

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO DE
MEIOS DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS COM HIPOCLORITO
DE SÓDIO E POR AUTOCLAVAGEM

JULIANA MARTINS RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2006

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO DE
MEIOS DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS COM HIPOCLORITO
DE SÓDIO E POR AUTOCLAVAGEM

JULIANA MARTINS RIBEIRO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Silvio Lopes Teixeira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2006

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO DE
MEIOS DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS COM HIPOCLORITO
DE SÓDIO E POR AUTOCLAVAGEM.

JULIANA MARTINS RIBEIRO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 19 de maio de 2006

Comissão examinadora:

Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga – UFRRJ

Dr^a. Karla Silva Ferreira – UENF/CCTA

Dr. Henrique Duarte Vieira – UENF/CCTA

Dr. Silvio Lopes Teixeira – UENF/CCTA

Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, Dalmo Wilson Ribeiro Júnior e Maria Helena Martins Ribeiro, por sempre estarem ao meu lado, me dando amor e segurança em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus por me dar força e coragem para sempre seguir em frente. Ao Prof. Silvio Lopes Teixeira, que foi para mim não apenas um orientador, mas um grande amigo a quem devoto total confiança e com quem sempre pude dividir os momentos de alegria e de dificuldade. Agradeço a ele por todos os ensinamentos e toda paciência que teve comigo durante esses anos de convivência.

Ao meu namorado Paulo Giovanni por todo o amor, carinho e compreensão que recebi, não só durante o doutorado, mas em todo o tempo que dividimos juntos.

Às amigas Alyne e Celina pela amizade e sinceridade demonstradas durante todo o tempo de convivência.

Às professoras Karla e Silvia do LTA, por me ajudarem em experimentos de grande importância para a conclusão desta pesquisa.

À dona Isa e dona Arlete, sempre educadas e prestativas.

Aos professores do setor de estatística, à Raquel do LTA e a todas as pessoas que, de alguma maneira, colaboraram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1.	1
INTRODUÇÃO.....	
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Influência da concentração de sacarose no meio de cultura sobre o calejamento de Fáfia (<i>Pfaffia glomerata</i> L.)	12
3.1.1 Meio nutritivo	12
3.1.2 Origem dos explantes	12
3.1.3 Preparo da cultura-estoque de calos para o teste de calejamento	12
3.1.4 Preparo dos meios nutritivos	12
3.1.5 Transferência dos calos para os meios autoclavado e esterilizado quimicamente	13
3.1.6 Coleta de dados	13
3.2 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de eucalipto (<i>Eucalyptus pellita</i> L.)	14
3.2.1 Meio nutritivo	14
3.2.2 Origem dos explantes	14
3.2.3 Preparo dos meios nutritivos	14
3.2.4 Inoculação dos explantes nos meios de cultura	15
3.2.5 Coleta de dados	16
3.3 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de	

abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	16
3.3.1 Meio nutritivo	16
3.3.2 Origem dos explantes	16
3.3.3 Preparo dos meios nutritivos	17
3.3.4 Inoculação dos explantes nos meios de cultura	18
3.3.5 Coleta de dados	18
3.4 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de sequóia (<i>Sequoia sempervirens</i> L.)	18
3.4.1 Meio nutritivo	18
3.4.2 Origem dos explantes	19
3.4.3 Preparo dos meios nutritivos	19
3.4.4 Inoculação dos explantes nos meios de cultura	20
3.4.5 Coleta de dados	20
3.5 Análise qualitativa de furfural no meio de cultura	21
3.6 Determinação da concentração de cloro ativo total na solução de hipoclorito de sódio	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Influência da concentração de sacarose no meio de cultura de <i>Pfaffia glomerata</i>	22
4.2 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de <i>Eucalyptus pellita</i>	25
4.3 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de <i>Ananas comosus</i>	28
4.4 Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de <i>Sequoia sempervirens</i>	31
4.5 Análise qualitativa de furfural em meios de cultura autoclavados e esterilizados quimicamente	34
5. RESUMO E CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

RIBEIRO, Juliana Martins, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Maio de 2006. Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem. Professor orientador: Dr. Silvio Lopes Teixeira.

A autoclavagem, técnica utilizada para esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório, é uma operação dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia, e que pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura, como a sacarose. Por estes motivos, a substituição desta técnica de esterilização por alguma outra menos dispendiosa, tal como a esterilização química, seria altamente desejável. Sendo assim, a presente pesquisa teve como objetivos a comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem, de modo a obter uma técnica menos dispendiosa na esterilização de vidrarias e meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, bem como a análise da decomposição da sacarose pela técnica de autoclavagem e a formação de furfural. Foram utilizadas *Pfaffia*

glomerata, *Eucalyptus pellita*, *Ananas comosus* e *Sequoia sempervirens*. No experimento com a *Pfaffia glomerata*, além da comparação da esterilização entre as duas técnicas, também foram avaliados os efeitos de concentrações de sacarose na reação de calejamento. Os resultados mostraram que, para as concentrações de sacarose acima de 30g L⁻¹ de meio nutritivo, o peso da biomassa fresca dos calos cultivados em meios esterilizados quimicamente foi maior do que aqueles cultivados em meios autoclavados. No experimento com o *Eucalyptus pellita*, observou-se que as concentrações a partir de 0,005% de cloro ativo total, adicionado como esterilizante ao meio nutritivo, resultaram em completa esterilização de meio, bem como em culturas com maior número e comprimento de ramos. No experimento com *Ananas comosus*, observou-se que as concentrações a partir de 0,0003% de cloro ativo total adicionado ao meio nutritivo resultaram completa esterilização do meio, bem como em culturas com maiores números de brotações e pesos de biomassa fresca. No experimento com a *Sequóia sempervirens*, observou-se que as concentrações a partir de 0,003% de cloro ativo total adicionado ao meio nutritivo resultaram em completa esterilização do meio, bem como em plantas com maiores números e comprimento de ramos. A análise qualitativa de furfural, composto formado pela decomposição da sacarose, mostrou a presença deste composto em todos os meios autoclavados, não tendo sido observada sua presença em meios nutritivos esterilizados quimicamente.

Palavras chave: esterilização química, hipoclorito de sódio, autoclavagem, sacarose, furfural.

ABSTRACT

RIBEIRO, Juliana Martins, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, May, 2006. Comparison between the techniques of sterilization of plant tissue culture media with sodium hypochlorite and by autoclaving. Advisor: Dr. Silvio Lopes Teixeira.

The autoclaving used for sterilization of glassware, culture media and surgical materials in laboratory is a costly operation, due to the high cost of the equipment and the equally high consumption of energy, and can result in decomposition of components of the culture media, such as the sucrose. For these reasons, the substitution of this sterilization technique for some other one less costly, such as the chemical sterilization, would be highly desirable. So, the present research was aimed at comparing the techniques of sterilization of plant tissue culture media with sodium hypochlorite with the autoclaving one, in order to develop a less costly technique in the sterilization of glassware and nutrient media for plant tissue culture, as well as the analysis of the decomposition of the sucrose

by the autoclaving technique with formation of furfural. *Pfaffia glomerata*, *Eucalyptus pellita*, *Ananas comosus* and *Sequoia sempervirens* were used. Besides the comparisons between the two sterilizing techniques, the effect of the sucrose concentrations in the callusing reaction were also studied in the trial with *Pfaffia glomerata*. The data showed that for sucrose concentrations higher than 30 g L⁻¹ in the media, the weight of the fresh biomass of the callii cultivated in chemically sterilized media was larger than the fresh biomass of the ones cultivated in autoclaved media. In the trial with *Eucalyptus pellita*, it was observed that the concentrations equal or higher than 0.005% of total active chlorine added as sterilant to the nutrient media resulted in its complete sterilization, as well as in cultures with larger numbers of shoots. In the trial with *Ananas comosus*, it was observed that the concentrations equal or higher than 0.0003% of total chlorine added to the nutrient media resulted in its complete sterilization, as well as in cultures with larger numbers of shoots and fresh biomass weights. In the trial with *Sequoia sempervirens*, it was observed that the concentrations equal or higher than 0.003% of total chlorine added to the nutrient media resulted in its complete sterilization, as well as in plants with larger number and length of shoots. The qualitative analysis of furfural formed by the decomposition of the sucrose, showed the presence of this compound in all of the autoclaved media, and its complete absence in the chemically sterilized nutrient media.

Key Words: chemical sterilization, sodium hypochlorite, autoclaving, sucrose, furfural.

1. INTRODUÇÃO

A técnica de propagação comercial de plantas em laboratório teve início na década de 70 (González, 1998). Àquela época, a quantidade de plantas produzidas comercialmente em laboratório totalizava cerca de 500.000.000 ao ano, em todo o mundo (Pérez, 1998).

O aumento contínuo do número de plantas produzidas em laboratório deve-se às diversas vantagens que esta técnica oferece, tais como possibilidade de multiplicação em larga escala e em curto espaço de tempo de plantas que se propagam apenas lentamente pelas técnicas convencionais; utilização de espaço reduzido para a obtenção de grande quantidade de plantas, plantas completamente livres de doenças e pragas, independência quase completa das condições ambientais externas, elevada precisão no estabelecimento de cronogramas de produção e comercialização, elevada qualidade do produto no que diz respeito à homogeneidade e vigor das plantas obtidas, além de outras.

Como consequência da rápida evolução desta moderna tecnologia, o perfil do mercado de plantas vivas tem mudado em todo o mundo. Esta tendência está sendo observada até mesmo no Brasil no que diz respeito à especialização do produtor de mudas e ao comércio regional e internacional de plantas vivas.

O fato de se produzirem plantas com estado sanitário garantido tem facilitado e estimulado o comércio regional e internacional de plantas desta origem, o que

resulta numa demanda maior do produto. Este comércio, por sua vez, tem estimulado tanto o comércio de plântulas recém saídas do laboratório, pela facilidade e economia que elas oferecem ao transporte a longa distância, como a especialização do produtor de mudas e o aperfeiçoamento das instalações, para produção de plantas em larga escala e a um custo mais baixo.

Desta forma, uma vertente das pesquisas na área de “cultura de tecidos” tem visado a automação dos laboratórios, com vistas a aumentar o rendimento das operações e a redução dos custos (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Chu, 1995), que ainda são elevados nos laboratórios comerciais hoje utilizados, por se tratarem de instalações pouco diferentes daquelas utilizadas para a realização de pesquisas, onde o aspecto econômico não é considerado.

Os climas tropicais, como o do Brasil, dispendo de temperatura e insolação que permitem o crescimento de plantas durante todo o ano, sem a necessidade do uso de artifícios especiais, favorecem o desenvolvimento de uma instalação apropriada a estas condições, as quais permitem aproveitar as condições naturais já citadas para multiplicar plantas de maneira mais econômica durante todo o ano, sem a necessidade do controle artificial de iluminação e temperatura.

Além disso, as plantas produzidas sob luz natural saem do laboratório já adaptadas ao ambiente *ex vitro*, fase esta que constitui um problema nos laboratórios tradicionais, além de poderem apresentar maior rendimento no campo (Agramonte *et al.*, 1999). Instalações deste tipo, com graus variáveis de automação, as quais se denominaram “biofábricas”, já estão operando em Cuba há décadas, produzindo até 40.000.000 de plantas por ano, como batata inglesa, cana-de-açúcar, plantas florestais, banana, abacaxi, mamão e outras fruteiras, além de hortaliças (Ponce *et al.*, 2000).

Duas características importantes para uma biofábrica se tornar uma instalação mais econômica seriam a substituição da técnica de autoclavagem por alguma outra mais econômica, bem como o uso da luz solar na iluminação da sala de crescimento de plantas (Ponce *et al.*, 2000).

