenas a metodologia aplicada aos géis de poli(acrilamida).

Nestes, a coloração é feita após a corrida da eletroforese e para isso são necessários os reagentes: Coomassie Brilliant Blue R (CBB), ácido acético glacial e metanol. O CBB é o corante que irá se ligar à proteína e formar as bandas visíveis no gel após a descoloração. O corante, quando em pH ácido (mas não abaixo de pH 2) se liga à proteína, formando um complexo em duas etapas: inicialmente, o corante doa elétrons para os grupos ionizáveis da proteína, comprometendo sua estrutura nativa de forma a expor as porções hidrofóbicas, que se ligam de forma não covalente (força de Van der Waals) às regiões apolares do corante (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Com isto, ocorre o posicionamento dos grupamentos amina (positivos) próximo às regiões com carga negativa do corante, fazendo com que as ligações iônicas formadas estabilizem a forma azul do corante (BRADFORD, 1976).

Desta forma, quanto maior a concentração da proteína, mais corante vai se acumular naquela porção, aumentando o tamanho da banda. O ácido

acético é utilizado para manter o pH próximo a 2, além de ajudar na fixação do corante. O balanço de cargas do corante se dá por meio de três átomos de nitrogênio (cargas positivas) e dois ácidos sulfônicos (cargas negativas), sendo que a perda de cargas positivas (desprotonação) ocorre em razão do pH. Em pH abaixo de 1,15, o balanço de cargas é positivo; entre 1,15 e 1,82 é neutro; e próximo a 2 é negativo (-1) (CHIAL; THOMPSON; SPLITTGERBER, 1993). Por esta razão utiliza-se um ácido fraco, pois em valores de pH menores que 1,82 as formas do corante que se estabilizam são a verde (pH 1,15) e a vermelha (pH 0), os quais não formam os complexos corante-proteínas, pois o corante precisa doar elétrons para corar a proteína (formação do complexo). Já o metanol é utilizado apenas para solubilizar o corante.

Os três reagentes utilizados neste procedimento são considerados tóxicos se inalados, ingeridos ou em contato com a pele, além do fato do metanol ser inflamável. Uma forma de acelerar o processo de coloração é aquecer o gel imerso na solução corante em um forno de microondas, o que é extremamente perigoso, pois desta forma, elimina-se ácido acético e metanol em forma de vapor, aumentando a chance de inalação ou contato com os olhos e combustão do metanol.

#### **4.1.4 Descoloração de géis de eletroforese**

Este procedimento é aplicado apenas aos géis de poliacrilamida. A utilização do corante faz com que todo o gel seja corado, de forma que não seja possível visualizar as bandas. Após a descoloração, todo corante que estava ligado ao gel é retirado, sendo que apenas as bandas onde estão as proteínas ficam coradas, conforme explicado anteriormente. Para este procedimento, são utilizados os reagentes: ácido acético e metanol. Assim como no processo de coloração, o ácido acético é utilizado para manter o pH próximo a 2, enquanto o metanol é utilizado para solubilizar o corante, que, neste caso, fará com que o corante presente no gel seja diluído até ficar transparente após sucessivas trocas de descorante. Durante este processo, o corante que se ligou à proteína não é descorado devido às ligações de alta energia (iônicas) (Figura 1). Assim como no processo de coloração, o aquecimento da solução descorante faz com que o processo seja acelerado. Entretanto, os riscos relacionados à inalação de vapores de reagentes tóxicos são maiores devido às etapas sucessivas.

Após o processo de descoloração, o corante retirado do gel fica diluído na solução descorante, que deixa de ser cristalina e se torna levemente azulada, fazendo com que sua eficiência em descorar seja reduzida. Com o intuito de evitar a produção de resíduos de solução descorante, utiliza-se

carvão ativado em um filtro de papel, de forma que o corante é retido pelo carvão e a solução descorante fica cristalina novamente, sendo possível a reutilização da solução descorante. Com o passar do tempo e ao longo de sua utilização, a solução evapora, e o único resíduo gerado é o carvão ativado ligado ao corante, que é substituído, em geral, a cada três meses.

