



MICROPROPAGAÇÃO

A DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

Como observado no Guia 80: *Micropropagação no laboratório de ensino*, um dos passos mais críticos nas técnicas de cultivo *in vitro* é a desinfecção dos explantes, que começa com um bom lavado em água e sabão ou detergente. Uma vez o explante bem limpo procede-se à desinfecção com agentes químicos. Os mais econômicos e simples de usar são o álcool 70^o e o hipoclorito de sódio, vendido comercialmente como água sanitária no Brasil, *lavandina* na Argentina e *água jano* no Chile e outros países latino-americanos.

Uma imersão de 1 a 2 minutos em álcool 70^o permite eliminar bolhas de ar e dissolver a camada epicuticular dos explantes, mas não garante a esterilização do explante. Essa é a função da água sanitária.

Em muitos países a concentração de matéria ativa (NaClO) da água sanitária é de 5%, e os protocolos correspondentes recomendam utilizar diluições de 10 a 20% (v/v). No Brasil, onde a legislação determina que o teor de matéria ativa (NaClO) da água sanitária seja de 1,5 a 2%, a diluição equivalente para a desinfecção do explante está entre 25 e 50%

Nós preferimos fixar em 50% a concentração da solução desinfetante de água sanitária e modificar o tempo de imersão em função do tipo de explante. Como medida adicional a solução desinfetante é preparada em um frasco estéril. Vale a pena destacar que uma desinfecção externa bem sucedida não elimina as contaminações internas, que podem aparecer dias mais tarde de semeadura do explante.

Uma vez desinfetado o explante, retira-se o hipoclorito em três lavados sucessivos com água destilada estéril. A duração dos lavados é de 1, 3 e 5 minutos, sendo que no último lavado o explante pode permanecer mais tempo.

Para o lavado existem duas técnicas, sendo que a escolha depende do tamanho e do número de explantes a esterilizar. A primeira é retirar o material e transferi-lo aos recipientes com água destilada estéril, um procedimento prático se o número de explantes for pequeno (Figura 1).

A segunda é abrir ligeiramente o frasco para descartar o líquido, derramando o conteúdo na pia ou em um balde de descarte (Figura 2). Antes e depois deste procedimento recomenda-se limpar cuidadosamente a tampa e o exterior do frasco com álcool. Esta última é nossa preferida.

MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

Se for necessário cortar o material ou eliminar as partes queimadas pelo hipoclorito de sódio, prever a esterilização dos instrumentos e de uma caixa de Petri contendo uma folha de papel toalha, onde será realizada dissecação.

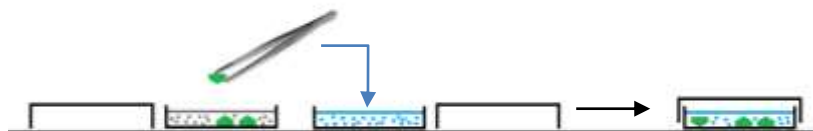
Figura 1: Técnica para desinfetar os explantes.

A. Material



B. Procedimento

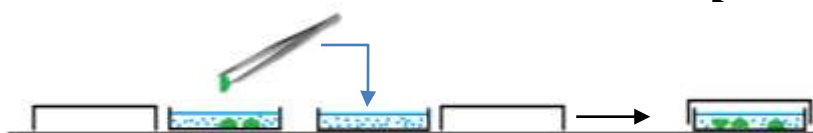
- Primeiro lavado (1 minuto)



- Segundo lavado (3 minutos)



- Terceiro lavado (5 minutos)



↓
Explantes limpos

MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

Figura 2: Outra técnica para desinfetar os explantes.

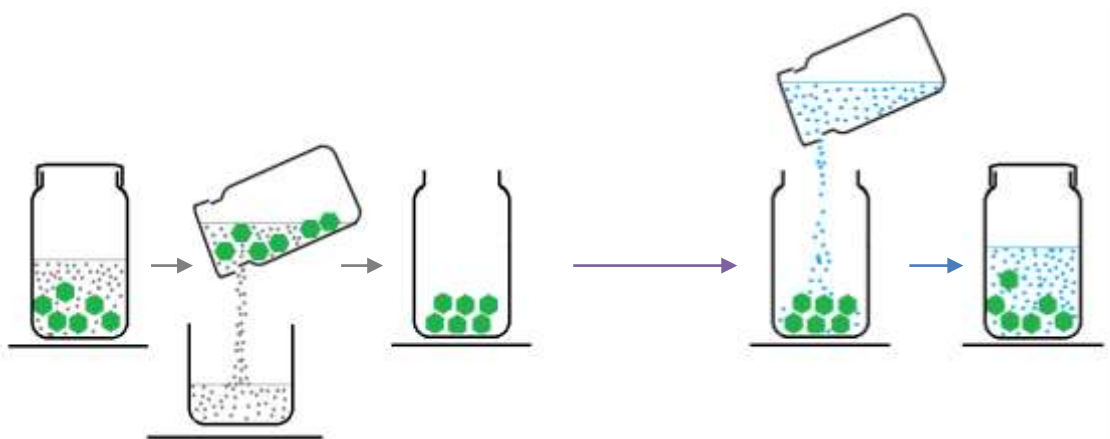
A - Material



Observação: Durante o procedimento, limpar cuidadosamente as bordas da tampa e o exterior dos frascos com álcool antes de transferir os líquidos. Esta medida reduz notavelmente o número de contaminações

