

Paraformaldeído em laboratório de biotecnologia vegetal: desinfestação de utensílios termossensíveis

**Claudimar Sidnei Fior¹, Diana Schuch Bertoglio², Bibiana Della Pasqua Ferreira³
e Pedro Coelho de Souza Schäffer²**

Resumo - Visando à adaptação de uma técnica de fácil execução e baixo custo para a desinfestação de utensílios termossensíveis, foi desenvolvido um trabalho empregando-se placas de petri plásticas (6 cm de diâmetro) submetidas a diferentes tempos de exposição a pastilhas de paraformaldeído. Durante o período de desinfestação, o material permaneceu sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR~50%. Foram realizados dois experimentos, cujos tempos de exposição variaram de zero (controle) a 32 horas. Após a desinfestação, 5 ml do meio de cultivo MS-1962 foram vertidos em cada placa, em ambiente estéril. O material foi mantido no escuro a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e avaliado semanalmente até o 28º dia, quanto a percentual de contaminação, número de colônias e tamanho das colônias. No tratamento controle, ocorreu 100% de contaminação. Nas condições testadas, o tempo mínimo para completa desinfestação foi de 10h de exposição ao paraformaldeído 0,2% e de 5h30min ao paraformaldeído 0,4% (m/v). Os tratamentos permitiram reaproveitamento de material descartável, economizando recursos e reduzindo o volume de resíduos.

Palavras chave - cultura de tecidos; assepsia; formaldeído

Paraformaldehyde in the plant biotechnology laboratory: disinfestation of heat-sensitive utensils

Abstract - Aiming at adapting an easily executed, low-cost technique for the disinfestation of heat-sensitive utensils, research was developed using plastic Petri plates (diameter=6cm) submitted to different times of exposure to paraformaldehyde tablets. During the disinfestation period, the material remained at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and RH~50%. Two experiments were carried out, with times of exposure varying from zero (control) to 32 hours. After disinfestation, 5ml of the culture medium MS-1962 were poured onto each plate in a sterile environment. The material was kept in the dark at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, and evaluated weekly until the 28th day, as to percentage of contamination, number of colonies per plate and size of the colonies. In the control treatment, 100% of contamination was observed. The regression equation of both experiments allow the conclusion that, under the conditions tested, the minimum time for satisfactory disinfestation (0% of contamination) is 10h of exposure to 0.2% paraformaldehyde and 5:30h to 0.4% (m/v). The treatments allowed reuse of discardable material, saving resources and reducing volumes of waste.

Key words - Tissue culture; asepsis, formaldehyde

¹ Eng. Agrônomo, Especialista em cultura de tecidos vegetais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Av. Salvador França, 1427. CEP 90690000, Porto Alegre, RS. culturadetecidos@fzb.rs.gov.br

² Acadêmico em Ciências Biológicas, Estagiário na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul

³ Bióloga, Mestranda do PPG Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Recebido para publicação em 20/01/2006

Introdução

A mais antiga referência sobre agente desinfestante data de 800 anos a.C., quando era utilizado o dióxido de enxofre para preservação de frutas secas, sucos e vinhos (ANDRADE et al., 2002).

A desinfestação de equipamentos e utensílios é uma etapa imprescindível para uma infinidade de procedimentos laboratoriais. O mais eficiente agente desinfestante é o calor. O vapor sob pressão é um processo universalmente aplicado, com efeito satisfatório na grande maioria dos casos. Autoclaves e estufas são amplamente utilizadas para desinfestações de utensílios em laboratórios de diversas áreas, como a medicina, farmácia, enfermagem, biotecnologia, além de outras.

Em muitos casos, a desinfestação por altas temperaturas é impossibilitada devido à sensibilidade dos utensílios. Nestas situações, utilizam-se soluções líquidas ou gasosas de diversas naturezas. A mais difundida no Brasil utiliza o óxido de etileno e suas misturas diluídas (GRAZIANO et al., 1989; ANVISA, 2003).