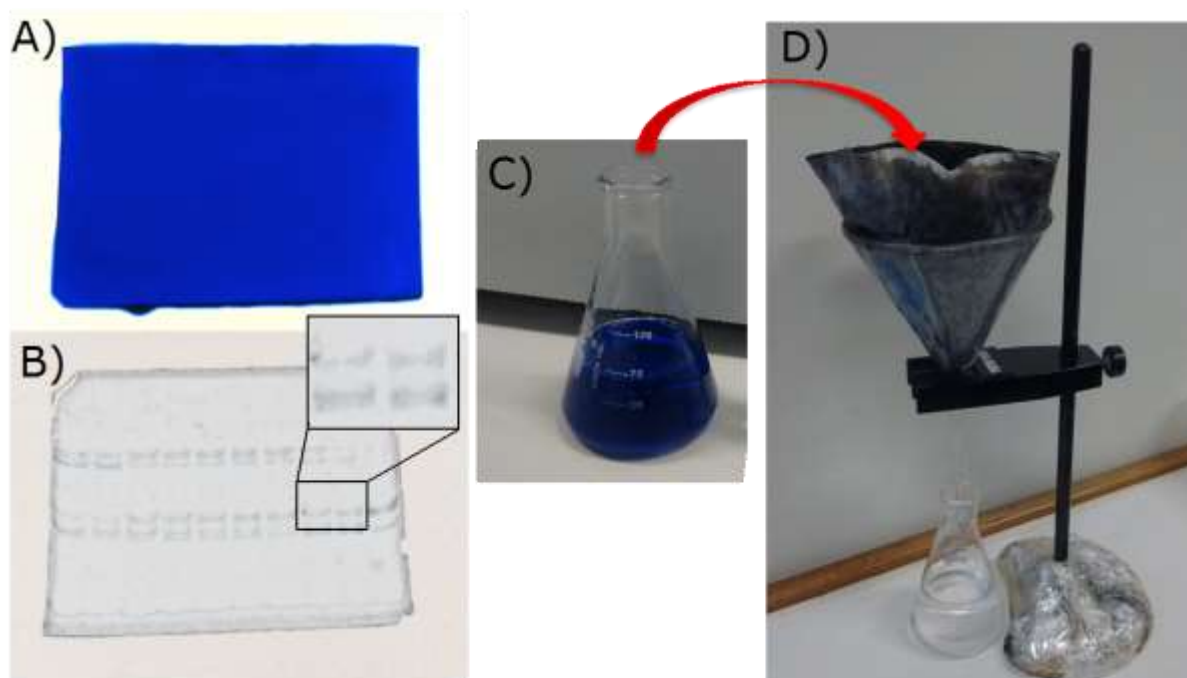
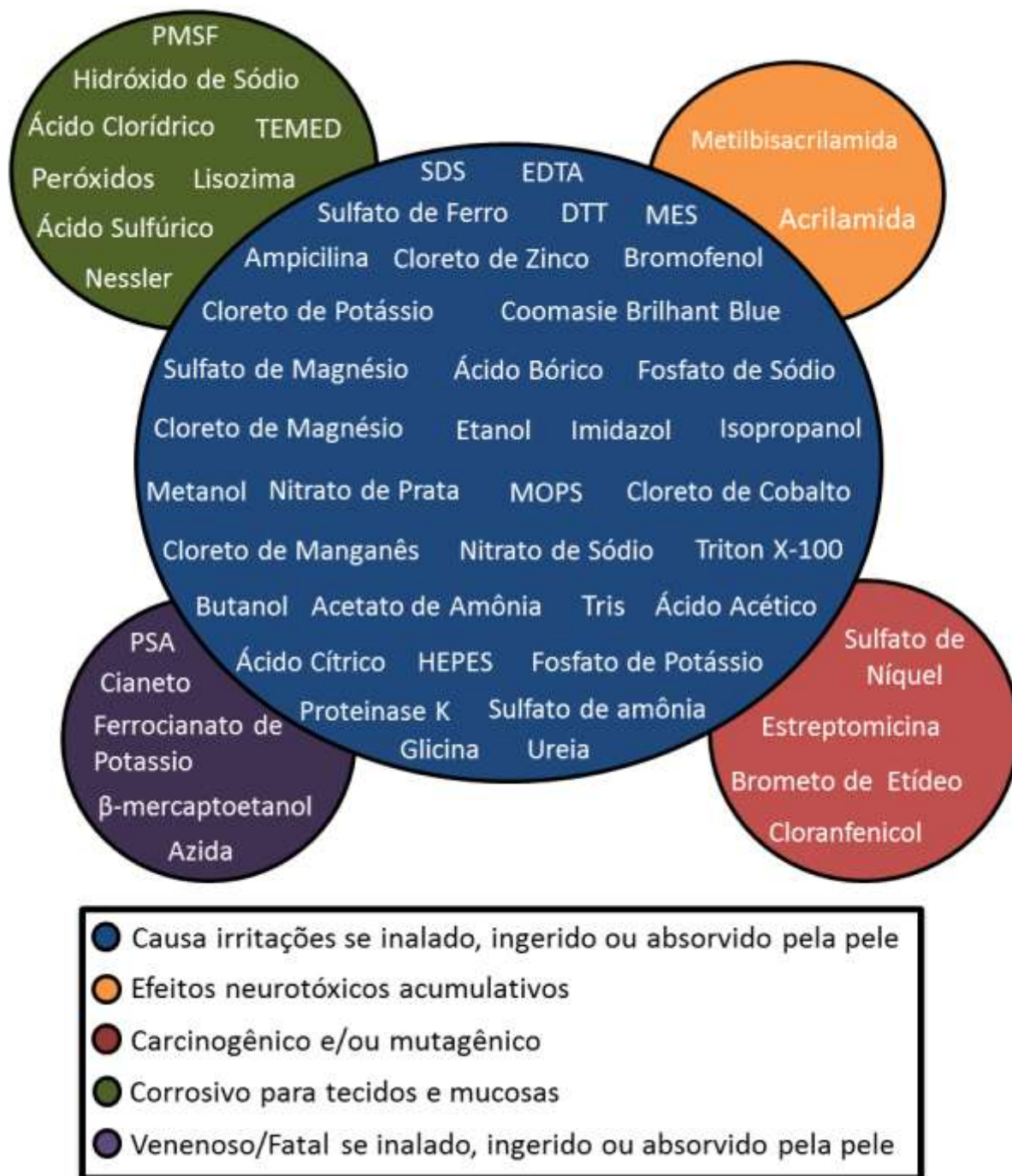