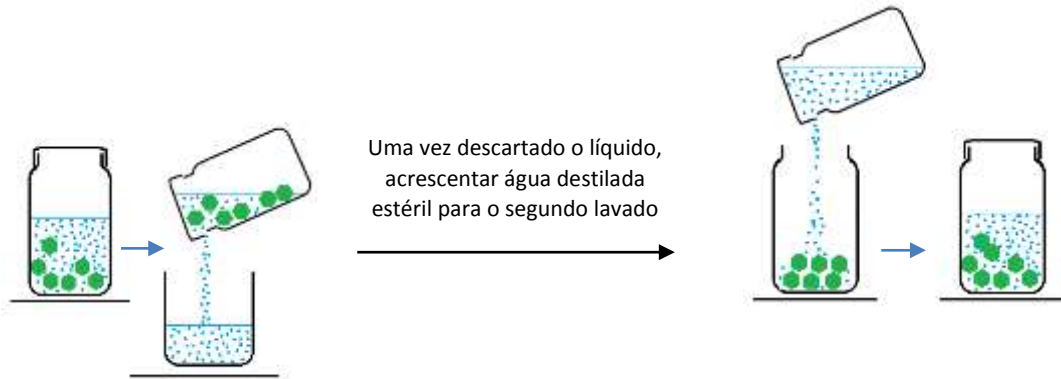
B – Procedimento

- Esterilizar os explantes na solução de água sanitária, descartar o líquido e acrescentar água destilada estéril para o primeiro lavado.

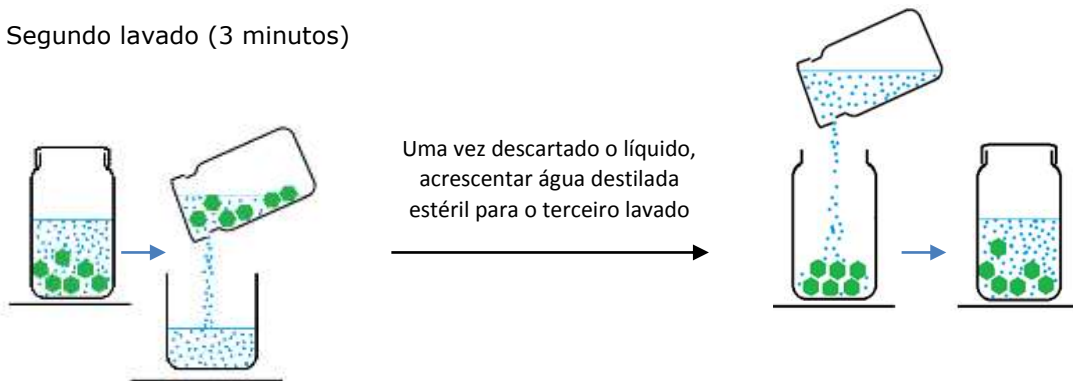


MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

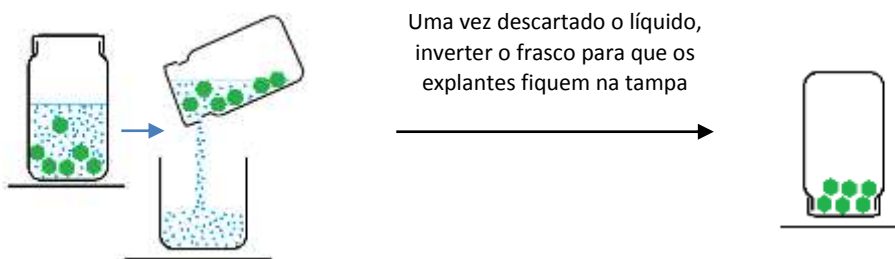
- Primeiro lavado (1 minuto)



- Segundo lavado (3 minutos)



- Terceiro lavado (5 minutos)



- Os explantes estão prontos para a semeadura



MICROPROPAGAÇÃO / A DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES

NOSSO COMENTÁRIO

A preparação de numerosos frascos de água destilada estéril consome muito tempo, de modo que tentamos substituí-la nos lavados por uma solução de Clor-in 10 (Dicloro-S-Triazinotone de Sódio ou NaDCC), um produto vendido no comércio local para desinfetar utensílios e legumes, na concentração e o tempo indicados pelo fabricante.

O Clor-in pode ser preparado na hora e não precisa de enxague. O maior inconveniente é que o material fica um pouco grudento, e isso pode dificultar a transferência dos explantes com a pinça aos tubos de ensaio.

Em função de nossa experiência, vale a pena ressaltar que os testes de desinfecção dos explantes só com Clor-in 10, sem utilizar água sanitária, só dão resultados aceitáveis quando o meio de cultivo não contém sacarose.

Para diminuir as contaminações bacterianas e fúngicas, alguns autores recomendam adicionar NaDCC ou de Nipagin (metilparabeno) no meio de cultivo já esterilizado. Contudo, não achamos informações claras sobre as concentrações utilizadas e preferimos testar o uso desses produtos no lavado dos explantes.