Quanto à autoclavagem, como técnica de esterilização de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório (Burger, 1988), é uma operação dispendiosa, devido ao elevado custo do equipamento e do igualmente elevado

consumo de energia. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura, como a sacarose (Street e Lowe, 1950; Ball, 1953). Por estes motivos, a substituição desta técnica de esterilização por alguma outra menos dispendiosa seria altamente desejável.

O uso do forno de microondas com esta finalidade tem sido tentado, mas sem completo sucesso quando se trata de esterilização de líquidos. A eficiência do forno de microondas já foi comprovada na destruição de bactérias (Latimer e Matsen, 1977) e fungos (Keller *et al.*, 1988) localizados sobre superfície seca, como instrumentos odontológicos (Rohrer e Bullard, 1985) e de laboratório (Rosaspina *et al.*, 1993), recipientes plásticos para meios de cultura (Sanborn *et al.*, 1982) e outros equipamentos (Biela, 1985; Jeng, 1987). Todavia, para meios de cultura líquidos, o equipamento não apresenta eficiência total, devido à ebulição e transbordamento prematuros do líquido, antes da sua completa esterilização, conforme demonstrado por Tisserat *et al.* (1992) e Teixeira *et al.* (2005a). Mesmo para a esterilização de materiais sólidos, a eficiência do forno de microondas depende do controle eficiente de fatores como, por exemplo, tempo e potência (Sherbondy *et al.*, 2002).

Pouca informação é encontrada na literatura científica quanto ao desenvolvimento de protocolos de esterilização de meios de cultura por meios químicos. Alguns produtos patenteados com este objetivo (Plant Cell Technology Inc., 1995; Bioactivos Químicos CBQ Centro, 1997) não lograram aceitação plena. Snow (1985) relatou o emprego de peróxido de hidrogênio para reduzir a contaminação de meios de cultura para germinação de sementes de orquídea, enquanto Yanagawa *et al.* (1995) afirmam ter obtido sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura, em condições não assépticas, esterilizando-o com hipoclorito de sódio ou água oxigenada, ambos a 0,01 %, e pulverizando o interior do frasco de cultura com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %, após a inoculação das sementes. Também estes resultados não têm sido utilizados na prática. Araújo e Teixeira (1998; 1999) e Teixeira *et al.* (2004a; 2004b) levantaram informações que permitiram o estabelecimento de um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza como esterilizante o hipoclorito de sódio em concentrações muito baixas.

Teixeira e colaboradores (Teixeira *et al.*, 2005a, b, c, d) levantaram informações que lhes permitiram desenvolver um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hipoclorito de sódio com eficiência total, sendo, o objetivo desta pesquisa, comparar a eficiência deste protocolo, com o protocolo convencional, que utiliza a autoclavagem para esta finalidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Na comparação entre autoclavagem e esterilização química, como técnicas de esterilização de meios de cultura, é importante levar em conta as modificações que podem sofrer alguns componentes do meio, no caso da autoclavagem e a toxidez do cloro, componente do hipoclorito de sódio utilizado na técnica de esterilização química em estudo para meios de cultura.

Os carboidratos constituem um grupo de componentes dos meios de cultura que podem ser degradados em função da temperatura durante a autoclavagem, podendo resultar inclusive na formação de compostos que podem ser tóxicos aos tecidos, como o furfural.

Entre as transformações químicas envolvendo os carboidratos, merece destaque a chamada “reação de Maillard”, devido à frequência com que ocorre e aos efeitos danosos que provoca (Cheftel e Cheftel, 1992).

Basicamente, a reação de Maillard ocorre na presença de aminoácidos e açúcares redutores através da interação entre a carbonila e os grupos amina livres. A interação do grupo amina do aminoácido com o grupo carbonila do açúcar redutor ocorre através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio do grupo amina ao grupo carbonila, tendo como produto substâncias denominadas melanoidinas, que são substâncias provenientes da mistura de produtos de vários

pesos moleculares. São complexantes de metais e sua cor varia de marrom claro até preto, conforme seu peso molecular (Cheftel e Cheftel, 1992).

Vários fatores afetam a reação de Maillard (Cheftel e Cheftel, 1992), dentre eles a temperatura. Em temperaturas baixas, a reação de Maillard ocorre de forma lenta, resultando em escurecimento do meio; entretanto, em temperaturas elevadas, a velocidade de escurecimento aumenta de duas a três vezes a cada incremento de 10°C. A temperatura afeta também a composição do pigmento formado, aumentando o teor de carbono, bem como a intensidade do pigmento.

Para que ocorra a reação entre o açúcar redutor e o grupo amina, é preciso que o par de elétrons do nitrogênio do aminoácido esteja livre, fato que ocorre quando o pH é elevado, sendo a velocidade da reação, máxima, para pH próximo da neutralidade (6-7). Entretanto, quando o pH é ácido, os íons H⁺ protonam o grupo amino, não havendo nesta condição o par de elétrons livres para reagir com o açúcar redutor. Sendo assim, a redução do pH reduz também a velocidade da reação de Maillard (Cheftel e Cheftel, 1992).

A estrutura da molécula do aminoácido é outro fator importante para a velocidade da reação, sendo decrescente na ordem: aminoácido básico (lisina), aminoácido ácido (ácido glutâmico) e aminoácido neutro (glicina). As velocidades relativas são afetadas pelo pH, dependendo do ponto isoelétrico de cada aminoácido (Cheftel e Cheftel, 1992).

A velocidade da reação depende também do tipo de molécula do carboidrato, sendo decrescente na ordem: monossacarídeos, onde na presença de pentose a velocidade de reação é maior que em presença de hexose; e dissacarídeos. A velocidade de escurecimento está relacionada à quantidade da forma acíclica que cada açúcar tem em solução, dependendo da presença de grupos carbonila para reagir com o nucleófilo - NH₂ (Cheftel e Cheftel, 1992).

Quanto à influência do teor de umidade, quando os reagentes estão muito diluídos, ou seja, a atividade da água é superior a 0,9, ocorre uma diminuição na velocidade de escurecimento. Da mesma forma, a velocidade da reação é reduzida quando a atividade da água tende a valores abaixo de 0,2. Nesse último caso, a velocidade é reduzida devido a um aumento na concentração de solutos e uma

diminuição na concentração do solvente, impedindo a movimentação de íons e moléculas e, conseqüentemente, o seu encontro (Cheftel e Cheftel, 1992).

Levando-se em consideração que os meios de cultura possuem 3 % de sacarose em sua formulação, que o processo de esterilização usualmente utilizado em laboratórios para meios de cultura é a autoclavagem, e que, como citado acima, a temperatura é um dos agentes responsáveis em acelerar o escurecimento não enzimático, torna-se necessária a busca de novas estratégias de esterilização de meios de cultura que evitem o acontecimento de tal reação, visando a manutenção da integridade dos componentes do meio de cultura.

O cloro é um íon cuja toxidez aos tecidos vegetais é bem conhecida sendo, portanto, importante conhecer o seu comportamento quando utilizado na tentativa de esterilização de meios de cultura.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) constitui uma das fontes de cloro com possibilidade de utilização como esterilizante químico de meios de cultura. É um produto químico muito utilizado para esterilização de superfícies, frutas e hortaliças, água, entre outros. Sua utilização em larga escala é devido ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato (Tsai *et al.*, 1998; Emmanuel *et al.*, 2004). O hipoclorito de sódio causa alterações bioquímicas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídios, formando cloraminas que interferem no metabolismo celular. Gera reações oxidativas com inativação enzimática irreversível em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos (Estrela *et al.*, 2002).

A atividade biocida do hipoclorito de sódio é aumentada significativamente com a formação do ácido hipocloroso (HOCl). O ácido hipocloroso, um dos maiores agentes biocidas, é formado quando o hipoclorito de sódio é utilizado como fonte de cloro. É um ácido fraco, e sua formação é fortemente influenciada pelo pH do meio, sendo ótima entre pH 6 e 9 (Saran *et al.*, 1998; Emmanuel *et al.*, 2004). A reação ocorre na ordem que se segue: 1) $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{HOCl} + \text{Na}^+ + \text{OH}^-$; 2) $\text{HOCl} \longrightarrow \text{H}^+ + \text{ClO}^-$.

Uma das grandes preocupações decorrentes da utilização do hipoclorito de sódio na esterilização é a quantidade de compostos orgânicos halogenados resultantes de seu uso (Tsai *et al.*, 1998; Emmanuel *et al.*, 2004). A quantidade

destes compostos formados é dependente não só da concentração de hipoclorito de sódio utilizada, mas também da quantidade de compostos orgânicos presentes no meio em que o esterilizante será aplicado (Emmanuel *et al.*, 2004), fazendo-se necessária a otimização de protocolos de esterilização, para que se chegue a uma condição experimental ótima que elimine ao máximo os microorganismos patogênicos sem que haja formação de uma quantidade nociva de compostos halogenados (Tsai *et al.*, 1999; Emmanuel *et al.*, 2004).

Além de sua utilização como esterilizante de águas residuais, o hipoclorito de sódio é muito utilizado para eliminação de microorganismos patogênicos, principalmente ao ser humano. Com o objetivo de demonstrar o seu poder biocida, vários trabalhos foram publicados nesse sentido.

Em 1984, Baruffaldi *et al.* (1984) demonstraram a eficácia do tratamento químico de folhas de alface com solução de hipoclorito de sódio, em uma concentração de 40 ppm de cloro ativo durante 10 minutos, na redução da quantidade de parasitas patogênicos ao ser humano.

Nemeth *et al.* (1997) realizaram um programa para testar o efeito de um produto comercial contendo 5,25% de hipoclorito de sódio, sobre bactérias colonizadoras de unidades de água em clínicas dentárias, tendo-se obtido, como resultado, um baixo índice de colonização das unidades de água tratadas com o produto, chegando a zero em algumas situações.

Rossoni e Gaylard (2000) fizeram uma análise comparativa dos efeitos causados pelo ácido peracético (PAA) e pelo hipoclorito de sódio sobre três espécies de microorganismos patogênicos (*P. fluorescens*, *S. aureus* e *E. coli*). Em tal comparação, foram analisadas a capacidade de eliminação dos microorganismos e a redução do número desses aderidos a uma placa de aço inoxidável. As concentrações utilizadas foram de 100 e 200 mg L⁻¹ para o hipoclorito e 250 e 1000 mg L⁻¹ para o ácido peracético e o tempo de incubação com ambos os desinfestantes foi de 10 minutos. Como resultado, foi observado que, em ambas as concentrações, o hipoclorito de sódio foi mais eficiente do que o ácido peracético tanto na eliminação dos microorganismos quanto na redução no número de células aderidas na placa de aço inoxidável. Após o tratamento com ambas as concentrações de hipoclorito, observou-se que o número de microorganismos foi reduzido significativamente para

E. coli e *P. fluorescens*, chegando a zero para *S. aureus*. O valor médio de zero não foi alcançado por nenhuma das duas concentrações de ácido peracético.

Veschetti *et al.* (2003) analisaram a efeito biocida do hipoclorito de sódio e do ácido peracético sobre sete espécies de microorganismos (coliformes totais, coliformes fecais, streptococos fecais, *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. e bacteriófago anti- *E. coli*). As concentrações dos desinfestantes utilizadas foram de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹ para ambos, assim como o tempo de exposição de 8 a 38 minutos. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito biocida, tanto do ácido peracético quanto do hipoclorito de sódio, foram similares contra coliformes totais, coliformes fecais, *E. coli*, *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* sp.. Entretanto, na eliminação de streptococos fecais e bacteriófago anti- *E. coli*, o hipoclorito de sódio mostrou-se mais eficiente.