Figura 1: Processo de coloração e descoloração de géis para detecção de proteínas corados com Coomassie Blue. A) Gel após processo de coloração utilizando Coomassie Brilliant Blue. B) Gel após processo de descoloração com metanol e ácido acético. O detalhe revela as bandas de proteína. C) Resíduo gerado após descoloração do gel. D) Solução descorante à base de ácido acético e metanol após filtração utilizando carvão ativado pronta para reutilização.

#### 4.1.5 Preparo de soluções

Para a execução de todos os protocolos do laboratório são preparadas soluções estoque (mais concentradas), que são diluídas conforme a necessidade de cada experimento. Todos os reagentes utilizados nas atividades diárias e seus respectivos riscos à saúde (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) estão ilustrados na Figura 2 e Tabela S1.



**Figura 2: Reagentes utilizados na produção de soluções e seus riscos à saúde humana.** Os reagentes foram divididos em cinco categorias conforme os riscos apresentados em relação ao contato dos reagentes com tecidos e mucosas, seja por inalação, ingestão ou contato com a pele.

Cada categoria possui um diferente nível de periculosidade, exigindo assim que sejam tomados cuidados específicos durante a manipulação desses reagentes, e sempre com a utilização de equipamentos de proteção individual (E.P.I.), conforme preconiza a legislação trabalhista (Brasil, 1978), em essencial as luvas (adequadas aos produtos químicos em utilização), óculos de segurança e o avental (UNIFESP, 2016), que devem ser utilizados para a manipulação de todos eles. As características de cada grupo de reagentes e os cuidados a serem tomados são:

– **Círculo Azul:** reagentes químicos que apresentam menor nível de perigo. De qualquer forma, devem ser manipulados com bastante cuidado e atenção, utilizando-se luvas, principalmente na manipulação de reagentes na forma sólida ou, no caso de reagentes, na forma líquida concentrada. No caso do SDS, os cuidados devem ser maiores, pois o reagente é comercializado na forma de um pó bastante fino, que se suspende facilmente no ar durante a manipulação, aumentando os riscos de inalação e contato com os olhos. Neste caso, deve-se utilizar máscara semifacial PFF2, óculos de proteção e demais acessórios de proteção.

– **Círculo Laranja:** nesta categoria estão representados os reagentes neurotóxicos cumulativos, os quais são utilizados no processo de produção de géis de poliacrilamida. São comercializados na forma sólida (pó) e devem ser manipulados com extremo cuidado e atenção, utilizando-se luvas, máscara semifacial PFF2 e óculos de proteção, ou manipular o reagente dentro de uma capela de exaustão, principalmente para o caso da metilbisacrilamida, que é um pó bastante fino.

– **Círculo Verde:** os reagentes desta categoria causam corrosão à tecidos e mucosas, sendo necessários diversos cuidados na sua manipulação, principalmente dos reagentes sólidos e das soluções líquidas comerciais (mais concentradas). Reagentes como ácido clorídrico e hidróxido de sódio devem ser necessariamente manipulados no interior da capela, utilizando-se de luvas e óculos de proteção. Uma atenção especial deve ser dada ao TEMED pela sua volatilidade, portanto sua manipulação deve ser feita tomando-se os mesmos cuidados dos outros reagentes do grupo.

