



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

ESACB
Nº29321/105-20
C30-29321CTSPAQB

Propagação de espécies vegetais em condições *in vitro* e extração de compostos por hidrodestilação

Arlete Cremilde Louro Simões

Orientadores

Doutora Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho

Doutor José Carlos Dias Duarte Gonçalves

Relatório de estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários do Curso Técnico Superior Profissional de Análises Químicas e Biológicas, realizado sob orientação científica da Professora Adjunta Doutora Teresa Coelho e do Professor Coordenador Doutor José Carlos Gonçalves, docentes da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Julho de 2020

Dedicatória

Aos meus pais e incondicionalmente à minha filha Matilda.

Agradecimentos

Agradeço a todos os que de certa forma me “empurraram” de volta aos estudos, sem esses incentivos hoje não tinha chegado aqui.

A toda a comunidade escolar, por me ter acolhido, ajudado e me fazer sentir que estava em casa, com muita saudade que vos levo no coração.

Em especial, aos orientadores, Doutor José Carlos Goncalves, como orientador externo, ter-me acolhido no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, assim como a todos os colaboradores, e à Professora Teresa Coelho, como orientadora interna, como professora e me ter apoiado neste estágio, e claro também não poderia deixar de agradecer à Eng. Graça Diogo, que me explicou todos os procedimentos com a sua calma e paciência.

Apoios

Cofinanciado por:



CENTRO 2020



Resumo

Este relatório descreve as atividades realizadas no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESA), bem como nos Laboratórios de Micropropagação e de Fitoquímica do Centro de Biotecnologia das Plantas da Beira Interior (CBP-BI). Em ambos, foi realizada a micropropagação de várias espécies vegetais, enquanto que a extração de óleos essenciais por hidrodestilação foi efetuada no CBP-BI.

Palavras chave

Hidrodestilação; propagação *in vitro*.

Abstract

This report describes the activities carried out at Laboratory of Biology from Agrarian Higher School of Castelo Branco (ESACB), as well as in the Laboratories of Micropropagation and Phytochemistry of Beira Interior Plant Biotechnology Center (CBP-BI). In both, micropropagation of several vegetables species were performed, while the extraction of essential oils by hydrodistillation was carried out at CBP-BI.

Keywords

In vitro propagation; Hydrodistillation.

Índice

	Pág.
<i>Dedicatória</i>	III
<i>Agradecimentos</i>	V
<i>Apoios</i>	VIII
<i>Resumo</i>	X
<i>Abstract</i>	XIII
<i>Índice</i>	XV
<i>Índice de figuras</i>	XIX
<i>1. Introdução</i>	1
<i>2. Locais de Estágio</i>	2
<i>3. Atividades Desenvolvidas</i>	4
<i>3.1. Laboratório de Biologia da ESACB</i>	4
<i>3.2. Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior</i>	12
<i>4. Considerações Finais</i>	15
<i>5. Referências Bibliográficas</i>	16
<i>6. Anexos</i>	17
<i>6.1. Protocolo de desinfecção para estabelecimento</i>	17
<i>6.2. Protocolo de diluição alcoólica</i>	18
<i>6.3. Determinação de faculdade germinativa de sementes</i>	19
<i>6.4. Protocolo de subcultivo em câmara de fluxo laminar</i>	20

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1 - Escola Superior Agrária (fachada principal).....	2
Figura 2 - Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.....	2
Figura 3 - Material vegetal para utilização em aulas	8
Figura 4 - Ensaio de Sementes	8
Figura 5 - Preparação de meios de cultura no Lab. Biologia	9
Figura 6 - Distribuição do meio de cultura.....	9
Figura 7 - Esterilização do meio de cultura	10
Figura 8 - Preparação de álcool a 70 %.....	10
Figura 9 - Preparação do meio de cultura, no CBP-BI.....	12
Figura 10 - Hidrodestilação de Lavandula.....	13

1.Introdução

Este relatório de estágio do Curso Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, foi realizado no âmbito da Formação em Contexto de Trabalho, realizado no 2º ano, 2º semestre do curso.

Decorreu em dois diferentes locais, no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária e, posteriormente, no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

O objetivo foi acompanhar diferentes tarefas em cada um dos Laboratórios de modo a adquirir competências na área da propagação *in vitro* bem como na área de extração de compostos bioativos. Pretendia-se também o acompanhamento de tarefas relacionadas com a propagação *ex vitro*. No entanto, tal não foi possível dado o confinamento obrigatório relativo à pandemia Covid-19.