Cox *et al.* (2003) realizaram a desinfestação de esporos de samambaia (*Schizaea dichotoma*) utilizando hipoclorito de sódio, streptomomicina e a combinação de ambos, visando a otimização dos procedimentos de desinfestação para posterior germinação e crescimento *in vitro* do vegetal. Três tratamentos diferentes foram empregados: (T1) 1% NaOCl (v/v); (T2) 200 µg/ mL de streptomomicina e (T3) 1% NaOCl + 200 µg/ mL de streptomomicina (1:1 v/v). Os resultados observados para os três tratamentos foram similares, apesar de o tempo de contato dos esporos com os desinfestantes (5 minutos) ainda não ter sido o ideal para uma desinfestação completa.

Araújo *et al.* (2004) realizaram dois experimentos com dois lotes de amendoim da cultivar Botucatu. No primeiro experimento, as sementes foram divididas em duas amostras, sendo uma imersa previamente em hipoclorito de sódio. A incubação destas foi realizada em meio agarizado (BDA, CZ) e em folhas de papel (sobre e em rolo), com ou sem restrição hídrica. No segundo experimento, as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 1, 2, 3, 5 e 10%, por um, três, cinco e dez minutos e, posteriormente, foram incubadas em BDA. Observou-se que os métodos de incubação em meio agarizado com restrição hídrica propiciaram maior recuperação de *Aspergillus* spp. e de *Cladosporium* spp. nas sementes de amendoim sem desinfestação prévia. Também foi observada uma menor ocorrência de *Rhizopus*

spp. e *Aspergillus niger* nas sementes desinfestadas, independente do período de embebição e da concentração de hipoclorito de sódio.

Vianna *et al.* (2004) realizaram experimentos *in vitro* para testar a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina (CHX), nas formulações em gel e líquida e do hipoclorito de sódio contra vários patógenos endodônticos (*S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*). As concentrações utilizadas foram de 0,2; 1 e 2% para o gluconato de clorexidina em ambas as formulações, e de 0,5; 1; 2,5; 4 e 5,25 % para o hipoclorito de sódio. Os resultados obtidos demonstraram que, tanto o hipoclorito de sódio quanto o gluconato de clorexidina demonstraram-se eficientes em suas propriedades antimicrobianas.

Antoniolli *et al.* (2005) procuraram determinar a menor concentração eficiente de hipoclorito de sódio (NaOCl) para desinfecção da casca, bem como avaliar a necessidade de utilização do mesmo agente sanitizante no banho de imersão da polpa do abacaxi 'Pérola' minimamente processado. Para isso, frutos previamente lavados foram desinfetados com NaOCl 100; 150 ou 200 mg L⁻¹, durante 2 minutos. Após aproximadamente 24 horas de armazenamento refrigerado, os frutos foram descascados e fatiados mecanicamente. As fatias foram imersas em solução de NaOCl 20 mg L⁻¹ ou em água (controle), durante 30 segundos. Após período de repouso, para drenagem do excesso de líquido, foram acondicionadas em embalagens de polietileno tereftalato e mantidas à temperatura de 4 ± 1 °C, durante 16 dias. As análises microbiológicas, realizadas em intervalos de três dias, foram: coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras. Não foram detectados coliformes totais e fecais em nenhum dos tratamentos, durante 16 dias de armazenamento refrigerado. A desinfecção da casca com NaOCl 200 mg L⁻¹ associada à sanitização da polpa do abacaxi com NaOCl 20 mg L⁻¹ proporcionou menores populações de microrganismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras. Concluiu-se com os experimentos que, tais operações são imprescindíveis na obtenção de produtos minimamente processados que ofereçam garantia de sanidade ao consumidor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Influência da concentração de sacarose no meio de cultura sobre o calejamento de Fáfia (*Pfaffia glomerata* L.)

3.1.1. Meio nutritivo

Tabela 1: Meio nutritivo para cultivo de *Pfaffia glomerata*

Sais (MS) inorgânicos*	Compostos orgânicos
NH ₄ NO ₃	30 g L ⁻¹ de sacarose
KNO ₃	2 mg L ⁻¹ de AIA (ácido 3-indolacético)
CaCl ₂ .2H ₂ O	2 mg L ⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico)
MgSO ₄	2 mg L ⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina)
KH ₂ PO ₄	0,4 mg L ⁻¹ de tiamina.HCl
NaFeEDTA	100 mg L ⁻¹ de i-inositol
Micronutrientes	

* Os sais (MS) inorgânicos foram preparados e utilizados conforme Murashige e Skoog (1962).

► O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, para o meio autoclavado e para $6,0 \pm 0,1$, para o meio esterilizado quimicamente.

3.1.2. Origem dos explantes

O material vegetal utilizado para extração dos explantes para calejamento de Fáfia foi proveniente de cultura-estoque do acesso NPD dessa espécie, mantido no banco de germoplasma do LFIT/ CCTA/ UENF, por passagens de 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas e iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo meio MS (item 3.1.1) esterilizado por autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 15 minutos).

3.1.3. Preparo da cultura-estoque de calos para o teste de calejamento

No interior da capela de fluxo laminar, fragmentos de calos oriundos de plantas de Fáfia do acesso NPD citadas no item 3.1.2, foram retirados com auxílio de pinças e bisturis estéreis e transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS (item 3.1.1) previamente autoclavado.

3.1.4. Preparo dos meios nutritivos

Para tal experimento, foram preparados meios de cultura autoclavados e esterilizados quimicamente. Os meios nutritivos autoclavados foram preparados conforme Murashige e Skoog (1962), havendo uma variação apenas na concentração de sacarose adicionada ao meio.

Para o preparo dos meios esterilizados quimicamente, toda a vidraria utilizada, frascos de cultura, respectivas tampas e a bureta utilizada para encher os frascos de cultura foram enxaguados com água deionizada adicionada de $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de água sanitária a 2%. Também foram adicionados $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ de água sanitária a 2% no meio nutritivo esterilizado quimicamente. Após 15 minutos da adição do NaOCl aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e os frascos de cultura introduzidos no forno de microondas para fusão do PHYTAGEL. Após a fusão do agente gelificante foi efetuado o enchimento dos frascos em ambiente não estéril.

Além da comparação da reação de calejamento entre os meios autoclavados e esterilizados quimicamente, foi analisado o efeito das diferentes concentrações de sacarose sobre tal reação. Para a análise desse fator, foram feitos cinco tratamentos diferentes, variando apenas a concentração de sacarose nos meios de cultura.

Os tratamentos foram os seguintes: a) meio de cultura contendo 0 g L⁻¹ de sacarose; b) meio de cultura contendo 10 g L⁻¹ de sacarose; c) meio de cultura contendo 20 g L⁻¹ de sacarose; d) meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e e) meio de cultura contendo 40 g L⁻¹ de sacarose.

Foram preparados 20 tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS para cada tratamento, tanto para aqueles que foram autoclavados quanto para os que foram esterilizados quimicamente com a utilização do hipoclorito de sódio.

3.1.5. Transferência dos calos para os meios autoclavado e esterilizado quimicamente

Calos de Fáfia, provenientes de cultura-estoque citada no item 3.1.3, foram retirados dos tubos de ensaio nos quais estavam sendo cultivados com passagens de um mês e meio e transferidos para placas de Petri. Com auxílio de pinças e bisturis, os calos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e esses fragmentos foram então transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios de cultura citados no item 3.1.4. Todo esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com utilização de utensílios e ferramentas cirúrgicas esterilizados por autoclavagem.

3.1.6. Coleta de dados

Dois meses após a transferência dos calos para os meios citados no item 3.1.4, foi feita a análise visual das diferenças existentes entre a reação de calejamento nos calos cultivados nos meios de cultura autoclavados, e nos calos esterilizados quimicamente, bem como as variações provocadas pelas diferentes concentrações de sacarose utilizadas.

A biomassa fresca de cada um dos calos foi anotada para o cálculo da média dos valores de cada tratamento, para ambos os métodos de esterilização (autoclavado e esterilizado quimicamente)

3.2. Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de eucalipto (*Eucalyptus pellita* L.)

3.2.1. Meio nutritivo

Tabela 2: Meio nutritivo para o cultivo de *Eucalyptus pellita*

Sais (MS) inorgânicos*	Compostos orgânicos
NH ₄ NO ₃	30 g L ⁻¹ de sacarose
KNO ₃	0,5 mg L ⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina)
MgSO ₄	0,4 mg L ⁻¹ de tiamina.HCl
KH ₂ PO ₄	100 mg L ⁻¹ de i-inositol
CaCl ₂ .2H ₂ O	
NaFeEDTA	
Micronutrientes	

* Os sais (MS) inorgânicos foram preparados e utilizados conforme Murashige e Skoog (1962).

► O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, para o meio autoclavado e para $6,0 \pm 0,1$, para o meio esterilizado quimicamente.

3.2.2. Origem dos explantes

O material vegetal utilizado nesse experimento foi proveniente de cultura-estoque dessa espécie, mantida por passagens de 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas e iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em tubos de ensaio de ensaio de $25 \times 150 \text{ mm}$ contendo meio MS (item 3.2.1.) esterilizado por autoclavagem ($121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos).

3.2.3. Preparo dos meios nutritivos

Os explantes foram inoculados em meio de cultura, frascos e outras condições iguais às da cultura-estoque, sendo, porém, o meio de cultura, esterilizado conforme os tratamentos descritos a seguir:

Os tratamentos consistiram nas seguintes concentrações de cloro ativo total no meio de cultura: a) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional e

autoclavado (controle A); b) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,001 % de cloro ativo total ao meio de cultura; c) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,003 % de cloro ativo total ao meio de cultura; d) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,005 % de cloro ativo total ao meio de cultura; e) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,007 % de cloro ativo total ao meio de cultura; f) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,009 % de cloro ativo total ao meio de cultura e g) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional, mas sem autoclavar (controle B).

Após 15 minutos da adição do NaOCl aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e os frascos de cultura introduzidos no forno de microondas para fusão do PHYTAGEL.

A água utilizada no preparo do meio de cultura consistiu em água deionizada, esterilizada com duas gotas por litro de água sanitária 2% em dias anteriores e uma gota adicionada à mesma água no momento do preparo do meio. A vidraria utilizada no preparo do meio, os frascos de cultura e respectivas tampas, e a bureta utilizada para encher os frascos de cultura foram enxaguadas com água clorada a 0,003 % de cloro ativo total, com exceção dos tratamentos controle A e B, cujos utensílios foram enxaguados com água apenas deionizada. Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não estéril. O enchimento dos frascos foi efetuado na capela de fluxo laminar 15 minutos após o enxágüe destes em água clorada a 0,003 % de cloro ativo total.

3.2.4. Inoculação dos explantes nos meios de cultura

Explantes de eucalipto, provenientes de cultura-estoque citada no item 3.2.2, foram retirados dos tubos de ensaio nos quais estavam sendo cultivados e transferidos para placas de Petri. Com auxílio de pinças e bisturis, os explantes foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e esses fragmentos foram então transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios de cultura citados no item 3.2.3. Todo esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com utilização de ferramentas cirúrgicas e utensílios esterilizados por autoclavagem.

3.2.5. Coleta de dados

Um mês após a inoculação dos explantes nos meios com os tratamentos, houve a formação de plantas completas das quais foram coletados dados quanto ao número e comprimento de ramos por cultura. Para tal procedimento, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio, o número de ramos foi contado e comprimento de cada um foi medido com uma régua graduada em milímetros.

Também foi observado o número de culturas contaminadas para os meios autoclavado e esterilizados quimicamente.

3.3. Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de abacaxi (*Ananas comosus* L.)