– **Círculo Roxo:** nesta categoria estão representados os reagentes que são venenosos e podem levar à morte. O PSA possui caráter corrosivo para membranas e mucosas, mas está nesta categoria por ser fatal se inalado. Todos os reagentes desta categoria devem ser manipulados com a utilização de luvas e óculos, dentro de uma capela com exaustão.

– **Círculo Vermelho:** dentro desta categoria estão os reagentes que possuem ação mutagênica, carcinogênica e/ou cancerígena quando ingeridos, inalados ou em contato com a pele. Devem ser manipulados com o uso de luvas e óculos de proteção, sendo que quando a

manipulação envolver o reagente sólido, esta deve ser executada dentro da capela com exaustão.

Alguns dos reagentes apresentados na figura 1 são considerados poluentes ambientais segundo a lista oficial de "Registro de Emissões e Transferência de Poluentes — RETP (BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2005). Esta lista está associada às atividades econômicas do país e aos reagentes químicos utilizados em cada uma. Entretanto, mesmo que as atividades de pesquisa não estejam especificadas nesta lista os seguintes produtos podem ser encontrados nas demais atividades:

— **Cobalto, níquel, mercúrio e ferro:** são considerados como metais pesados. Apesar do termo metais pesados ser bastante controverso, um relatório técnico da IUPAC (DUFFUS, 2002) sumarizou como principais as seguintes características para esta classe de elementos: aqueles que possuem 3,5 e 7,0 g/cm<sup>3</sup> e elevado raio e número atômico. Estes elementos bioacumulam na cadeia trófica, sendo prejudiciais ao organismo pelo fato de interagirem com macromoléculas, impedindo ou prejudicando o desempenho de suas funções biológicas.

— **Acrilamida:** Como citado anteriormente, trata-se de uma neurotoxina bioacumulativa, portanto pode causar danos de médio/longo prazo à biota aquática.

— **Metanol:** Causa irritações em contato com a pele e mucosas, além de causar cegueira, pois é capaz de dissociar as proteínas da retina. Quando ingerido, é metabolizado pela mesma enzima que metaboliza o etanol (álcool desidrogenase hepática — ADHh) de forma que neste caso ocorre a formação de ácido fórmico, que além de ser irritante e corrosivo para mucosas, altera o pH do meio, causando disfunções na homeostase.

— **Ácidos acético, clorídrico e sulfúrico:** Com exceção do ácido acético, são ácidos fortes, com alto poder corrosivo para membranas e mucosas, além de serem capazes de acidificar o ambiente, causando uma série de desequilíbrios para o meio aquático.

— **Fósforo:** O grande problema relacionado ao fósforo é o fato de este ser um nutriente para animais e plantas, e uma vez que em grandes concentrações no ambiente aquático, pode provocar a eutrofização e degradação ambiental.

— **Cianetos:** São venenosos por possuírem alta afinidade por metais, ligando-se principalmente ao ferro dos complexos

proteicos da cadeia transportadora de elétrons, impedindo a respiração celular.

## 4.2 Estimativas da utilização de reagentes químicos

Na tabela 1 estão dispostos as quantidades estimadas de consumo anual dos reagentes que se encontram nas categorias citadas acima. O metanol e o ácido acético não geram resíduos, pois são reutilizados após a filtragem com carvão ativado, como foi explicado anteriormente, de forma que ao longo do tempo ocorre a evaporação dos mesmos, não gerando resíduos para descarte. A quantidade de resíduos gerados para o fósforo provavelmente está subestimada, visto que devido a sua grande demanda, muitas vezes é necessário a diluição da solução estoque para diversas outras concentrações, dificultando uma estimativa exata. O ferro e o mercúrio, apesar de serem utilizados há pouco tempo nas atividades do laboratório, apresentam uma concentração final elevada.

Na última coluna estão apresentadas as concentrações máximas para descarte de efluentes na rede de esgoto de acordo com a resolução 430/2011 do CONAMA, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Nem todos os reagentes listados abaixo foram considerados nesta resolução, entretanto, como apresentado anteriormente (Figura 2 e Tabela S1), tratam-se de reagentes com caráter tóxico (exceto o fósforo) e danoso ao meio ambiente e à biodiversidade aquática. Desta forma, se enquadram no artigo 18 da mesma, na qual "O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, ...". Assim, por mais que os valores máximos não estejam delimitados para todos, estes não podem ser lançados na rede de esgoto. Para os que possuem valores definidos, a concentração dos resíduos é consideravelmente maior que o limite, corroborando para a necessidade de um descarte específico.

**Tabela 1: Estimativa da quantidade dos reagentes mais utilizados por ano na produção de soluções, sua respectiva geração de resíduos e concentração dos mesmos.** Os reagentes aqui listados são considerados poluentes pelo Ministério do Meio Ambiente (RETP/BR), e alguns possuem valores limites para lançamento de efluentes pela resolução 430/11 do Conama.