2. Locais de Estágio

O estágio decorreu no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB) (Fig.1) e no Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI). A ESACB é uma das unidades orgânicas do Instituto Politécnico de Castelo Branco, situa-se na Quinta da Sr.^a de Mércules, propriedade agrícola com cerca de 167 hectares. O Laboratório de Biologia, encontra-se no piso 1, e presta apoio às aulas de diversos cursos bem como à componente de investigação.



Figura 1 - Escola Superior Agrária (fachada principal)

O Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (Fig.2), localiza-se também na Quinta da Sr.^a de Mércules. O CBP-BI é um centro de investigação e desenvolvimento experimental criado no âmbito de parcerias com autarquias, instituições de ensino superior portuguesas e estrangeiras, e outros centros científicos e tecnológicos. Tem como missão “criar conhecimento e valorizar a investigação na área da biotecnologia de plantas associada aos setores produtivos da fileira agrícola, florestal e das plantas aromáticas e medicinais.” (cbpbi.ipcb.pt/quem-somos/)



Figura 2 - Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

3. Atividades Desenvolvidas

3.1. Laboratório de Biologia da ESACB

A principal atividade desenvolvida neste laboratório foi a propagação *in vitro* ou micropropagação.

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional de Culturas de Tecidos Vegetais (IAPTC), entende-se por micropropagação ou propagação *in vitro*, “a propagação de plantas em meio de cultura de formação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de vidro ou plástico, manipulação em condições assépticas” (IAPTC, 1985). Para além da propagação pode também ser auxiliar ou complementar em melhoramento de espécies vegetais, podendo ser aplicada na agricultura, floricultura e silvicultura.

Uma das vantagens da micropropagação é a propagação em larga escala utilizando espaços reduzidos. Neste tipo de propagação podem ser utilizadas diferentes técnicas, mas a que utilizei foi a rebentação axilar já que é considerada vantajosa em termos de manutenção das características genéticas, ou seja, as espécies propagadas serão geneticamente idênticas à que lhe deram origem. Outras vantagens da micropropagação é a multiplicação de espécies de difícil propagação pelos métodos convencionais (por sementes, estacaria, ...) e o facto de se poder propagar independentemente das condições climáticas, já que tudo ocorre em laboratório, sob condições controladas e normalmente num período de tempo relativamente curto. No entanto, este método é considerado dispendioso e, pontualmente, poderão ocorrer contaminações embora este método produza plantas isentas de doenças.

Existem essencialmente 4 fases que temos de salientar para a realização do método: A fase 0 em que a planta mãe é selecionada, seguida de algumas fases, o estabelecimento “*in vitro*” (fase 1), multiplicação (fase 2), alongamento e indução radicular (fase 3), e por último, *in vivo*, aclimatização (fase 4).

Fase 0 – Seleção da planta mãe

Nesta fase procede-se à seleção da planta mãe no campo, recolhendo o material vegetal inicial, tendo de se ter em conta a idade deste, o vigor, a isenção de doenças, entre outros.

Fase 1 - Estabelecimento

Tem de se ter em conta o tipo de explante que iremos tratar, de modo geral, gema apical ou axilar, o seu desenvolvimento, o seu tamanho que pode influenciar o seu sucesso posterior, e também tem de se ter atenção a alguns fatores físicos, químicos tais como, a temperatura, a luz, fotoperíodo e o meio de cultura a utilizar, o pH, etc.

Nesta fase é realizada a desinfecção e sua colocação em meio de cultura adequado à espécie (Anexo 6.1).

Fase 2- Multiplicação

Após a fase inicial de estabelecimento *in vitro* em condições assépticas, pretende-se o aumento do número de explantes, ou seja, a sua multiplicação. Nesta fase, teremos de escolher previamente o meio de cultura a utilizar, de acordo com a espécie a multiplicar.