3.3.1. Meio nutritivo

Tabela 3: Meio nutritivo para o cultivo de *Ananas comosus*

Sais (MS) inorgânicos*	Compostos orgânicos
NH ₄ NO ₃	30 g L ⁻¹ de sacarose
KNO ₃	2,0 mg L ⁻¹ de AIA(ácido 3-indolacético)
MgSO ₄	1,8 mg L ⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico)
KH ₂ PO ₄	2,2 mg L ⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,4 mg L ⁻¹ de tiamina.HCl
NaFeEDTA	100 mg L ⁻¹ de i-inositol
Micronutrientes	

* Os sais (MS) inorgânicos foram preparados e utilizados conforme Murashige e Skoog (1962).

► O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, para o meio autoclavado e para $6,0 \pm 0,1$, para o meio esterilizado quimicamente.

3.3.2. Origem dos explantes

O material vegetal utilizado nesse experimento foi proveniente de cultura-estoque dessa espécie (cv. Smooth Cayenne), mantida por passagens de 30 dias,

sob fotoperíodo de 16 horas e iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 27 ± 2 °C, em frascos de vidro contendo meio MS (item 3.3.1) esterilizado por autoclavagem (121 °C, por 15 minutos).

3.3.3. Preparo dos meios nutritivos

Os explantes foram inoculados em meio de cultura, frascos e outras condições iguais às da cultura-estoque, sendo, porém, o meio de cultura esterilizado conforme os tratamentos descritos a seguir.

Os tratamentos consistiram nas seguintes concentrações de cloro ativo total no meio de cultura: a) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional e autoclavado (controle A); b) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,0001 % de cloro ativo total ao meio de cultura; c) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,0003 % de cloro ativo total ao meio de cultura; d) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,0005 % de cloro ativo total ao meio de cultura; e) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,0007 % de cloro ativo total ao meio de cultura; f) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,0009 % de cloro ativo total ao meio de cultura e g) meio de cultura líquido preparado pelo protocolo convencional, mas sem autoclavar (controle B).

Após 15 minutos da adição do NaOCl aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$.

A água utilizada no preparo do meio de cultura consistiu em água deionizada, esterilizada com duas gotas por litro de água sanitária 2% em dias anteriores e uma gota adicionada à mesma água no momento do preparo do meio. A vidraria utilizada no preparo do meio, os frascos de cultura, as respectivas tampas e a bureta utilizada para encher os frascos de cultura foram enxaguados com água clorada a 0,003 % de cloro ativo total, com exceção dos tratamentos controle A e B, cujos utensílios foram enxaguados com água apenas deionizada. Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não estéril. O enchimento dos frascos foi efetuado na capela de fluxo laminar 15 minutos após o enxágüe destes em água clorada a 0,003 % de cloro ativo total.

3.3.4. Inoculação dos explantes nos meios de cultura

Rebentos, provenientes de cultura-estoque citada no item 3.3.2, foram retirados dos frascos nos quais estavam sendo cultivados e transferidos para placas de Petri. Com auxílio de pinças e bisturis, os rebentos foram então transferidos para frascos contendo 35 mL dos meios de cultura citados no item 3.3.3. Todo esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com utilização de ferramentas cirúrgicas e utensílios esterilizados por autoclavagem.

3.3.5. Coleta de dados

Um mês e meio após a inoculação dos explantes nos meios com os tratamentos, foram coletados dados quanto ao número de brotações e a biomassa fresca por cultura. Para tal procedimento, as plantas foram retiradas dos frascos, as brotações foram separadas e contadas e foi verificada a biomassa por cultura.

Também foi observado o número de culturas contaminadas para os meios autoclavados e esterilizados quimicamente.

3.4. Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura sobre a reação de sequóia (*Sequoia sempervirens* L.)

3.4.1. Meio nutritivo

Tabela 4: Meio nutritivo para o cultivo de *Sequoia sempervirens*

Sais (MS) inorgânicos*	Compostos orgânicos
NH ₄ NO ₃	30 g L ⁻¹ de sacarose
KNO ₃	0,4 mg L ⁻¹ de tiamina.HCl
MgSO ₄	100 mg L ⁻¹ de i-inositol
KH ₂ PO ₄	
CaCl ₂ .2H ₂ O	
NaFeEDTA	
Micronutrientes	

* Os sais (MS) inorgânicos foram preparados e utilizados conforme Murashige e Skoog (1962).

► O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, para o meio autoclavado e para $6,0 \pm 0,1$, para o meio esterilizado quimicamente.

3.4.2. Origem dos explantes

O material vegetal utilizado nesse experimento foi proveniente de cultura-estoque dessa espécie, mantida por passagens de 30 dias, sob fotoperíodo de 16 horas e iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo meio MS (item 3.4.1) esterilizado por autoclavagem ($121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos).

3.4.3. Preparo dos meios nutritivos

Os explantes foram inoculados em meio de cultura, frascos e outras condições iguais às da cultura-estoque, sendo, porém, o meio de cultura esterilizado conforme os tratamentos descritos a seguir.

Os tratamentos foram os seguintes: a) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional e autoclavado (controle A); b) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,002 % de cloro ativo total ao meio de cultura; c) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,003 % de cloro ativo total ao meio de cultura; d) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,004 % de cloro ativo total ao meio de cultura; e) meio de cultura esterilizado quimicamente com a adição de 0,005 % de cloro ativo total ao meio de cultura; e f) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional, mas sem autoclavar (controle B).

Após 15 minutos da adição do NaOCl aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ e os frascos de cultura introduzidos no forno de microondas para fusão do PHYTAGEL.

A vidraria utilizada no preparo e acondicionamento do meio de cultura foi proveniente do depósito, onde havia sido armazenada após o uso anterior, depois de lavada com detergente e enxaguada com água clorada a 0,001 % de cloro ativo total (preparada a partir de solução de hipoclorito de sódio a 6,75 % de cloro ativo total).

No momento de preparo do meio, a vidraria foi novamente enxaguada com água clorada com a mesma concentração de cloro ativo total citada, com exceção dos tratamentos controle A e B, cujos utensílios foram enxaguados com água apenas deionizada. O meio de cultura foi preparado com água clorada a 0,0005 % de cloro ativo total. Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não estéril. O enchimento dos frascos foi efetuado na capela de fluxo laminar 15 minutos após o enxágüe destes em água clorada a 0,003 % de cloro ativo total.

3.4.4. Inoculação dos explantes nos meios de cultura

Explantos de sequóia, provenientes de cultura-estoque citada no item 3.4.2, foram retirados dos tubos de ensaio nos quais estavam sendo cultivados e transferidos para placas de Petri. Com auxílio de pinças e bisturis, os explantes foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e esses fragmentos foram então transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios de cultura citados no item 3.4.3. Todo esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com utilização de ferramentas cirúrgicas e utensílios esterilizados por autoclavagem.

3.4.5. Coleta de dados

Um mês após a inoculação dos explantes nos meios com os tratamentos, houve a formação de plantas completas das quais foram coletados dados quanto ao número e comprimento de ramos por cultura. Para tal procedimento, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio, o número de ramos foi contado e o comprimento de cada um foi medido com uma régua graduada em milímetro.

Também foi observado o número de culturas contaminadas para os meios autoclavados e esterilizados quimicamente.

OBS: Todos os experimentos descritos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (fáfia), 7 tratamentos (eucalipto e abacaxi) e 6 tratamentos (sequóia), todos eles com 20 repetições (20

tubos de ensaio), cada tubo contendo um explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e Teste de Tukey.

3.5. Análise qualitativa de furfural no meio de cultura (Bobbio e Bobbio, 1995).

Foram adicionados, em um Erlenmeyer, 2 mL da amostra analisada, 2 mL de HCL concentrado (~ 37%) e 3 mL de água pura. Em seguida, a solução foi aquecida até o ponto de ebulição e uma tira de papel de filtro embebido em acetato de anilina (2mL de anilina + 20 mL de ácido acético 10%) foi colocada sobre a boca do frasco. A presença de furfural foi indicada pelo aparecimento de banda de coloração vermelho-carmin.

3.6. Determinação da concentração de cloro ativo total na solução de hipoclorito de sódio (Vogel, 1960).

Esse protocolo foi realizado para a quantificação de cloro ativo total nas soluções de hipocloritos de sódio utilizadas nos experimentos de esterilização química.

Em um Erlenmeyer foram colocados 2 mL da amostra a ser analisada, água deionizada q. s. p. 20 mL , 1 mL de ácido sulfúrico (1:25) e 1 mL de iodeto de potássio 10%. Em seguida, foi iniciada a titulação com o tiosulfato de sódio até que a amostra adquirisse coloração amarelada. Assim que a coloração amarelada foi atingida, foram adicionados 2 mL de amido 1%. Após a adição do amido, a titulação com o tiosulfato prosseguiu até que a amostra ficasse totalmente incolor. O volume de tiosulfato gasto foi anotado e utilizado na fórmula que se segue para o cálculo de cloro ativo total:

% de cloro ativo total = mL de TSS gasto x 0,1 x 0,0355 x 100, onde:

- 0,1 é a normalidade da solução de TSS utilizada;
- 0,0355 é o mili-equivalente do cloro;
- 100 deve-se ao fato de ser uma porcentagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da concentração de sacarose no meio de cultura de *Pfaffia glomerata*

Observa-se, nas Figuras 1-A e 1-B, que no tratamento A (com ausência de sacarose) não houve desenvolvimento dos calos, apresentando esses uma coloração bege escura. Nos demais tratamentos (B, C, D e E), observou-se, nesta ordem, mudança na coloração, variando de bege claro para verde. Também foi observada uma maior irregularidade de resposta ao calejamento do tratamento E. As culturas que menos reagiram ao calejamento apresentaram uma coloração bege mais escura.

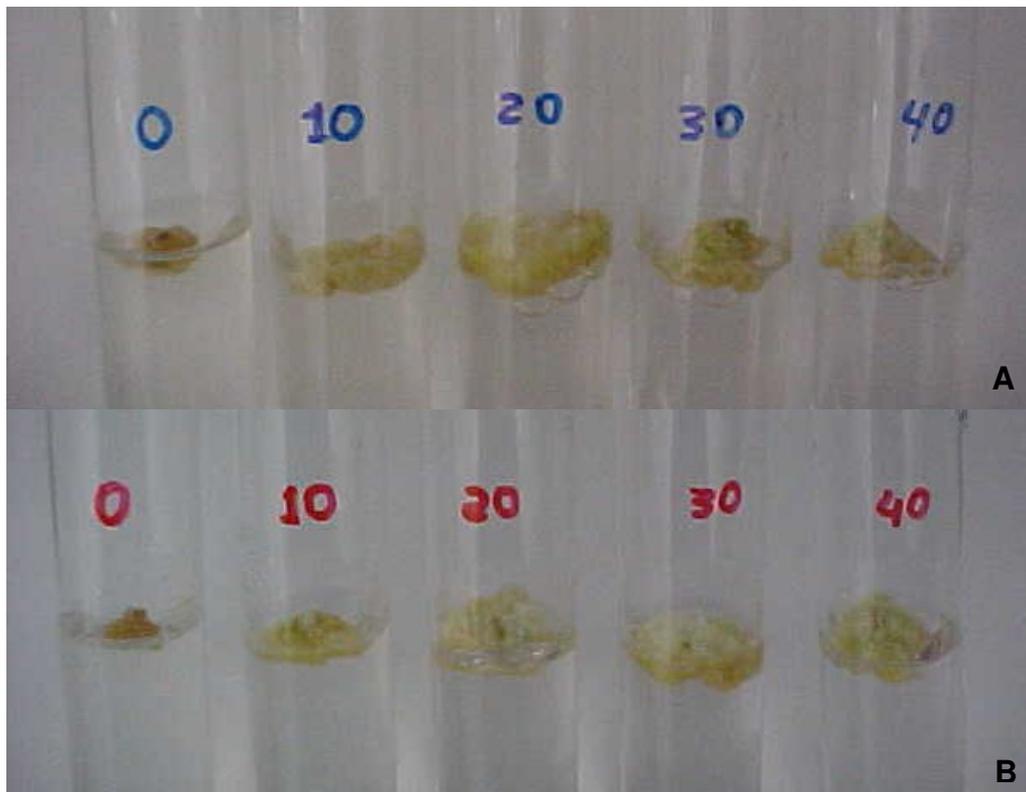


Figura 1: Calos cultivados em meios nutritivos esterilizados por autoclavagem (A) e por meio químico (B). Os números 0, 10, 20, 30 e 40 correspondem às concentrações de sacarose (g L^{-1}) dos tratamentos A, B, C, D e E, respectivamente.