Reagente	Quantidade Utilizada	Resíduo Gerado	Concentração	Valores Máximos
Cobalto	65g	10L	6,5g/L	ne

ZURLO, F. M.; TAIRUM JUNIOR, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; SAN SOLO, D. G. *Avaliação e modificação de protocolos de rotina para redução da produção de resíduos na universidade*. R. Laborativa, v. 5, n. 2, p. 88-112, out./2016. <http://ojs.unesp.br/index.php/rlaborativa>.



<b>Níquel</b>	77g	10L	7,7g/L	2mg/L
<b>Metanol</b>	25L	—	—	ne
<b>Ácido Acético</b>	2L	—	—	ne
<b>Fósforo</b>	4Kg	30L	133g/L	ne
<b>Acrilamida</b>	300g	6Kg de géis	*	ne
<b>Brometo de Etídeo</b>	10 $\mu$ g	5Kg de géis	2 $\mu$ g/Kg	ne
<b>Ferro**</b>	3g	1L	3g/L	15mg/L
<b>Mercúrio**</b>	0,5g	10mL	50g/L	0,01mg/L
<b>Cianetos</b>	1g	50mL	20g/L	1mg/L

\* — não é possível determinar a concentração da acrilamida nos resíduos gerados pois apenas uma parte desta não é polimerizada no gel, dificultando a sua quantificação.

\*\* — reagentes pouco utilizados no laboratório.

ne — não especificado.

Os resíduos produzidos no laboratório são armazenados em recipientes adequados (de acordo com a NBR 10.004:2004), de forma que todos são etiquetados com o intuito de identificar o resíduo do recipiente. Os recipientes são acondicionados na Casa de Resíduos da UNESP—CLP até sua destinação final. Esta é uma etapa externalizada às atividades do laboratório, sendo realizada por empresa contratada pela reitoria da Universidade.

### 4.3 Otimização dos protocolos

De acordo com a tabela 1, foram estabelecidas algumas prioridades na atualização dos protocolos visando a mudança da forma de utilização

destes recursos. Em relação às metodologias, os seguintes protocolos foram atualizados:

— **Purificação de proteínas (Cobalto e Níquel)** — As informações disponibilizadas pelo fabricante consideram a necessidade de descarte da solução contendo o metal após o recarregamento da coluna. Entretanto, quando esta etapa é executada, a coluna passou por um processo completo de limpeza (10 ml de solução de EDTA para retirar o metal da resina), deixando a resina totalmente livre de contaminantes. Desta forma, o mesmo ocorre com a solução contendo o metal, a qual passa a ter apenas uma concentração um pouco menor do mesmo (parcela que fica adsorvida na resina), permitindo que ela seja reutilizada com segurança ao menos mais duas vezes. Sendo assim, ao invés de uma produção de 20mL de resíduo por purificação (10ml da solução de EDTA com o metal que estava na resina + 10ml de solução utilizada para recarregar a coluna), é produzido apenas 10mL (proveniente da limpeza), pois a solução utilizada para recarregar será coletada e reutilizada. Como a mesma solução que antes era descartada após ser utilizada apenas uma vez passou a ser utilizada três vezes, a redução da utilização dos reagentes foi de 66%. Durante os testes realizados nestas condições, a purificação de proteínas não apresentou nenhum problema na execução da técnica ou na obtenção do produto final. Desta forma, o volume de resíduos será reduzido pela metade, mas a concentração deste será até três vezes menor.

— **Géis de Eletroforese** — O problema relacionado aos géis de eletroforese é basicamente relacionado à grande quantidade de resíduos gerada (Tabela 1). Contudo, a quantidade de contaminante presente é muito pequena. Existem técnicas de desintoxicação para soluções com brometo de etídeo (LUNN; SANSONE, 1987). Entretanto, para géis na forma sólida o resíduo deve ser destinado para incineração segundo as normas da resolução 358/05 do CONAMA. Uma outra alternativa é a utilização do Gel Red™ (Biotium Inc.), que é um produto que passou a ser comercializado recentemente e que possui um mecanismo de ação similar ao brometo de etídeo, mas o fabricante afirma que este não é cancerígeno e pode ser descartado no lixo comum (BIOTIUM TECHNOLOGIES, 2013). Apesar da sua eficiência, o produto apresenta elevado custo, sendo até três vezes mais caro que o brometo de etídeo. Realizamos alguns testes de secagem dos géis, e os resultados foram expressivos, uma vez que sem o peso e volume da água, o restante do gel se torna ínfimo. Entretanto, não podemos afirmar que seja a solução ideal para o problema neste momento, sendo necessário a realização de testes que comprovem que o procedimento é seguro. Desta forma, não foi encontrado na literatura nenhuma alternativa para a redução do volume do resíduo gerado em caso de géis com brometo de etídeo. Uma alternativa possível é a utilização de um produto com custo-benefício semelhante ao do brometo, o "SYBR® Safe DNA gel stain", que não possui caráter mutagênico.