A desinfestação por raios gama, geralmente emitidos pelo cobalto 60, é uma alternativa bastante utilizada pela indústria. Esse recurso foi difundido a partir da década de 1960 e amplamente adotado, uma vez que, no ano de 2000, já havia 200 irradiadores em uso no planeta. Na desinfestação em escala industrial, o emprego de radiação é preferível ao de dióxido de etileno, pois esse último é acrescido de substância altamente poluente, o diclorodifluorometano (CCl_2F_2) (RODRIGUES Jr., 2000).

O formaldeído (H-CHO) (FA) é um gás incolor de odor característico que, em concentrações superiores a 20 ppm, polimeriza-se à temperatura ambiente, dando origem a um precipitado branco. Este polímero é denominado paraformaldeído (H-CHO_n) (PF) e libera gradualmente o FA no ar por sublimação, processo que acentua-se com o aumento de temperatura (ANVISA, 2003).

O FA tem amplo emprego nas atividades industriais e é liberado em inúmeras reações químicas rotineiras das atividades produtivas humanas. É emitido, por exemplo, por fornos (JUNFENG-ZHANG e SMITH, 1999), pela descarga de automóveis e está presente, em pequenas concentrações, em alguns gêneros alimentícios, como hortaliças e carnes (TASKOV, 1996; TREZL et al., 1997).

No Brasil, o uso do FA obtido por meio da sublimação do PF, como método de esterilização, há muito tempo está presente nos hospitais e clínicas odontológicas, mesmo com o advento de gás óxido de etileno. No entanto, as publicações sobre as condições de desinfestação com este gás são bastante restritas (GRAZIANO et al., 1989).

Em trabalhos realizados por Graziano et al. (1989), o PF apresentou atividade esterilizante na concentração de 3% (m/v) em um período de exposição de duas horas à temperatura de 50°C.

Barbieri et al. (1993) testaram o PF de 0,5 a 5 mM para vários microorganismos e registraram que cepas de *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentam características de resistência a esta substância.

Encontram-se na literatura outros inúmeros registros acerca do emprego industrial e do uso do FA e do PF como integrantes de agentes fixadores. Contudo, seu emprego em laboratórios de cultura de tecidos vegetais ainda é bastante recente (FIOR et al., 2005).

Diversas substâncias com ação germicida podem ser utilizadas na desinfestação de tecidos e utensílios em laboratórios de biotecnologia vegetal. É o caso do cloreto de mercúrio, o peróxido de hidrogênio, o mertiolate, o nitrato de prata e o etanol, bem como, compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e de cálcio. Alguns produtos oferecem resultados superiores para finalidades específicas (FIOR et al., 2005).

Fior et al. (2005) compararam o efeito do PF na desinfestação de tecidos vegetais de *Limonium platyphyllum* Lincz ao procedimento considerado padrão em laboratórios de cultura de tecidos, o qual emprega o etanol 70% e NaOCl. Os resultados foram similares quando utilizado o PF sob temperatura ambiente, por duas horas de exposição na concentração de 0,67% (m/v). Sob mesmas condições, períodos mais prolongados de exposição evitaram o desenvolvimento de microorganismos, no entanto, provocaram altas taxas de oxidação, inviabilizando a regeneração dos tecidos.

No que diz respeito a utensílios termossensíveis, o uso do PF é uma alternativa importante, pois pode viabilizar o reaproveitamento de materiais que atualmente são descartados ou desinfestados por métodos onerosos e/ou poluentes. Exemplos destes materiais são as placas de polietileno, que são esterilizadas com radiação ionizante e comercializadas em embalagens estéreis lacradas. Por não resistirem a autoclavagem, essas placas são descartadas depois da primeira utilização ou, em alguns casos, elas são lavadas e submetidas a nova desinfestação por radiação, gerando os inconvenientes acima citados.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ação do PF como agente desinfestante de recipientes termossensíveis utilizados em laboratórios de cultura de tecidos vegetais, sob diferentes tempos de exposição em condições normais de temperatura e pressão.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Foram utilizadas pastilhas de PF de 500 mg (formaldeído a 99,9%). Placas de petri de polietileno transparente, com 6 cm de diâmetro, foram submetidas à ação do gás FA por períodos crescentes.