A análise dos dados Figura 2 mostra que o peso dos calos nos tratamentos autoclavados aumentou até a concentração de 21 g L^{-1} de sacarose no meio e começou a cair logo em seguida. O peso dos calos nos tratamentos esterilizados quimicamente também aumentou continuamente até a concentração de 28 g L^{-1} de sacarose, quando então começaram a cair. Contudo, os valores atingidos pelos tratamentos esterilizados quimicamente foram sempre inferiores àqueles atingidos pelos meios autoclavados, os quais se igualaram à concentração de 27 g L^{-1} . A concentração de 30 g L^{-1} , que é aquela utilizada normalmente no meio de cultura, os valores médios da biomassa dos calos, em ambos os métodos de esterilização, se apresentaram estatisticamente iguais, segundo dados relacionados ao intervalo de confiança. A partir da concentração de 30 g L^{-1} de sacarose no meio nutritivo ocorreu uma inversão na velocidade de queda dos pesos, ou seja, os valores médios dos pesos da biomassa fresca dos calos dos meios de cultivo esterilizados quimicamente

foi superior àqueles observados nos meios de cultivo esterilizados por autoclavagem, sugerindo que o cloro adicionado no meio esterilizado quimicamente estaria tendo um efeito negativo sobre a reação de calejamento em baixas concentrações de sacarose, e que uma alta concentração de sacarose poderia estar resultando na formação de uma maior quantidade de furfural do meio autoclavado, o qual poderia estar comprometendo mais fortemente o desenvolvimento dos calos do que a presença do cloro.

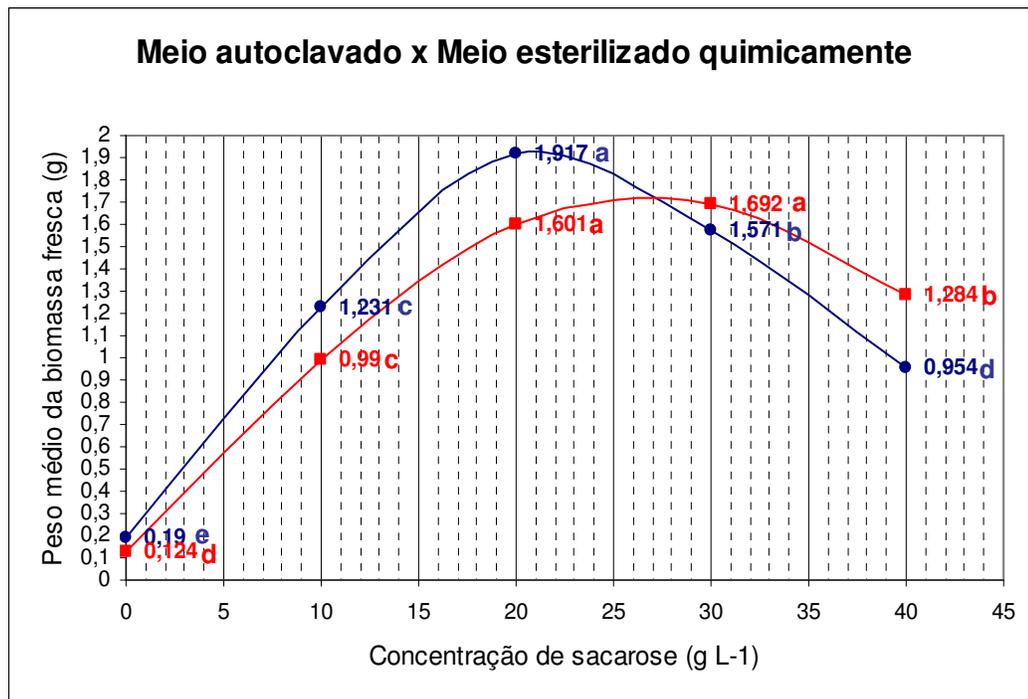


Figura 2: Peso médio da biomassa fresca dos calos de *P. glomerata*, nos dois métodos de esterilização. A curva em azul corresponde aos tratamentos esterilizados por autoclavagem e a curva em vermelho corresponde aos tratamentos esterilizados quimicamente. Os dados acompanhados de, pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2. Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de *Eucalyptus pellita*

Na tabela 5 e nas Figuras 3 e 4 encontram-se os dados referentes ao teste com adição de cloro ao meio de cultura. O tratamento no qual não foi feita esterilização por nenhum dos dois métodos (autoclavagem ou esterilização química), não foi incluído nas Figuras 3 e 4, devido ao fato de não terem sido tomados dados referentes a esse tratamento, uma vez que todas as culturas apresentaram-se contaminadas e foram eliminadas.

Pela tabela 5 observa-se, quanto à porcentagem de contaminação, não ter havido diferença estatística entre as diferentes concentrações de cloro ativo total no meio de cultura, mas houve diferença entre estes e o meio não esterilizado por qualquer dos métodos. Embora tenha ocorrido pequena taxa de contaminação nos tratamentos que foram adicionadas concentrações de cloro ativo total inferiores a 0,005%, nas concentrações superiores ou iguais a esta não se observou nenhuma contaminação, indicando serem estas concentrações seguras nesse sentido.

Tabela 5: Número e porcentagem de culturas de eucalipto contaminadas em função da concentração de cloro ativo total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Cloro ativo total adicionado ao meio de cultura (%)	Número de culturas contaminadas	Porcentagem de culturas contaminadas
0 (autoclavado)	4 b	20
0,001	8 b	40
0,003	4 b	20
0,005	0 b	0
0,007	0 b	0
0,009	0 b	0
Sem esterilização	20 a	100

Em relação aos resultados apresentados na Figura 3, observou-se que o comprimento médio dos ramos foi menor no tratamento esterilizado por autoclavagem quando comparado com os tratamentos esterilizados quimicamente.

Entre estes, os maiores comprimentos de ramos ocorreram nos tratamentos com as concentrações superiores ou iguais a 0,005 % de cloro ativo total no meio de cultura.

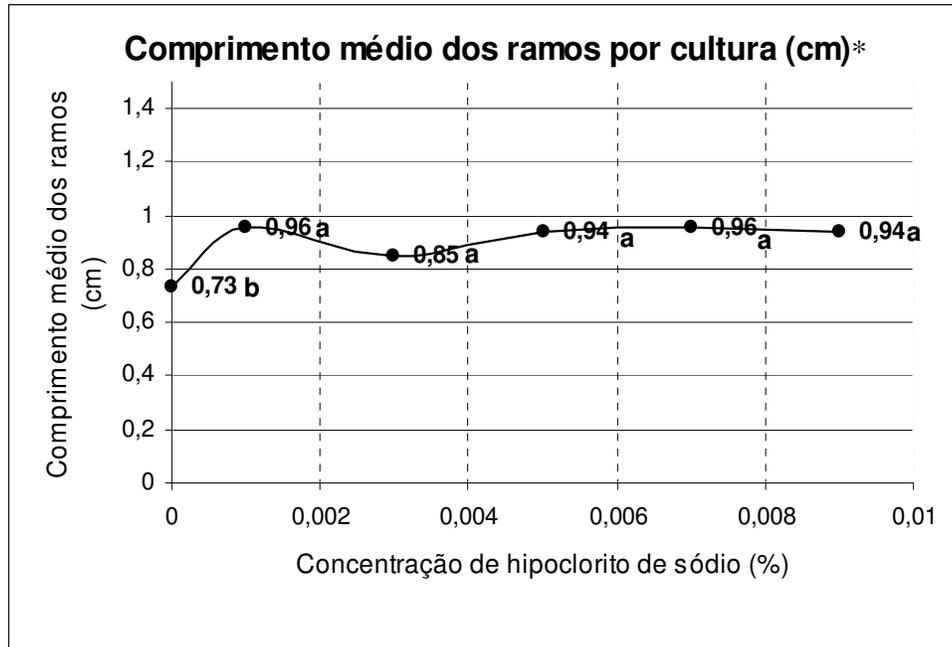


Figura 3: Comprimento médio dos ramos de *E. pellita* por cultura em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*A concentração zero de cloro ativo total corresponde ao tratamento autoclavado.

Na Figura 4, por sua vez, observa-se que um maior número médio de ramos foi observado no tratamento esterilizado por autoclavagem. Levando-se em consideração que, em geral, um maior número de ramos implica em um menor comprimento desses, esta correspondência pode ser vista nos dois gráficos, onde se observa que ao maior número médio de ramos para o tratamento esterilizado por autoclavagem, corresponde um menor comprimento médio de ramos para esse tratamento na Figura 3.

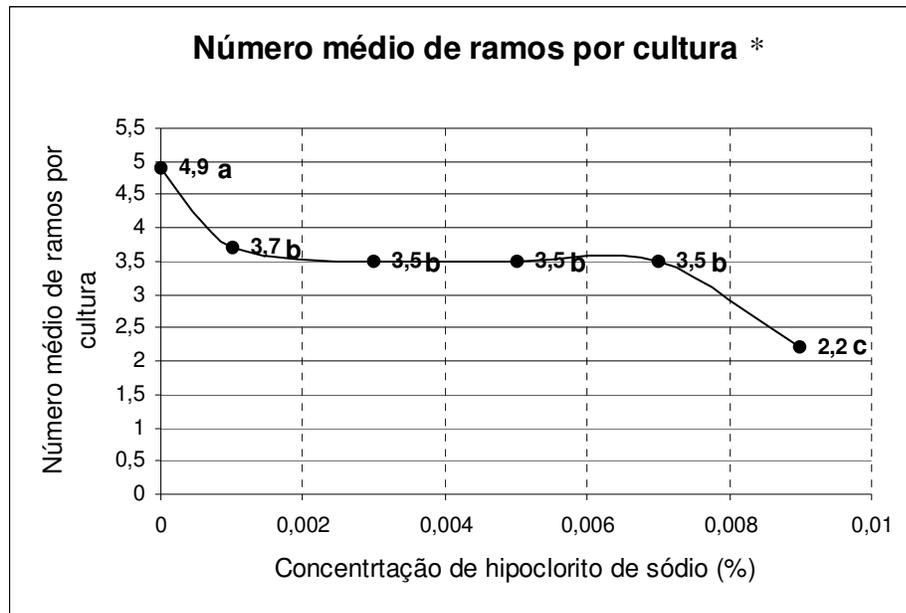


Figura 4: Número médio de ramos de *E. pellita* por cultura, em função das diferentes concentrações (%) de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* A concentração zero de cloro ativo total corresponde ao tratamento autoclavado.