Há que escolher quais os macronutrientes, por exemplo, NO_3NH_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , os micronutrientes como Na_2EDTA , $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KI , H_3BO_3 ; as vitaminas, tais como piridoxina, tiamina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, glicina, mio-inositol e pantotenato de cálcio; bem como os reguladores de crescimento, em especial auxinas, tais como ácido indol butírico (AIB), ácido indol acético (AIA) e ácido naftaleno acético (ANA), nas citocininas, 6-benzilaminopurina (BAP), 6-isopenteniladenina (2-ip), zeatina, cinetina (Kin) e as giberelinas, como ácidos giberélicos (AG1, AG2, AG3, ...). Também se terá que adicionar hidratos de carbono, como a sacarose, frutose, etc., e por vezes também se adicionam aminoácidos ou antibióticos.

Fase 3- Enraizamento (podendo ser realizado *in vitro* ou *ex vitro*)

Após algumas multiplicações (sub-cultivos), em que obtivemos o número suficiente de explantes desejados, passa-se à fase de enraizamento. Neste processo, a composição do meio de cultura terá de ser alterada e adaptada de forma a induzir a produção e desenvolvimento radicular. Nesta fase o crescimento em comprimento dos rebentos é abrandado.

No enraizamento *in vitro*, terá de ser efetuada em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, com o meio de cultura adequado enquanto que no enraizamento *ex vitro*, prepara-se o explante para enraizar em meio natural, ou seja, não há passagem pelo meio de cultura, e normalmente é colocado numa auxina, durante um curto espaço de tempo (imersão basal do rebento) após o qual é colocado em substrato de turfa e perlite.

Fase 4- Aclimatização

As pequenas plantas terão de passar por um período de adaptação a condições de humidade e de temperatura, sendo transferidas para tabuleiros ou vasos, com substratos de diferentes composições. No início mantêm-se tapadas com uma placa translúcida de forma a criar um ambiente muito idêntico ao que se encontrava nos tubos de ensaio e também para evitar a desidratação. A humidade vai sendo reduzida gradualmente, de modo a que se assemelhe o mais possível ao meio ambiente exterior. Uma vez superada esta etapa, as plantas serão transferidas para a estufa, para uma melhor adaptação (mantidas com sistema de nebulização por micro aspersão), e por fim, poderão ser estabelecidas em condições de ar livre, campo.

Espécies vegetais propagadas:

Castanheiro (*Castanea sativa* L.) pertence à família *Fagaceae*, de folha caduca, esta espécie tem preferência por solos soltos, profundo e de preferência com alguma humidade, desenvolvendo-se na nossa região, englobando a Península Ibérica.

Carqueja de nome científico de *Pterospartum tridentatum* ou *Genista tridentata* L. pertence à família *Fabaceae*, gosta de território de temperaturas e humidade amenas, desenvolvendo-se praticamente pelo Mediterrâneo, cresce em terrenos de pasto e baldios, sendo uma erva espontânea, abunda em Portugal entre Março a Julho, dependendo do clima da zona.

Stevia conhecida pelo seu poder adoçante, sendo o seu nome científico *Stevia rebaudiana*, pertence à família *Asteraceae*, provém do Brasil e Paraguai, podendo ser mais doce 70/400 vezes do que o açúcar tradicional.

Zimbro (*Juniperus communis* L.), da família *Cupressaceae*, tem facilidade em se adaptar em qualquer tipo de habitat, desde que tenha luz, na sua ausência fica com uma cor mais amarelada. Possui folhas pontiagudas como as do pinheiro, mas esta é caduca.

Rosmaninho também conhecida por *Lavandula* pertence família *Lamiaceae*, formam pequenos arbustos. Proveniente das ilhas Canárias, da África, Arábia e Índia, dá-se muito bem em ambiente de temperaturas amenas, como o Mediterrâneo.

Mostageiro (*Sorbus torminalis*) é uma folhosa caduca pertence à família *Rosaceae* com grande capacidade de adaptação às diferentes condições de solo e clima.

Para proceder à micropropagação, comecei por preparar meio de cultura de acordo com esta metodologia:

- ✓ Medir aproximadamente 80% de água destilada em relação ao volume final de meio a preparar.
- ✓ Sempre em agitação, adicionar os volumes de macronutrientes, micronutrientes, FeNaEDTA, mio-inositol, vitaminas, reguladores de crescimento e sacarose.
- ✓ Perfazer o volume final.
- ✓ Ajustar o pH por adição de NaOH ou HCl 1N.
- ✓ Adicionar o agar. Ligar a placa térmica para dissolver o agar (a solução torna-se transparente após a dissolução completa).