Placas usadas foram lavadas com água e detergente neutro, secas ao ar e mantidas abertas sobre bancada de laboratório, por 24 h. Esse procedimento foi adotado na intenção de imitar uma condição de reutilização das placas, e, ao mesmo tempo, garantir a presença de propágulos de microorganismos em todas as placas utilizadas, de forma mais homogênea possível.

Experimento I: Para acondicionar as placas durante a exposição ao FA, foram utilizados recipientes plásticos de 500 ml, hermeticamente fechados. Em cada recipiente foram colocadas duas pastilhas de PF (0,2%, m/v), e quatro placas. Os tratamentos constituíram-se de 0 (controle), 1, 2, 4, 8, 16, e 32h de exposição do material ao FA. O delineamento foi completamente casualizado, com duas repetições de 8 placas.

Durante os tempos de desinfestação, os recipientes permaneceram no escuro, sob temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa do ar de, aproximadamente, 50%. Depois de expirado o tempo de cada tratamento, os recipientes foram levados à câmara de fluxo estéril localizada em sala

isolada e equipada com exaustor. No interior da câmara os recipientes foram abertos, assim permanecendo por 20 minutos, de forma a dispersar o FA exalado. Após, cada placa recebeu 5 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 30 g/L de sacarose e pH 5,8, previamente esterilizado em autoclave e mantido em local livre de microorganismos, até atingir temperatura ambiente. Após a colocação do meio, as placas foram fechadas, vedadas com filme de PVC transparente e armazenadas em caixa de papel em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C.

Experimento II: Analisados os resultados do experimento I, considerou-se a hipótese da possibilidade de diminuição dos tempos de exposição, aumentando a concentração do PF. A metodologia utilizada foi semelhante a do primeiro experimento, sendo que neste utilizaram-se duas repetições de dez placas por tratamento. Por isso, para o experimento II, os períodos de exposição das placas ao FA foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7h e em cada recipiente foram colocadas cinco placas e quatro pastilhas de PF (0,4%, m/v) (Figura 1).

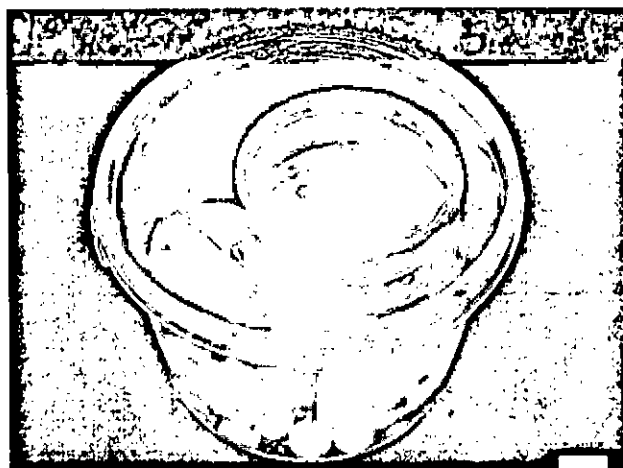


Figura 1 - Frasco de 500 ml com cinco placas e quatro pastilhas de paraformaldeído (Barra=1cm).

Para ambos os experimentos foram realizadas avaliações semanais até o 28º dia, sendo registrado o número de placas contaminadas por repetição, número médio e tamanho das colônias por placa. Os resultados foram submetidos à análise da variância e regressão polinomial. A identificação dos gêneros dos microorganismos foi realizada através da comparação das características morfológicas dos conidióforos e conídios, com informações da literatura.