Estes resultados sugerem a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio para a esterilização de meios nutritivos para cultivo *in vitro* de Eucalipto. As concentrações que poderiam ser utilizadas estariam entre 0,005 e 0,007% de cloro ativo total no meio. Isso porque essas concentrações resultaram em nenhuma contaminação no meio nutritivo, bem como em um maior comprimento médio de ramos.

Quando comparados com o meio autoclavado, estas concentrações de cloro ativo total no meio de cultura resultaram num comprimento total de ramos igual a 3,29 cm ($3,5 \times 0,94$), portanto pouco inferior aos 3,58cm ($4,9 \times 0,73$) apresentados pelos ramos do tratamento autoclavado. Apesar desta pequena diferença em rendimento, as demais vantagens apresentadas pelo meio esterilizado quimicamente superam em muito esta desvantagem.

4.3. Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de *Ananas comosus*

A Figura 5 mostra uma cultura de abacaxi proveniente de seis dos sete tratamentos realizados, levando-se em consideração que não foram tomados dados do tratamento não esterilizado (tratamento G), uma vez que todas as culturas se encontraram contaminadas e foram eliminadas. Não se observaram diferenças morfológicas significativas entre as plantas de todos os tratamentos, havendo diferenças apenas quanto ao número de brotações.

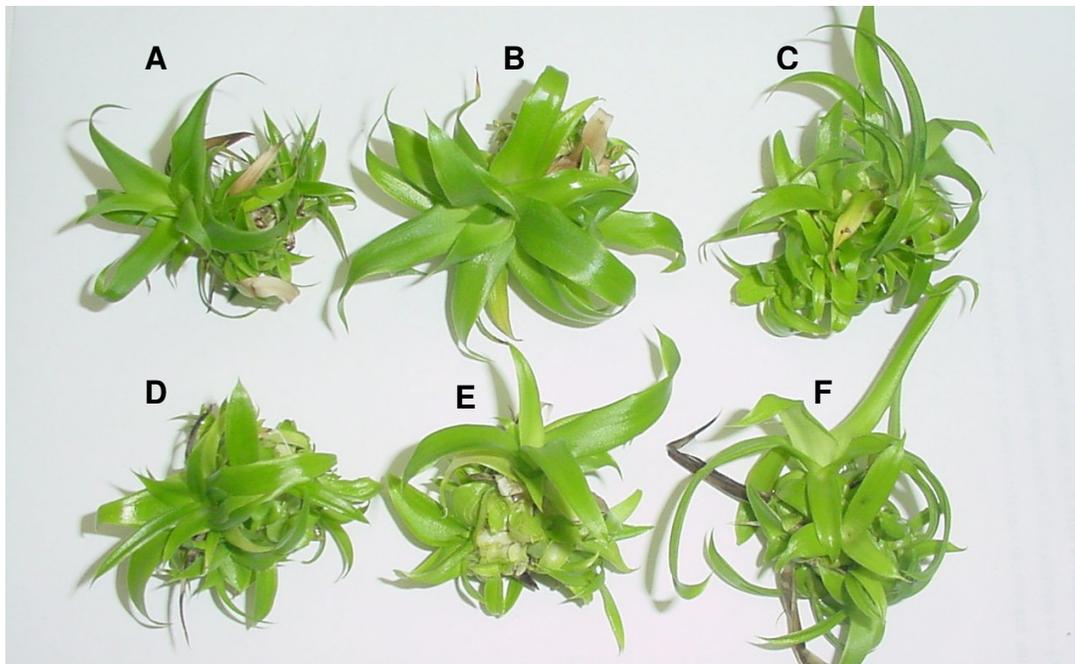


Figura 5: Uma cultura de *A. comosus* proveniente de cada um dos seis tratamentos A, B, C, D, E e F.

A tabela 6 mostra dados referentes ao número de culturas contaminadas. Apesar da pequena porcentagem de contaminação observada nos tratamentos autoclavados e naquele contendo 0,0001% de cloro ativo total, a partir da concentração de 0,0003% de cloro ativo total não se observou qualquer cultura contaminada, indicando serem estas concentrações seguras quanto à eficiência neste sentido.

Tabela 6: Número e porcentagem de culturas de abacaxi contaminadas em função da concentração de cloro ativo total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Cloro ativo total adicionado ao meio de cultura (%)	Número de culturas contaminadas	Porcentagem de culturas contaminadas
0 (autoclavado)	5 b	25
0,0001	2 bc	10
0,0003	0 c	0
0,0005	0 c	0
0,0007	0 c	0
0,0009	0 c	0
Sem esterilização	20 a	100

As figuras 6 e 7 mostram dados referentes apenas aos tratamentos A, B, C, D, E e F.

O tratamento G, correspondente ao tratamento no qual não foi feita esterilização por nenhum dos dois métodos (autoclavagem ou esterilização química), não consta nos gráficos, devido não terem sido tomados dados referentes a esse tratamento, uma vez que todas as culturas apresentaram-se contaminadas e foram eliminadas

Em relação aos resultados apresentados na Figura 6, observou-se que o peso médio da biomassa fresca foi menor no tratamento esterilizado por autoclavagem quando comparado com os tratamentos esterilizados quimicamente, os quais apresentaram valores estatisticamente iguais entre si, porém muito superiores ao tratamento autoclavado. Entretanto, pode-se observar na Figura 7, que o maior número de brotações foi apresentado pelo tratamento C (0,0003% de cloro ativo total adicionado ao meio de cultura). O número médio de brotações do tratamento C não foi apenas o maior, mas também estatisticamente diferente dos valores de todos os outros tratamentos, sendo muito superior ao número médio de brotações do tratamento autoclavado. Sendo assim, pode-se sugerir a viabilidade de esterilização química de meio nutritivo para cultivo *in vitro* de abacaxizeiro (cv. Smooth Cayenne) adicionando-se 0,0003% de cloro ativo total ao meio nutritivo.

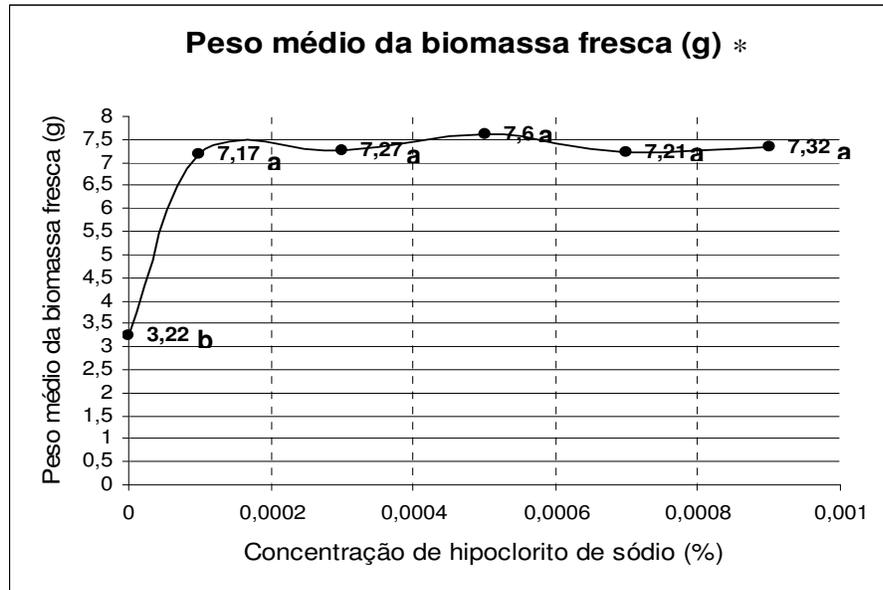


Figura 6: Peso médio da biomassa fresca de *A. comosus* por cultura em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* A concentração zero de cloro ativo total corresponde ao tratamento autoclavado.

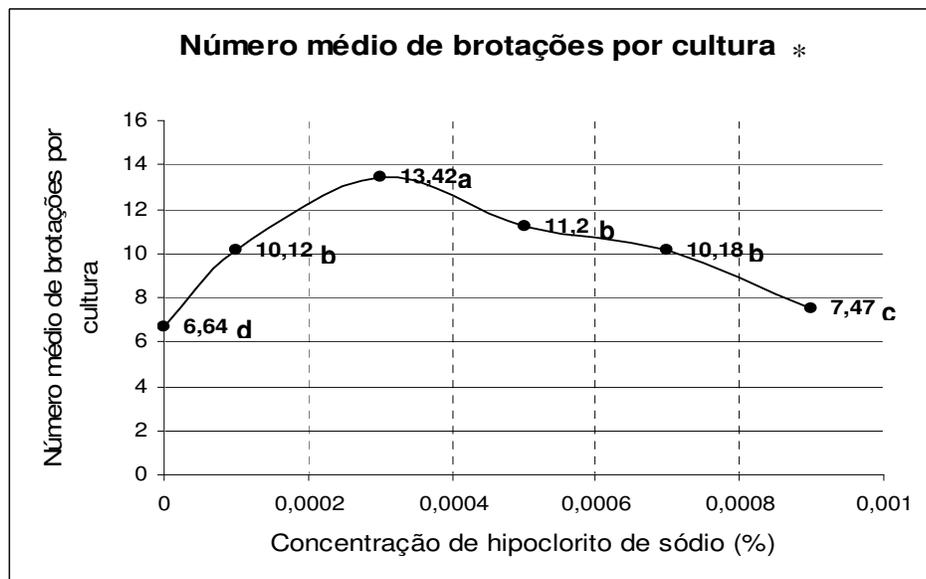


Figura 7: Número médio de brotações de *A. comosus* por cultura em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* A concentração zero de cloro ativo total corresponde ao tratamento autoclavado.

4.4) Influência da concentração de cloro ativo total no meio de cultura de *Sequoia sempervirens*

A Figura 8 mostra uma cultura de cada um dos seis tratamentos, sendo cada tratamento constituído por 20 tubos de ensaio.



Figura 8: Ramos de *S. sempervirens* representativos de cada um dos seis tratamentos A, B, C, D, E e F.

Não se observaram diferenças morfológicas significativas entre as plantas de todos os tratamentos, havendo diferenças apenas quanto ao número e ao comprimento dos ramos.

A tabela 7 mostra dados referentes ao número de culturas contaminadas. O tratamento F teve todas as suas culturas contaminadas e todas as contaminações se encontravam no interior do meio de cultura como pontos brancos (contaminação por fungo).

De acordo com os dados da tabela 7, o tratamento autoclavado A e os tratamentos B, C, D e E, esterilizados quimicamente, apresentaram número de culturas contaminadas estatisticamente iguais entre si e menores do que o valor apresentado pelo tratamento F. A partir da concentração de 0,0005% de cloro ativo total no meio de cultura não ocorreu qualquer contaminação, indicando serem estas concentrações seguras neste sentido.

Tabela 7: Número e porcentagem de culturas de sequóia contaminadas em função da concentração de cloro ativo total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Cloro ativo total adicionado ao meio de cultura (%)	Culturas contaminadas	Porcentagem de culturas contaminadas
0 (autoclavado)	1 b	5
0,002	1 b	5
0,003	0 b	0
0,004	0 b	0
0,005	0 b	0
Sem esterilização	20 a	100

As Figuras 9 e 10 mostram dados referentes aos tratamentos A, B, C, D e E. O tratamento F, correspondente àquele no qual não foi feita esterilização por nenhum dos dois métodos (autoclavagem ou esterilização química), não foi adicionado aos gráficos, devido terem todas as culturas sido contaminadas.

De acordo com a Figura 9, o valor médio de número de ramos por cultura foi mais elevado para as concentrações de 0,002 e 0,003% de cloro ativo total no meio de cultura. Todos os tratamentos esterilizados quimicamente apresentaram valores superiores àquele observado no tratamento controle autoclavado.