— **Coloração e descoloração de géis de eletroforese (Metanol e Ácido acético)** — Uma nova metodologia (LAWRENCE; BESIR, 2009; WONDRAK, 2001) foi implantada. Nesta, a diluição do corante é feita em água milli-Q. O ponto essencial para o funcionamento do método é a utilização de quantidade milimétricas de um ácido forte; neste caso o HCl, fazendo com que o corante fique com pH 2 e se estabilize na forma azul, sendo capaz de corar a proteína. Outro ponto importante é a retirada do SDS do gel por meio de uma série de lavagens, uma vez que o corante interage com o SDS. Desta forma, a utilização de metanol e ácido acético nas atividades do laboratório passou a ser nula. Na tabela 2 são apresentadas as reduções de reagentes utilizando os protocolos descritos acima.

**Tabela 2: Redução das quantidades utilizadas dos reagentes e consequente produção de resíduos em razão dos procedimentos adotados.**

Reagente	Quantidade Utilizada	Volume Resíduo	Redução	
			Reagente	Resíduo
<b>Cobalto</b>	65g	10L	66%	50%
<b>Níquel</b>	77g	10L	66%	50%
<b>Metanol</b>	25L	-	100%	-
<b>Ácido Acético</b>	2L	-	100%	-

Por outro lado, não foi possível encontrar alternativas viáveis para todos os protocolos. O Fosfato apresenta utilização de grandes montantes pelo laboratório, sendo difícil o armazenamento de todos os resíduos que contenham o reagente. Adicionalmente, o Mercúrio, Ferro e Cianeto apresentam utilização pouco expressiva, de forma que os dois primeiros começaram a serem utilizados recentemente e são praticamente degradados em reações enzimáticas. Já o cianeto, o qual não é mais utilizado, tem todo o resíduo produzido até o momento armazenado em concentrações não tóxicas.

#### **4.4 Estimativa da utilização de materiais de consumo plástico**

Durante a execução das atividades diárias do laboratório são utilizados uma série de materiais de consumo plásticos nas mais diversas funções: tubos de fundo cônico e microtubos para centrífuga (armazenamento de soluções, proteínas purificadas, dentre outros), placas de Petri (crescimento de bactérias e leveduras em meio de cultura sólido), cubetas (determinação da densidade óptica de meio de cultura por espectrofotometria), ponteiras (pipetagem de microvolumes), luvas e caixas para ponteiras (Tabela 3). Por entrarem em contato com substâncias químicas, os mesmos não podem ser reciclados, mas podem ser reutilizados para o mesmo fim em alguns casos.

Os microtubos para centrífuga, por possuírem volumes menores, são utilizados no laboratório para o armazenamento de proteínas purificadas concentradas, que são utilizadas em processos analíticos, portanto os tubos não são reutilizados. Já os tubos de fundo cônico e cubetas que não são utilizados em processos analíticos são reutilizados após serem devidamente lavados com o detergente extran 4%. As placas de Petri não são reutilizadas, pois é realizada a cultura de micro-organismos, e, após autoclavadas, são descartadas junto com o meio de cultura em sacos plásticos transparentes. As luvas não são reutilizadas, pois podem ser contaminadas durante o uso, enquanto as ponteiras não podem ser reutilizadas uma vez que necessitam de precisão no seu uso, o que seria prejudicado pelo processo de higienização das ponteiras (uma exceção neste caso são as ponteiras de 5000  $\mu\text{L}$ , que não são usadas para precisão, sendo, portanto, reutilizadas).

As caixas de ponteiras são reutilizadas após seu preenchimento com novas ponteiras e autoclavagem, assim como as ponteiras de 5000  $\mu\text{L}$  reutilizadas. Neste contexto, a reutilização das caixas, ponteiras de 5000  $\mu\text{L}$  e tubos cônicos, e sua autoclavagem não representam custo energético adicional. Todo o material utilizado no laboratório, mesmo novo, não é adquirido esterilizado e necessita ser autoclavado para sua utilização em experimentos envolvendo manipulações microbiológicas, ensaios enzimáticos e manipulação de proteínas e ácidos nucleicos, uma vez que a contaminação por microrganismos inviabilizaria a execução dos protocolos experimentais. No que concerne a utilização de água e extran para a lavagem dos tubos, as quantidades utilizadas de extran são mínimas, e este é biodegradável. No caso da água, as quantidades também são baixas (100ml), e o processo é todo feito de forma consciente. Quando se leva em conta que o custo de 25 tubos cônicos é de R\$ 60,00 (ou \$ 17 dólares americanos) frente ao custo do metro cúbico de água tratada, que varia de R\$ 2-3,00 (de acordo com a quantidade e companhia de abastecimento) e do litro de extran (R\$ 40,00, sendo que ele é utilizado altamente diluído em soluções de 4%), a reutilização dos tubos por 3-5 vezes se mostra