- ✓ Fazer a distribuição pelos tubos de ensaio ou frascos.
- ✓ Esterilizar em autoclave a 1 atm, 121°C, durante tempo definido (utilizar marcador de grafite para referenciar os meios).
- ✓ Após autoclavagem, abrir lentamente a válvula de pressão.

O meio mais utilizado foi o meio de Murashige Skoog (MS) (1962) cuja constituição é a seguinte:

Constituintes	mgL-1	Solução stock	
		1000mL	500 mL (g×10)
Macronutrientes			
KNO ₃	1900	19,0	9,50
NO ₃ NH ₄	1650	16,5	8,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	4,4	2,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3,7	1,85
KH ₂ PO ₄	170	1,7	0,85
			(g×100)
Micronutrientes			
SO ₄ Fe.7H ₂ O			1,39
Na ₂ EDTA			1,86
SO ₄ Mn.4H ₂ O	22,300	2,2300	1,11500
SO ₄ Zn.7H ₂ O	8,600	0,8600	0,43000
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,025	0,0025	0,00125
Cl ₂ Co.6H ₂ O	0,025	0,0025	0,00125
KI	0,830	0,0830	0,04150
H ₃ BO ₃	6,200	0,6200	0,31000
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,250	0,0250	0,01250
Vitaminas			
m-Inositol		100,0	
Tiamina.HCl		0,1	
Acido nicótico		0,5	
Piridoxina.HCl		0,5	
Glicina		2,0	

Durante o período de estágio neste laboratório, desempenhei ainda mais algumas funções como:

- ✧ Dar apoio á Eng^a Graça na preparação de aulas do curso de Agronomia, na unidade curricular de Botânica, recolhendo material vegetal de algumas famílias botânicas, como gramíneas e fagáceas, colhendo folhas, flores, caules e raízes (Fig. 3).



Figura 3 - Material vegetal para utilização em aulas

- ✧ Preparação de sementeiras (Anexo 6.3) para as aulas de Biotecnologia Alimentar (Fig. 4).

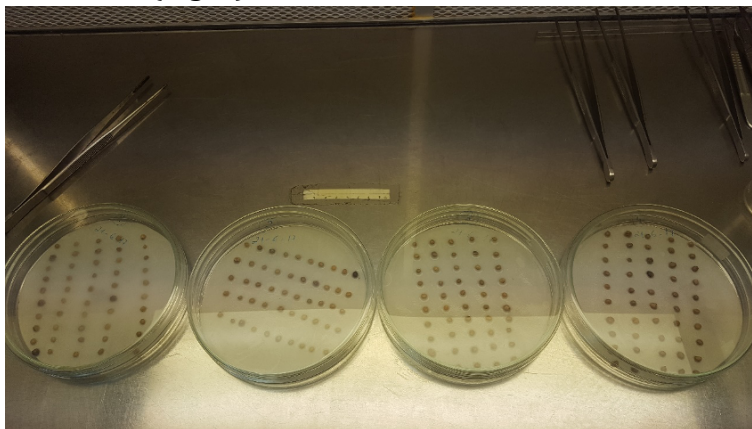


Figura 4 - Ensaio de Sementes

- ✧ Preparação (Fig. 5), distribuição (Fig. 6) e esterilização (Fig. 7) de meios de cultura para as espécies que se encontram em micropropagação.



Figura 5 - Preparação de meios de cultura no Lab. Biologia



Figura 6 - Distribuição do meio de cultura



Figura 7 - Esterilização do meio de cultura

- ✧ Preparação de álcool a 70% (Fig. 8, Anexo 6.2) para desinfetar a câmara de fluxo laminar, assim como o material que é colocado na mesma.



Figura 8 - Preparação de álcool a 70 %

A limpeza do material de vidro é realizada na sala de lavagem, onde inicialmente é passado por água e colocado na máquina de lavar loiça. Quando o material é lavado à mão com detergente, posteriormente é colocado na estufa de secagem.

Nesta sala de lavagem também se procede à esterilização do material. No caso das placas de Petri serão esterilizadas em suporte metálico, numa estufa, por calor seco (180°C, durante 2h). No caso do material de vidro, meios de cultura, pinças e bisturis,

são autoclavados a 121°C, num período de tempo determinado consoante o material a esterilizar.