Na figura 10, pode-se observar que os tratamentos B, C, D e E apresentaram comprimentos médios de ramos estatisticamente diferentes do valor observado no tratamento controle autoclavado, porém pouco abaixo dele. Contudo, os comprimentos totais dos ramos por cultura, nos tratamentos B, C e D ultrapassaram 13 cm, enquanto no tratamento autoclavado não chegaram a atingir 12 cm. Esse resultado concorda com os resultados anteriores e reforça a afirmativa de que a formação de um maior número de ramos, resulta quase sempre em menor comprimento médio destes.

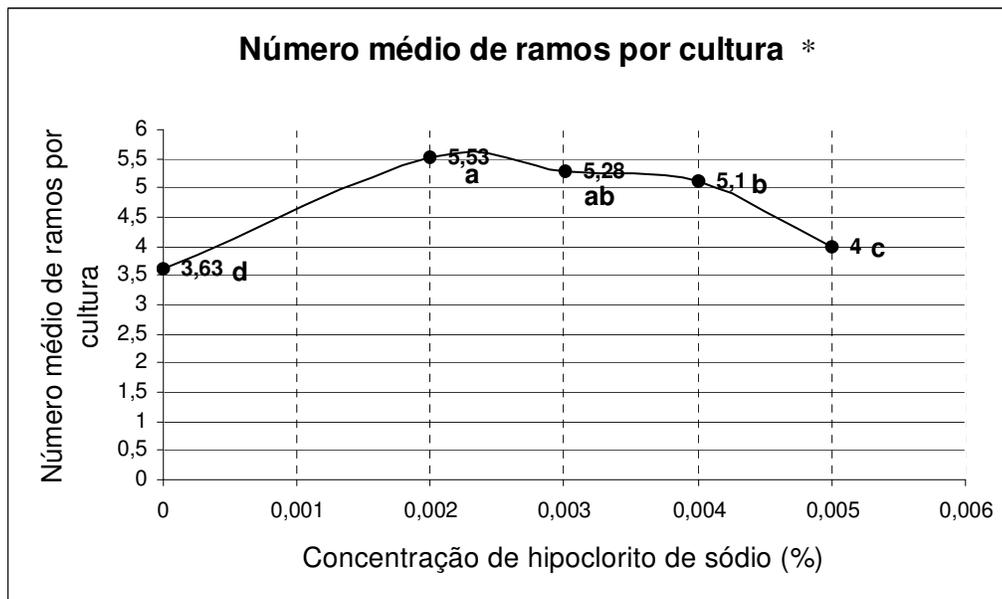


Figura 9: Número médio de ramos de *S. sempervirens* por cultura em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

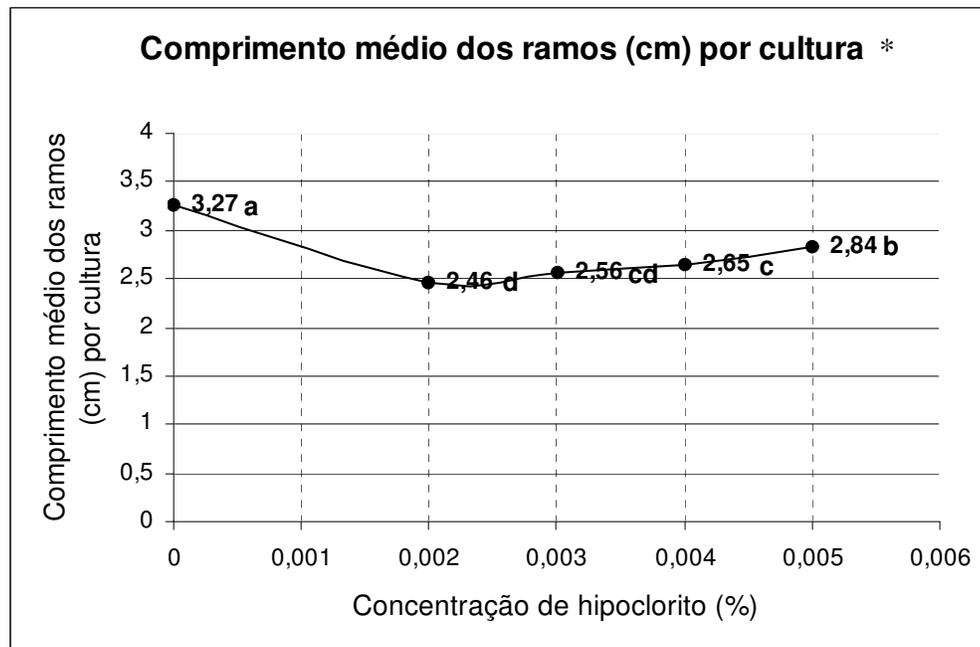


Figura 10: Comprimento médio dos ramos de *S. sempervirens* por cultura em função das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* A concentração zero de cloro ativo total corresponde ao tratamento autoclavado.

Levando-se em conta estas considerações e também que a partir da concentração de 0,003% de cloro ativo total no meio de cultura não ocorreu nenhuma cultura contaminada, as concentrações de 0,003 e 0,004% seriam as mais recomendadas para esterilização química de meio nutritivo para crescimento *in vitro* de *S. sempervirens*.

4.5. Análise qualitativa de furfural em meios de cultura autoclavados e esterilizados quimicamente

Para esse teste foram utilizados, como amostras, os tratamentos autoclavados e um tratamento, dentre os esterilizados quimicamente que apresentaram o melhor resultado em cada um dos experimentos.

No experimento com a Fáfia foram utilizados os tratamentos contendo 30g L⁻¹ de sacarose, autoclavado e esterilizado quimicamente. No experimento com o eucalipto, utilizou-se o tratamento controle autoclavado e o tratamento E (0,005% de cloro ativo total no meio nutritivo); no experimento com o abacaxi utilizou-se o tratamento controle autoclavado e o tratamento C (0,0003% de cloro ativo total no meio nutritivo) e no experimento com a sequóia utilizou-se o tratamento controle autoclavado e o tratamento C (0,0003% de cloro ativo total no meio de cultura).

Levando-se em consideração que os resultados da análise da presença de furfural para os experimentos com a fáfia, eucalipto, abacaxi e sequóia foram os mesmos, a Figura 11 mostra apenas o resultado que foi observado para cada um dos dois grupos.

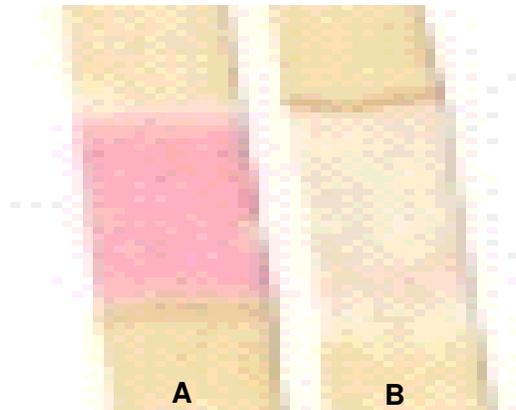


Figura 11: Análise qualitativa de furfural em meios nutritivos esterilizados por autoclavagem (A) e meios nutritivos esterilizados quimicamente (B).

Os resultados observados em todas as análises foram os mesmos: nos meios autoclavados de todos os experimentos ocorreu o aparecimento de uma coloração avermelhada no papel filtro. Entretanto, quando a amostra era um dos meios esterilizados quimicamente de cada um dos experimentos, o papel filtro permaneceu sem coloração. Esses resultados indicam que o processo de autoclavagem realmente promove a decomposição da sacarose e a formação de furfural.

O fato dos meios autoclavados e daqueles com as concentrações mais baixas de cloro ativo total nos meios de cultura, em todos os experimentos com as quatro espécies, apresentarem ainda que uma pequena taxa de contaminação, indica que esta não estava no meio de cultura, resultando portanto, de falhas no manuseio dos explantes, ferramentas cirúrgicas e vidraria, no momento da inoculação do meio de cultura, ou então foi introduzida no meio, por explantes contaminados, provenientes de cultura *in vitro*. No caso do abacaxizeiro e eucalipto, como em outras espécies, sabe-se que apresentam elevada taxa de contaminação latente, ou seja, que aparecem depois de muito tempo em culturas mantidas na sala de crescimento (George, 1993; Leifert *et al.*, 1994; Ponce, 1998).

A ocorrência de uma elevada taxa de contaminação das culturas, por qualquer que seja a via, ficou confirmada pela contaminação total das culturas do tratamento testemunha que não foi esterilizado por qualquer dos dois métodos testados.

Por outro lado, a inexistência de contaminação em culturas semi-sólidas contendo cloro ativo total nas concentrações iguais ou superiores a 0,003% em eucalipto e 0,005% em sequóia, cujos meios foram submetidos ao aquecimento no

forno de microondas para fusão do agente gelificante, bem como nas concentrações iguais ou superiores a 0,0003% em meio líquido de abacaxizeiro, que não foi submetido a esta operação, indicam que a presença de cloro no meio de cultura, a partir destas concentrações, eliminou toda a contaminação que certamente teria ocorrido pelas vias citadas, o que significa uma vantagem extra da técnica de esterilização química. Resultados semelhantes foram relatados por Teixeira *et al.* (2005 a,b, c, d).

A aparente discrepância entre a concentração mais eficiente de cloro ativo total para a esterilização do meio do abacaxizeiro e as concentrações ótimas observadas nos outros dois testes, sendo estas cerca de 10 vezes superiores àquela, se explica pelo fato de os dois meios citados terem sido aquecidos no forno de microondas, o que não foi feito com o meio do abacaxizeiro. Como a temperatura elevada acelera a destruição da molécula do hipoclorito de sódio (Meyer, 1994), certamente que a concentração de cloro residual nos dois meios citados, no final do processo de sua preparação, se situou em torno também de 0,0003%.

As concentrações ótimas de cloro ativo total observadas neste trabalho diferem em muito daquelas relatadas por Yanagawa *et al.* (1995), as quais só foram bem sucedidas, quanto à obtenção de assepsia, quando esterilizaram o meio com 0,01 % de NaClO e o pulverizaram com 0,5 % do mesmo esterilizante. Neste trabalho, ficou claro que as quantidades usadas pelos autores citados são altamente prejudiciais às culturas e que há possibilidade de se esterilizar meios de cultura com quantidades muito inferiores de cloro, desde que se aplique a metodologia utilizada nesta pesquisa. Antes de desenvolverem esta metodologia, Teixeira *et al.* (2004) também só conseguiram esterilização completa do meio de cultura com concentrações muito elevadas de cloro.

O menor desenvolvimento dos calos de fáfia no meio de cultura esterilizado quimicamente, em relação ao meio autoclavado, nos tratamentos com concentrações até 30g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura, sugere que o cloro estaria tendo um efeito negativo sobre a reação de calejamento. A sua ação tóxica sobre as plantas, quando empregados em concentrações acima de certos limites, é conhecida (Emmanuel *et al.*, 2004). Entretanto, a queda mais acelerada dos pesos médios dos calos nos meios de cultura autoclavados, em relação aos meios esterilizados

quimicamente, a partir da concentração de 27g L^{-1} de sacarose no meio nutritivo, leva a supor que acima desta concentração a quantidade de furfural formada como resultado da decomposição da sacarose pelo aquecimento (Cheftel e Cheftel, 1992; Bobbio e Bobbio, 1995; Araújo, 1999), passe a ser mais prejudicial aos tecidos da fáfia do que o dano causado pelo cloro, cuja concentração é constante no meio de cultura.