economicamente vantajosa. Além de reduzir a geração de resíduos, a reutilização também é importante por se tratar de material importado sujeito a variação cambial e cujo processo de produção e distribuição depende de uma longa cadeia de eventos.

**Tabela 3: Estimativa da quantidade material de consumo plástico utilizados nas atividades diárias do laboratório.**

<b>Material de Consumo Plástico</b>	<b>Volume</b>	<b>Descarte</b>	<b>Resíduo Total</b>
	15mL	100/ano	0,7kg
<b>Tubos de fundo cônicos</b>	50mL	100/ano	1,3Kg
	2mL		
<b>Microtubos para centrifuga</b>	1,5mL 0,5mL	25000/ano	25Kg/ano
<b>Placas de Petri</b>	20mL	500/ano	8Kg/ano
<b>Cubetas</b>	1mL	20/ano	54g/ano
<b>Tips</b>	5000 µL	0/ano*	0Kg/ano*
	1000 µL	5000/ano	5Kg/ano

\* Tips de 5000 µL são reutilizados, justificando a ausência deste tipo de resíduo

Para os materiais de consumo plástico, o laboratório já adota ações para reutilização de tubos de fundo cônico, cubetas e caixas de ponteiras do próprio laboratório e do laboratório de Genética do Instituto de Biociências da USP, sendo este o motivo da baixa geração de resíduo destes itens (Tabela 3). O restante dos itens dispostos na Tabela 3 não podem ser reutilizados; portanto o laboratório adota uma postura de planejamento na execução dos protocolos, visando principalmente a redução do uso de ponteiras. Como exemplo, em reações enzimáticas que envolvem a utilização de diversos reagentes como Tris, ATP, enzima e água ultrapura, o primeiro componente a ser utilizado é a água ultrapura, seguida do Tris

(tampão), as quais são feitas com a mesma ponteira, que é descartada após a pipetagem dos reagentes. Para os outros dois reagentes também são utilizados a mesma ponteira para ATP, e em seguida a enzima. Neste contexto, é possível economizar 50% das ponteiros e gerar metade dos resíduos sólidos.

## 5 Conclusões

As atividades metodológicas correntes em laboratórios de Biologia Molecular envolvem em todos os momentos a utilização de reagentes químicos, que são perigosos à saúde do trabalhador, da população e ao meio ambiente. Entretanto, sua utilização é fundamental para o desenvolvimento de pesquisa científica. Neste contexto, o conhecimento dos riscos da utilização destes reagentes e suas consequências para a saúde do trabalhador, população e meio ambiente são essenciais nos aspectos que envolvem saúde ocupacional e ambiental.

Perante ao levantamento e análise metodológica das atividades de rotina do laboratório, foi possível a otimização de dois protocolos largamente utilizados. Desta forma, reduziu-se significativamente, chegando-se próximo a sua totalidade, a utilização de reagentes para a coloração e descoloração de géis (ácido acético e metanol), e 66% da utilização de reagentes para purificação de proteínas, e 50% na geração de resíduos (Cobalto e Níquel). Neste contexto, é importante salientar que houve uma redução direta de custos para aquisição de reagentes analíticos, sendo alguns importados, o que representa uma economia de cerca de dois mil reais por ano (aproximadamente 550 dólares americanos). Por outro lado, foi observada uma utilização consciente de produtos de consumo de insumos plásticos, o que serve de exemplo para outros laboratórios. Conjuntamente, as ações apresentadas aqui também representam uma redução nas despesas relacionadas ao acondicionamento e descarte adequado de resíduos efetuado por empresas terceirizadas, o qual onera a universidade.

Cabe ressaltar que o laboratório utilizado como referência neste trabalho é de porte médio e conta com aproximadamente 10 integrantes. Neste contexto, a adoção de medidas como as apresentadas aqui por outros laboratórios universitários, sendo que alguns *campi* apresentam dezenas de laboratórios similares, representaria uma diminuição significativa de gastos públicos seja com a aquisição dos reagentes e descartáveis seja com a destinação dos resíduos, com ganhos para a saúde do trabalhador e meio ambiente. Outro aspecto importante é que as ações desenvolvidas aqui foram divulgadas para todos do laboratório por meio eletrônico ou na forma

de seminário, o que gerou uma maior conscientização na utilização dos reagentes e da geração de resíduos.