3.2. Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior

Os trabalhos que me foram propostos neste Centro foram a propagação *in vitro* e a Hidrodestilação com o aparelho Clevenger. No entanto, tive a oportunidade de ajudar em algumas tarefas que se encontravam a decorrer nos laboratórios do Centro, como por exemplo, contagem de sementes para estudar a faculdade germinativa em várias condições de temperatura e humidade, tendo também auxiliado em tarefas relacionadas com a liofilização.

Tendo realizado a micropropagação, comecei por preparar soluções stock, para posteriormente efetuar com essas soluções, meios de cultura (Fig. 9) necessários para efetuar a mesma. Neste Centro, a espécie micropropagação foi *Lavandula*

Na sala de lavagens do Centro, procedi à lavagem diferenciada dos materiais, consoante a sua posterior utilização, embora esta esterilização seja idêntica à efetuada no Laboratório de Biologia da ESA.



Figura 9 - Preparação do meio de cultura, no CBP-BI

A hidrodestilação (Fig. 10), uma das tarefas realizadas, consiste na extração de óleos essenciais e extratos aquosos, neste caso, através do aparelho de Clevenger, sendo este o método mais utilizado para extração de óleos essenciais. O material vegetal é colocado num balão de fundo redondo, preenchido com água de forma a cobrir o material vegetal. O balão é colocado numa manta de aquecimento, promovendo a fervura, ajustando-se ao Clevenger e o vapor de água resultante do processo é arrastado percorrendo todo o percurso do aparelho, arrastando também o

óleo que, devido a ser mais denso e não volátil é conduzido para o condensador. Após arrefecer, o óleo e a água são recolhidos num recipiente, ficando o óleo essencial sobre a água, sendo separados facilmente.



Figura 10 - Hidrodestilação de *Lavandula*

Protocolo para extração de óleo essencial de *Lavandula*

Material necessário:

- ✓ Balança digital;
- ✓ Funil;
- ✓ Copo de precipitação;
- ✓ Vara de vidro;
- ✓ 2 tinas de vidro (folhas + caules, flor)
- ✓ Manta de aquecimento;
- ✓ Balão de 2L, fundo redondo e boca esmerilada;
- ✓ Vaselina;
- ✓ Aparelho Clevenger;
- ✓ Folha de papel alumínio;
- ✓ Suporte para aparelho Clevenger;
- ✓ Sistema de arrefecimento com água da corrente;
- ✓ Proveta de 1L

Preparação:

- ✓ Colocar o aparelho de Clevenger no suporte, ligar o sistema de arrefecimento, e testar se está a funcionar. Posicionar a manta de aquecimento por baixo do aparelho;
- ✓ Ligar a manta de aquecimento. Enquanto aquece, aproveitar para preparar o balão com o material vegetal;
- ✓ Ligar a balança, e deixar estabilizar, colocar o copo de precipitação sobre a balança e tirar a tara. Colocar cerca de 50g de folhas + caules, 50g de flor, até perfazer 100g deste material vegetal;
- ✓ No balão, colocar 100g de material vegetal e 1L de água destilada (juntar pouco a pouco e ir agitando);
- ✓ Introduzir o balão dentro da manta de aquecimento, no bocal passar um pouco de vaselina, para encaixar o aparelho de Clevenger sem esforço, para não partir;
- ✓ Após estar tudo montado, envolver o balão e o início do aparelho com papel de alumínio para que não haja perda de calor;
- ✓ Assim que entrar em ebulição, marcar 2 horas, a uma temperatura estável;
- ✓ Ao fim das 2h, desligar a manta de aquecimento e desligar o sistema de água;
- ✓ Com cuidado, abrir a torneira do aparelho de Clevenger para o óleo sair, de modo a que a água escorra sem sair o óleo. Este sairá posteriormente para um frasco escuro de âmbar para proteção da luz.;
- ✓ Guardar o frasco com o óleo no frigorífico a temperatura de 5°C para não perder os compostos voláteis.

Neste Centro não foi possível realizar todas as tarefas propostas inicialmente devido ao confinamento relativo à pandemia Covid-19.

4. Considerações Finais

Na realização deste estágio tive a oportunidade de me enquadrar no mundo de trabalho, onde consolidei o que fui aprendendo ao longo deste curso.