O elevado estímulo causado pela presença de cloro nos meios de cultura esterilizados quimicamente, quando comparados aos meios autoclavados, sobre o número de rebentos e o peso de biomassa fresca do abacaxizeiro, bem como a sua influência positiva sobre o número médio de ramos de sequóia e o comprimento médio de ramos de eucalipto, e sabendo-se que o cloro em presença de compostos orgânicos forma com estes compostos clorados que ficam retidos no meio (Meyer, 1994; Macedo *et al.*, 2004), é provável que alguns destes compostos seja o responsável pela sua influência benéfica. É sabido também que o cloro exerce função de catalizador da quebra da molécula de água no processo da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2004), e, como esta função fisiológica é em geral praticamente nula em culturas *in vitro* (George e Sherrington, 1984), é possível também supor que aí se encontre a explicação, pelo menos em parte, para este comportamento benéfico do cloro adicionado ao meio de cultura como esterilizante. A essencialidade do cloro às plantas é bem conhecida (Emmanuel *et al.*, 2004).

A ocorrência de menor número médio de ramos por cultura de eucalipto e menor comprimento médio de ramos por cultura de sequóia nos meios esterilizados quimicamente, quando comparados aos meios autoclavados, se explicaria pela relação antagônica existente entre estes dois parâmetros, ou seja, sempre que o número de ramos aumenta o comprimento deles diminui, e vice-versa, já que a biomassa total produzida estará em função da quantidade de nutrientes disponível no ambiente limitado do frasco de cultura. Assim, considerando-se que a biomassa total por cultura pode ser representada, neste caso, pelo comprimento total de ramos produzidos por cultura, o que pode ser obtido multiplicando-se o número médio de ramos produzidos por cultura, pelo comprimento médio deles também por cultura, ter-se-ia, para o eucalipto, 3,58cm total para o meio esterilizado quimicamente e 3,29cm total para a concentração de cloro ativo total que ofereceu a melhor resposta

dentre os tratamentos com hipoclorito de sódio. Para a sequóia estes valores são 11,9 cm e 13,6 cm, respectivamente, para os dois meios na ordem citada, neste caso, o total de biomassa produzida sendo até mesmo favorável ao meio esterilizado quimicamente.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

- É possível obter assepsia de meios de cultura mediante o emprego de concentrações reduzidas de hipoclorito de sódio no meio nutritivo, quando combinadas a outras medidas de assepsia adotadas nesta pesquisa;
- A adoção do procedimento de esterilização química dispensa o uso de autoclave para esterilização de meios nutritivos e vidrarias;
- Concentrações superiores que 0,003% de cloro ativo total em meios de cultura semi-sólidos, submetidos a tratamento de fusão do agente gelificante em forno de microondas, asseguram total esterilização do meio nutritivo;
- Concentrações superiores ou iguais a 0,0003% de cloro ativo total em meios de cultura líquidos, não submetidos a tratamento em forno de microondas, asseguram total esterilização do meio nutritivo;
- A intensidade máxima de calejamento dos tecidos de fáfia ocorre às concentrações de sacarose entre 20 e 30 g L⁻¹ e é maior nos meios autoclavados;
- As concentrações entre 0,005 e 0,007% de cloro ativo total no meio de cultura de *Eucalyptus pellita* estimulam a formação de ramos com maiores comprimentos médios, embora em menor número do que em meio autoclavado ;
- Concentrações entre 0,0003 e 0,0005 % de cloro ativo total no meio de cultura de *Ananas comosus* estimulam a formação de maior número de brotações e maior peso de biomassa fresca;

- As concentrações entre 0,003 e 0,004% de cloro ativo total no meio de cultura de *Sequoia sempervirens* induzem a formação de ramos em maior número, porém com menor comprimento do que em meio autoclavado;
- A autoclavagem de meios de cultura por 15 minutos a 121⁰ C e 1,05 kg/ cm² de pressão resulta na formação de furfural no meio nutritivo, o mesmo não acontecendo em meios esterilizados com hipoclorito de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agramonte, D., Daniels, D., Jiménez, F., Pérez, J., Pérez, M., Ramírez, D., Gutiérrez, O. (1999) Efecto del tipo de iluminación em la propagación de la papa (*Solanum tuberosum* L.). In: Instituto de Biotecnología de las Plantas (ed.) *Biotecnología Vegetal*. Villa Clara: Cuba, p. 138-139.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T., Takayama, S. (1995) Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. e Smith, M. A. L. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. London, Kluwer Academic Publishers, p. 1-18.
- Antoniolli, L. R., Benedetti, B. C., Filho, M. S. M. S., Borges, M. F. (2005) Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi “Pérola” minimamente processado. *Rev. Bras. Frut.* 27: 157-160.
- Araujo, M. C., Teixeira, S. L. (1998) Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. Reunião de Programação de Pesquisas do CCTA – RESUMOS. Novembro de 1998. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ, Resumo 154.

- Araujo, M. C., Teixeira, S. L. (1999) Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. Encontro de Iniciação Científica da UENF, 5, Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, p. 81.
- Araújo, A. E. S, Castro, A. P. G., Rossetto, C. A. V. (2004) Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. *Rev. Bras. Sementes*. 26: 45-54
- Ball, E. (1953) Hydrolysis of sucrose by autoclaved media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. *Bul. Torrey Bot. Club*. 80: 409-411.
- Baruffaldi, R., Penna, T. C. V., Machoshvili, I. A., Abe, L. E. (1984) Tratamento químico de hortaliças poluídas. *Rev. Saúde Públ.* 18: 225-234.
- Biela, A. M. (1985) Can baby feeding equipment be sterilized in the domestic microwave oven? *Journal of the Royal Society of Health* , 105: 131-132.
- Bobbio, F. O., Bobbio, P. A. (1995) Manual de Laboratório e Química de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela.
- Burger, D. W. (1988) Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. *HortScience* 23: 1066-1068.
- Cheftel, J., Cheftel, H. (1992) Introduccion a la bioquímica y tecnologia de los alimentos. 2.ed. Zaragoza: Editora Acribia
- Chu, I. (1995) Economic analysis of automated micropropagation. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. e Smith, M. A. L. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. London: Kluwer Academic Publishers, p. 19-28.

- Cox, J., Bhatia, P., Ashwath, N. (2003) *In vitro* spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Scientia Horticulture*, 97: 369-378.
- Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J., Vermande, P., Perrodin, Y. (2004) Toxicological effects of disinfestation using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Enviroment International*, 30: 891-900.
- Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó. J. C. E., Marchesan, M. A., Pércora, J. D. (2002) Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. *Baz. Dent. J.* 13(2): 113-117.
- George, E. F., Sherrington, P. D. (1984) Plant Propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. England: Eastern Press
- George, E. F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd Ed., p. 130-143. Exergetics Ltd.
- González, E. A. J. (1998) Generalidades del Cultivo *in vitro*. In: Ponce, J. N. P. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Villa Clara: p. 13-24.
- Jeng, D. K. H. (1987) Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2133-2137.
- Keller, M. D.; Bellows, W. K., Guillard, R. R. J. (1988) Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 117: 279-283.
- Latimer, J. M., Matsen, J. M. (1977) Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiology*, 6: 340-342.

- Leifert, C., Morris, C. E., Waites, W. M. (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Science*, 13: 139-183.
- Macedo, J. A. B. (2004) Uso de derivados clorados orgânicos no processo de desinfecção de água para abastecimento público. Anais do Congresso Brasileiro de Química Fortaleza: Sociedade brasileira de química
- Meyer, S. T. (1994) O uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Caderno de Saúde Pública*, 10(1): 99-110.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nemeth, J. F., Sherman, L. R., Milis, S. E., Plamondon, T. J. (1997) The Measurement of chlorine activity in biofilm contaminated dental unit water lines. *Microchemical Journal*, 55: 134-144.
- Pérez, P. A. O. (1998) Introduccion a la propagación masiva. In: Ponce, J. N. P. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Villa Clara: p. 125-133.
- Ponce, J. N. P. (1998) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas (ed.) *Biotecnología vegetal*. Santa Clara: Cuba.1: 207-224.
- Ponce, J. N. P., Castellá, M. S., Pérez, P. O. (2000) Possibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. In: Instituto de Biotecnología de las Plantas (ed.) *Biotecnología Vegetal*. Villa Clara: Cuba, nº 1, p. 3-12.
- Rohrer, M. D., Bullard, R. A. (1985) Microwave sterilization. *JADA*, 119: 194-198.

- Rosaspina, S., Anzanel, D., Salvatorelli, G. (1993) Microwave sterilization of enterobacteria. *Micróbios*, 76: 263-270.
- Rossoni, E. M. N., Gaylarde, C. C. (2000) Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 61: 81-85.
- Sanborn, M. R.; Wan, S. K., Bullard, R. (1982) Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl. Environ. Microbiology*, 44: 960-964.
- Saran M., Speier, I. B., Fellerhoff, B., Bauer, G. (1998) Phagocytic killing of microorganisms by radical processes and consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radical Biology e Medicine*, 26: 482-490.
- Sherbondy, A. L., Cooper, C. S., Kalinowski, S. E., Boyt, M. A., Hawtery, C. E. (2002) Variability in catheter microwave sterilization techniques in a single clinic population. *Journal of Urology*, 168: 562-564.
- Snow, R. (1985) Improvements in methods for the germination of orchid seeds. *Amer. Orch. Society Bull*, 54: 178-181.
- Street, H. E., Lowe, J. S. (1950) The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Annals of Botany* 14: 307-329.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed

- Teixeira, S. L.; Sousa, R. T. S., Teixeira, M. T. (2004) Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. *Rev. Ceres*, 52(302): 499-507.
- Teixeira, S.L. (2005) Chemical sterilization of culture media. *Hort. Bras. (Suppl.)* 23(2): 668.
- Teixeira S.L., Campanati M., Teixeira M.T., Almeida, R. F. (2005a) Sterilization of nutrient medium for plant tissue culture, by combining chemical sterilants with microwave oven. *Rev. Ceres*, 52 (301): 343-349.
- Teixeira, S.L, Teixeira M.T., Ribeiro, J.M. (2005b) Chemical sterilization of culture medium: 1.culture flasks and covers - rinsing with chlorinated water. *Hort. Bras. (Suppl.)*, 23(2): 591.
- Teixeira, S.L., Teixeira, M.T., Ribeiro J.M. (2005c) Chemical sterilization of culture medium: 2.addition of sodium hypochlorite to the medium. *Hort. Bras. (Suppl.)* 23 (2): 591.
- Teixeira, S.L., Teixeira, M.T., Ribeiro J.M. (2005d) Chemical sterilization of culture medium: 3.flasks filling and medium inoculation under non-sterile environment. *Hort. Bras. (Suppl.)*, 23(2): 592
- Tisserat, B.; Jones, D., Galletta, P. D. (1992) Microwave sterilization of plant tissue culture media. *HortScience*, 27: 358-361.
- Tsai, C. T., Kuo, C. T., Lin, S. T. (1998) Analysis of organic halides in hospital waste sludge disinfected using sodium hypochlorite (NaOCl). *Water Research*, 33: 778-784.

- Veschetti, E., Cutilli, D., Bonadonna, L., Briancesco, R., Martini, C., Cencchini, G., Anastasi, P., Ottaviani, M. (2003) Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. *Water Research* 33: 78-94.
- Vianna, M. E., Gomes, B. P. F. A., Berber, V. B., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., Souza-Filho, J. (2004) In vitro evaluation of antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 97: 79-84.
- Vogel, A. I. (1960) Química Analítica e Quantitativa. Volumetria y Gravimetria. Longmans, Green e Co., Londres, 2ª edição, p.650.
- Yanagawa, T., Nagai, M., Ogino, T., Maeguchi, R. (1995) Application of disinfectants to orchid seeds, plantelets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. *Lyndleyana*, 10(1): 33-36.