De forma geral, é possível concluir que a implementação de ações para a diminuição ou eliminação de resíduos laboratoriais é extremamente viável, pois traz tanto benefícios ambientais como sociais e econômicos, e fomenta a implementação de um sistema de gestão ambiental para os laboratórios. Os resultados também apontam a importância de expandir estas ações para outros laboratórios não só da unidade universitária, mas também para outros *campi* e outras universidades.

## Referências

- ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111–72, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS — ABNT. **NBR ISO 14001:2004 – Sistemas da gestão ambiental – Requisitos com orientações para uso**, 2004.
- BIOTIUM TECHNOLOGIES. **Safety Report of GelRed and GelGreen — A Summary of Mutagenicity and Environmental Safety Test Results from Three Independent Laboratories**, 2013.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Registro de Emissões e Transferência de Poluentes (RETP)**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_prorisc\\_upml/arquivos/poluentes\\_retp\\_82.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_prorisc_upml/arquivos/poluentes_retp_82.pdf)>. Acesso em: 5 mar. 2015.
- BRASIL. Normal Regulamentadora Nº 6, de 08 de Junho de 1978. Dispõe sobre o Equipamento de Proteção Individual — EPI. 1978.
- CHIAL, H. J.; THOMPSON, H. B.; SPLITTGERBER, A. G. A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G. **Analytical Biochemistry**, v. 209, n. 2, p. 258–266, 1993.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE — CONAMA. **Resolução 430/2011**, 2005a.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE — CONAMA. Resolução 358/2005**, 2005b.
- DE CONTO, S. M. Gestão de resíduos em universidades. EDUCS, 2010.
- DUFFUS, J. H. Heavy metals — A **meaningless** term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.
- FONSECA, J. C. L. **Manual para Gerenciamento dos Resíduos Perigosos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009.
- HALPERN, B. S. et al. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 948–952, 15 fev. 2008.
- ZURLO, F. M.; TAIRUM JUNIOR, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; SANSOLO, D. G. *Avaliação e modificação de protocolos de rotina para redução da produção de resíduos na universidade*. R. Laborativa, v. 5, n. 2, p. 88-112, out./2016. <http://ojs.unesp.br/index.php/rlaborativa>.

LAWRENCE, A.; BESIR, H. Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. **Journal of Visualized Experiments**, v. 30, 2009.

LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, p. 1–18, 2015.

LUNN, G.; SANSONE, E. Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 453–458, 1987.

MENDOZA-CARRANZA, M. et al. Distribution and bioconcentration of heavy metals in a tropical aquatic food web: A case study of a tropical estuarine lagoon in SE Mexico. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 155–165, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON PRUDENT PRACTICES IN THE LABORATORY — NRCC. **Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards: Updated Version**. Washington (DC): [s.n.].

NETTO, L. E. et al. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. **Free Radic Res.**, v. 8, p. 1–40, 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS — ONU. **Globally Harmonized System (GHS)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/safety-center/globally-harmonized.html#elements>>. Acesso em: 13 abr. 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. General Safety and Hazardous Material. In: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.].

THE NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH — NIOSH. **NIOSH pocket guide to chemical hazards**. [s.l.] Books Express Publishing, 2010.

UNIFESP. Equipamento de Proteção Individual (EPI). Disponível em: <<http://www2.unifesp.br/reitoria/residuos/orientacao-geral/equipamento-de-protecao-individual-epi>>. Acesso em 14 de julho de 2016.

US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY — US-EPA. **National water quality inventory**. [s.l.: s.n.].

VOROSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555–561, 30 set. 2010.

WONDRAK, E. M. **Solution for fast visualization of protein**, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Hazardous chemicals in human and environmental health: A resource book for school, college and university students**. [s.l.: s.n.].

## Nota

Derivado de um trabalho para conclusão da disciplina de Sistemas de Gestão Ambiental (SGA) do curso de Bacharelado em ciências biológicas pelo Instituto de Biociências — UNESP CLP.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a Ms. Melina Cardoso dos Santos pelo auxílio em procedimentos experimentais, e a FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. nº 14/05902-5 e 07/50930-3).

ZURLO, F. M.; TAIRUM JUNIOR, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; SANSOLO, D. G. *Avaliação e modificação de protocolos de rotina para redução da produção de resíduos na universidade*. R. Laborativa, v. 5, n. 2, p. 88-112, out./2016. <http://ojs.unesp.br/index.php/rlaborativa>.



Artigo apresentado em: 18/02/2016  
Aprovado em: 13/05/2016  
Versão final apresentada em: 14/07/2016