Na micropropagação, adquiri ainda mais conhecimentos, realizei com empenho as tarefas que me foram propostas, contactei com duas realidades, no Laboratório de Biologia da ESA, onde o equipamento já tem alguma idade, mas nunca descurando que as técnicas sejam eficazes, enquanto que no CBP-BI, o equipamento é mais atual, podendo assim adaptar-me a qualquer tipo que encontre posteriormente.

Na hidrodestilação, consegui aprender como funciona realmente este processo de destilação, e conhecer o aparelho Clevenger.

Infelizmente, devido à fase que estamos a atravessar, com o Covid-19, e pelo facto de termos ficado em confinamento, não pude acompanhar mais algumas tarefas até ao final do período de estágio.

5. Referências Bibliográficas

- ⇒ Documentos internos cedidos em ambas as instituições, como apontamentos, protocolos e procedimentos.
- ⇒ Busato, N., Silveira, J., & Junior, E., “Modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação, Univ. Espírito Santo, Eng, Quimica < <https://www.scielo.br/pdf/cr/v44n9/0103-8478-cr-44-09-01574.pdf> >(consulta a 24/05)
- ⇒ Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior, <cbpbi.ipcb.pt/quem-somos/> (consulta a 12/03)
- ⇒ Espécies utilizadas: castanheiro, < <https://brigadadafloresta.abae.pt/castanheiro/> > ; carqueja, <<https://www.tuasaude.com/carqueja/>>; stevia, <<https://www.portalsaofrancisco.com.br/alimentos/stevia>>; zimbro, Bacém, I., “Composição química e actividade biológica de bagas de Zimbro” (Braga 2018), IPBraga, Eng. Quimica <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/17749/1/pauta-relatorio-12.pdf> >; rosmaninho, <<https://www.infoescola.com/plantas/alfazema/> >; sorbus, < <https://flora-on.pt/?q=Sorbus+torminalis>>. (consulta a 29/04)
- ⇒ IAPTC, 1985. Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology, *Newsletter*, 45: 15-22. (consulta a 03/06)
- ⇒ Jacob, A., P. Introdução à cultura *in vitro* – aspetos práticos. Escola Superior Agrária IPSantarém (consulta a 13/02)
- ⇒ Malajovich, M., A., & Mann, V., S. Micropropagação (consulta a 04/03)
- ⇒ Meio de culturas; “Preparação de meio” <http://home.uevora.pt/~zavattieri/meios_de_cultura.htm> (consulta a 14/04)
- ⇒ Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497 (consulta a 13/02)
- ⇒ Zavattieri, A. (2002). Biotecnologia Vegetal I. Univ. de Évora (consulta a 04/03)

6. Anexos

6.1. Protocolo de desinfecção para estabelecimento

Material/equipamento:

- ✓ Esterilizador de bancada de esferas de vidro;
- ✓ Placas de Petri esterilizadas;
- ✓ Água destilada esterilizada;
- ✓ Provetas;
- ✓ Tinas;
- ✓ Tesoura; bisturi; pinça.

Reagentes:

- ✓ Solução fúngica;
- ✓ Solução hipoclorito de sódio.

Procedimento:

- ✓ Retirar o explante do material vegetal inicial;
- ✓ Limpar o material para o posterior estabelecimento, colocando-o em água corrente entre 30 a 60 min;
- ✓ Colocar o material vegetal em agitação numa solução fúngica durante 10 min;
- ✓ Efetuar uma passagem por álcool a 70% entre 30 a 60 segundos, na câmara de fluxo laminar, consoante o material vegetal;
- ✓ Passagem por hipoclorito de sódio em concentração e tempo adequado ao material vegetal.

6.2. Protocolo de diluição alcoólica

Material:

- ✓ Água destilada
- ✓ Proveta graduada
- ✓ Álcool

Procedimento:

- ✓ Verificamos a graduação do álcool que dispomos, e qual a percentagem pretendida;
- ✓ Consultar a tabela 1;
- ✓ Juntar ao álcool que dispomos a quantidade adequada de água destilada, de acordo com a tabela 1, e de acordo com o volume final pretendido.