Resultados e discussão

Experimento I: Já na primeira semana após a incubação, foi verificado desenvolvimento de colônias de microorganismos em todas as placas do tratamento controle. Os gêneros identificados foram: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Pestalotia*. A análise da variância não paramétrica demonstrou diferença signifi-

cativa ($P<0,001$) entre o tratamento controle e os demais, para número de placas contaminadas.

No tratamento em que as placas foram submetidas a uma hora de exposição ao FA, verificou-se o desenvolvimento de microorganismos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, em, aproximadamente, 44% das placas (Figura 2 e 3). Dentre as contaminadas, a ocupação pelas colônias foi, em média, de 24% da área das placas. Já no tratamento com duas horas de exposição, 25% das placas contaminaram com fungos do gênero *Hobsonia*. Em uma placa submetida ao tratamento de quatro horas de exposição, verificou-se o crescimento de fungo do gênero *Cheiromyces*.

Nas placas expostas a 8, 16 e 32 horas, não foi observado o desenvolvimento de microorganismos.

Parte dos microorganismos identificados no presente trabalho pertencem aos mesmos gêneros menciona-

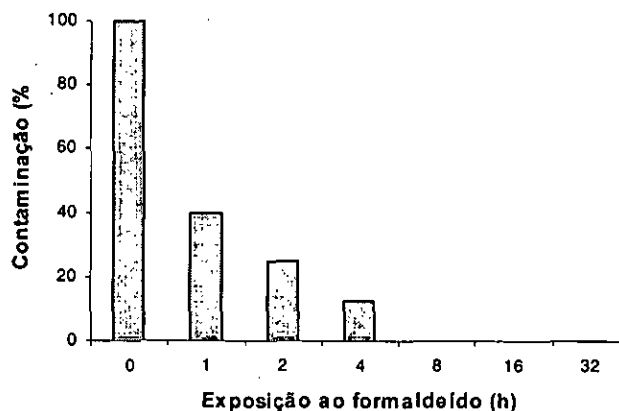


Figura 2 - Contaminação observada em placas de polietileno transparente com meio MS, após desinfestação com paraformaldeído em diferentes tempos de exposição.

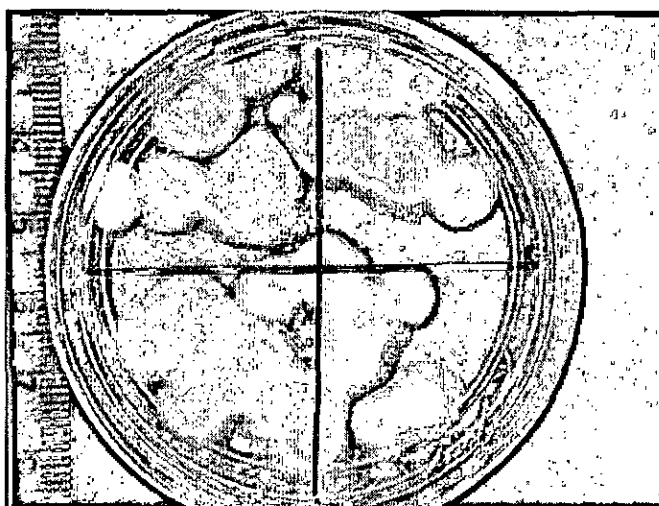


Figura 3 - Placa submetida a uma hora de exposição ao PF, após 28 dias de incubação em meio de cultivo MS.

dos por Leifert et al. (1994), os quais mostraram que organismos encontrados no ambiente do laboratório estavam diretamente relacionados com aqueles surgidos em frascos de cultivo com ou sem a presença de plantas. Além disso, estes organismos não foram encontrados latentes nos tecidos vegetais utilizados para os cultivos. Em frascos com plantas *in vitro* que há mais de um ano não apresentavam contaminação foram isolados os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*.

A equação da regressão linear dos percentuais médios de contaminação indicou que o tempo de exposição ao FA, para controle satisfatório dos microorganismos, deve ser próximo a dez horas (Figura 2).