Tabela1 - Graduação do álcool

		GRADUAÇÃO DO ÁLCOOL													
		95%	90%	85%	80%	75%	70%	65%	60%	55%	50%	45%	40%	35%	30%
ALCOOL QUE SE DESEJA OBTER	ALCOOL QUE DISPONOS	95%													
	90%	5,56													
	85%	11,76	5,88												
	80%	18,75	12,50	6,25											
	75%	26,67	20,0	13,33	6,67										
	70%	35,71	28,57	21,43	14,29	7,14									
	65%	46,15	38,46	30,77	23,08	15,38	7,69								
	60%	58,33	50,0	41,67	33,33	25,0	16,67	8,33							
	55%	72,73	63,64	54,55	45,45	36,36	27,27	18,18	9,09						
	50%	90,0	80,0	70,0	60,0	50,0	40,0	30,0	20,0	10,0					
	45%	111,11	100,0	88,89	77,78	66,67	55,56	44,44	33,33	22,22	11,11				
	40%	131,50	125,0	112,50	100,0	87,50	75,0	62,50	50,0	37,50	25,0	12,50			
	35%	171,43	157,14	142,86	128,57	114,29	100,0	85,71	71,43	57,14	42,86	28,57	14,29		
	30%	216,67	200,0	183,33	166,67	150,0	133,33	116,67	100,0	83,33	66,67	50	33,33	16,67	
		ÁGUA DESTILADA													

6.3. Determinação de faculdade germinativa de sementes

Material:

- ✓ Placas de Petri
- ✓ Estufa
- ✓ Proveta 200 mL
- ✓ Pinça
- ✓ Papel de filtro
- ✓ Água esterilizada
- ✓ Solução de hipoclorito de sódio a 1%

Procedimento:

- ✓ Colocar papel de filtro nas placas de Petri (se necessário cortar e ajustar ao tamanho das placas);
- ✓ Preparar 200 mL de hipoclorito de sódio a 1%;
- ✓ Contar 4 lotes de 50 sementes;
- ✓ Desinfetar sementes em solução de hipoclorito de sódio durante 10 min;
- ✓ Lavar sementes com água esterilizada;
- ✓ Humedecer o papel de filtro das placas de Petri com água esterilizada;
- ✓ Colocar 50 sementes desinfetadas em cada placa de Petri; alinhar sementes e deixar espaço suficiente entre elas;
- ✓ Colocar placas de Petri fechadas em estufa. Regular temperatura de acordo com a espécie;
- ✓ Diariamente verificar humidade da placa de Petri e humedecer com água esterilizada, se necessário;

Contar número de sementes germinadas ao 5º e 10º dia (conforme as espécies) após o estabelecimento do ensaio.

Nota: Convém trabalhar em câmara de fluxo laminar.

6.4. Protocolo de subcultivo em câmara de fluxo laminar

Material/equipamento:

- ✓ Bisturis;
- ✓ Pinças;
- ✓ Placas de Petri esterilizadas;
- ✓ Frascos com meios de cultura;
- ✓ Vaporizador com Álcool a 70%;
- ✓ Câmara de fluxo laminar;
- ✓ Esterilizador de esferas de vidro para bancada;

Procedimento:

- ✓ Ligar a câmara de fluxo laminar 30 minutos antes de iniciar o trabalho;
- ✓ Desinfetar a camara de fluxo laminar com o álcool;
- ✓ Colocar o material, bisturis e pinças, no esterilizador, durante alguns segundos, assegurando a esterilização;
- ✓ Colocar os frascos do meio de cultura previamente adequado á espécie a propagar na câmara de fluxo laminar e desinfeta-los com álcool, bem como os frascos com o meio de cultura, assim como os frascos com o material vegetal, antes de entrar na câmara fluxo laminar;
- ✓ Para colocar em novo meio de cultura, anteriormente, retira-se um explante do meio de cultura com a pinça (retirando o máximo possível os restos de agar);
- ✓ Coloca-se o explante numa caixa de Petri e corta-se em segmentos, com a ajuda da pinça e bisturi, deixando ficar pelo menos dois gomos axilares por cada 1 a 2 cm;
- ✓ Efetua-se de seguida a colocação dos explantes no novo meio de cultura com o devido espaçamento entre eles;
- ✓ De seguida colocam-se os meios de cultura com os explantes na sala de cultura que contém as condições necessárias (luz e temperatura) para os explantes se desenvolverem.