De acordo com Nunes e Prestes (2003), o uso do PF tem sido empregado para desinfestação de utensílios

termossensíveis para micropropagação de plantas, sendo que o tempo de exposição utilizado é de, aproximadamente, 24 h., sem controle de temperatura e pressão. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que este tempo pode ser reduzido, sem que seja necessária a aplicação de pressão ou alta temperatura.

De acordo com a análise da variância, o tamanho médio das colônias não foi influenciado pelo tempo de exposição ao FA ($P=0,054$).

Experimento II: A incidência de contaminação foi verificada nos tratamentos com até três horas de exposição ao PF. Os demais tratamentos não apresentaram qualquer tipo de contaminação, no entanto, a equação da regressão quadrática ($P=0,001$) indicou que o tempo de exposição para alcançar 0% de contaminação, deve ser maior ou igual 5h30min [$y = 16,429 - (5,298x) + (0,417x^2)$].

O número de colônias formadas, bem como o desenvolvimento das mesmas, não foi influenciado pelo tempo de exposição ao PF ($P=0,293$ e $P=0,3$, respectivamente).

Segundo a ANVISA (2003), a utilização de PF em temperatura ambiente, mesmo em exposições prolongadas, não apresenta ação esporocida.

Mecke (1984) salienta que a esterilização pelo uso de PF em condições normais de pressão e temperatura é insegura, pois o poder de penetração do gás nestas condições é precário, mencionando em seu trabalho que os esporos de *Staphylococcus faecalis* e *Bacillus stearothermophilus* apresentaram grande resistência a esta substância. Já Graziano et al. (1989), salientam que a diversidade dos resultados obtidos por pesquisadores sobre as condições de esterilização pelo PF mostra que há discordância quanto à padronização do método escolhido, e que todos esses fatores influenciam na resistência, sobrevivência e desenvolvimento dos microorganismos testados.

Após períodos de exposição iguais ou superiores a dez horas sob concentração de PF a 0,2% ou a 5 horas e 30 minutos sob concentração de 0,4% (m/v), em temperatura média de 25 °C, não houve desenvolvimento de microorganismos no meio de cultivo amplamente utilizado na cultura de tecidos vegetais.

Contudo, os resultados satisfatórios obtidos no presente trabalho, sugerem que há menor diversidade de microorganismos em laboratórios de cultura de tecidos vegetais, quando comparados a ambientes hospitalares, ou então, a especificidade por substratos pode ter restringido o desenvolvimento de alguns destes organismos nas condições testadas. Diante disso, pode-se inferir que, embora presentes, eles não causam prejuízos aos cultivos vegetais *in vitro*, uma vez que não encon-

tram condições adequadas para o desenvolvimento, tampouco tem efeito fitopatogênico.

Diante do exposto, conclui-se que o PF pode ser utilizado como desinfestante de utensílios termossensíveis em laboratórios de biotecnologia vegetal, apresentando como principais vantagens o baixo custo e a fácil aquisição, além de não necessitar de uso de soluções para remoção de resíduo, tampouco gerar descarte poluente, como é o caso de soluções líquidas à base de cloro, entre outras.

Contudo, há necessidade de estudos mais detalhados no sentido de otimizar o uso deste produto em laboratórios. A ANVISA (2003) salienta que cuidados com uso do FA devem ser tomados de forma que a sua concentração no ar seja inferior a 22 ppm. Pesquisas comprovam o efeito mutagênico e carcinogênico em cobaias expostas a altas concentrações por períodos prolongados (CHANET e BORSTEL, 1979; NISHIOKA, 1973; SWENBERG et al., 1980; ROHDE, 1993).

A fim de minimizar a inalação do gás FA durante a manipulação, é recomendada a instalação de exaustores no ambiente onde os recipientes de desinfestação são abertos após os períodos de exposição. Além disso, é importante que o manuseio das pastilhas seja feito com auxílio de luvas ou pinças, evitando o contato direto com a pele.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro, e à Dra. Carla Azambuja Centeno Bocchese (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) pela identificação dos microorganismos.

Referências

- ANDRADE, D.; SANTOS, L.S.; OLIVEIRA, B.A.; BERALDO, C.C. Alcoois: a Produção do Conhecimento com Ênfase na sua Atividade Microbiana. *Medicina Ribeirão Preto*, Ribeirão Preto, v. 35, n. 3, p. 7-13, 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Tecnologia de Produtos para a Saúde: Autorização*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/produtosauade/produtosauade/autoseguro.htm>>. Acesso em: 31 out. 2005.
- BARBIERI, A.G.; MERCADO, M.E.E.; HENRIQUES, J.A.P.; AYUB, M.A.Z. Hiperresistência de Leveduras *Kluyveromyces marxlanus*, *K. lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* ao Aldeído Fórmico. In.: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 1993, Porto Alegre. Resumos... Porto Alegre: PROPESQ/UFRGS, 1993. p. 146.
- CHANET, R.; BORSTEL, R.C. Genetic Effects of Formaldehyde in Yeast. III Nuclear and Cytoplasmic mutagenic effects. *Mutation Research, Amsterdam*, v. 62, p. 239-253, 1979.
- FIOR, C.S.; PRESTES, C.G.; RODRIGUES, L.R. Desinfestação com Paraformaldeído no Cultivo *in vitro* de *Limonium platyphyllum* Linkz. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, v. 1, n. 1, p. 24-30, 2005.
- GRAZIANO, K.U.; CIANCIARULLO, T.I.; GONTIJO-FILHO, P.P. Avaliação da Atividade Esterilizante do Paraformaldeído. *Revista Brasileira de Enfermagem*, Brasília, v. 42, n. 1/2-3/4, p. 79-89, 1989.
- JUNFENG-ZHANG; SMITH, K.R. Emission of Carbonyl Compounds from Various Cookstoves in China. *Environmental Science & Technology*, Iowa, v. 33, n. 14, p. 2311-2320, 1999.
- LEIFERT, C.; MORRIS, C.E.; WAITES, W.M. Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Science*, Knoxville, v. 13, n. 2, p. 139-183, 1994.

- MECKE, P. Desinfection and Sterilization of Thermolabile Instruments with Gaseous Formaldehyde. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*, Stuttgart, v. 179, p. 529-43, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, Köpenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NISHIOKA, H. Lethal and Mutagenic Action of Formaldehyde in Hcr + and Hcr - strains of *Escherichia coli*. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 261-265, 1973.
- NUNES, V.F.; PRESTES, C.G. Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003. Comunicação Pessoal.
- RODHE, C.; SILVA, L.B.; VALIATI, V.H.; GAIESKY, V.L.S.V. Heterocromatina Intercalar Revelada por Bandeamento C nos Cromossomos Politénicos de Espécies do Grupo willistoni de *Drosophila*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 167, 1993.
- RODRIGUES Jr., A. A. Vidro Comercial como Detector e Medidor de Radiação num Irradiador de Grande Porte. São Paulo: USP, 2000. 92 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nucleares) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-29102003-105733/publico/arydis.pdf>> Acesso em: 9 jun. 2005.
- SWENBERG, J.A.; KERNS, W.D.; MITCHELL, R.I.; GRALLA, E.J.; PAVKOV, K.L. Induction of Squamous Cell Carcinomas of the Rat Nasal Cavity by Inhalation Exposure to Formaldehyde Vapor. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 40, n. 9, p. 3398-3402, 1980.
- TASHKOV, W. Determination of Formaldehyde in Foods, Biological Media and Technological Materials by Headspace gas Chromatography. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 43, n. 11-12, p. 625-627, 1996.
- TREZL, L.; CSIBA, A.; JUHASZ, S.; SZENTGYORGYI, M.; LOMBAI, G.; HULLAN, L. Endogenous Formaldehyde Levels of Foods and its Biological Significance. *Food Research and Technology*, Berlin, v. 205, n. 4, p. 300-304, 1997.