



## PROTOCOLO DE ASSEPSIA DA *MIKANIA LAEVIGATA* SCH. BIP EX BAKER, *ASTERACEAE* (GUACO CHEIROSO) PARA INTRODUÇÃO *IN VITRO*.

Vinicius Nolasco Werle<sup>1</sup>; Sandra Regina Cabel<sup>2</sup>;

<sup>1</sup> Pontificia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho – Curitiba, CEP 80215-901. Brasil. [vinicius.n.w@hotmail.com](mailto:vinicius.n.w@hotmail.com). [Apresentador do trabalho](#).

<sup>2</sup> Pontificia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho – Curitiba, CEP 80215-901. Brasil. [sandra.cabel@pucpr.br](mailto:sandra.cabel@pucpr.br).

### INTRODUÇÃO

*Mikania glomerata spreng* e a *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, *Asteraceae*, popularmente conhecidas como guaco (JUDD et al, 1999) e Guaco cheiroso (BRASIL, 2019), se destacam pelas suas propriedades medicinais (GASPARETTO et al., 2010). Elas são espécie originária da América do Sul, e pertencente ao gênero *Mikania* (tribo Eupatorieae, subtribo Miikaniinae) (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010) que compreende 430 espécies diferentes espalhas, majoritariamente, em regiões neotropicais (JUDD et al, 1999). A diferença entre elas está principalmente no perfil de metabólicos secundários, visto que a morfologia anatômica e estrutural são semelhantes (CRUZ et al. 2018). A *M. laevigata*, foi relatado ter maiores concentrações e de forma mais frequente de cumarina, entretanto, os compostos chave para a diferenciação são os ácidos clorogênico e dicafeoilquínico que estão em maiores concentrações na *M. glomerata* (CRUZ et al. 2018), além disso, a *M. laevigata* pode ser identificada facilmente por meio do forte odor de cumarino (BRASIL, 2019), o que pode ser um reflexo das maiores concentrações encontrados nessa espécie de cumarina.

O guaco tem como sua principal molécula terapêutica (marcador químico) a cumarina (BRASIL, 2014), e de acordo com a RDC N° 10, de 9 de março de 2010, a recomendação de uso seria por meio de chás para gripes e resfriados, bronquites alérgicas e infecciosas e como expectorante, mas também é possível utilizar o guaco por meio da tintura (ALVARENGA et al, 2009).

Além do guaco ser citado como um dos medicamentos fitoterápicos de registro simplificado (BRASIL, 2014), está listada na última versão da farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019) e é umas das 12 espécies de plantas fitoterápicas em que o SUS disponibilizada medicamente com base nelas



(BRASIL, 2022), demonstrando, dessa maneira, o interesse nacional do potencial terapêutico da *Mikania glomerata* spreng e da *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, *Asteraceae*. Entretanto, para realizar a propagação dessa espécie somente há registro na literatura de propagação por meio da técnica de estaquia (LIMA et al, 2003; PEREIRA, FRANÇA, CÂMARA, 1999; SÃO PAULO, 2021;), porém, utilizando a técnica da micropropagação é possível ter um elevado número de explantes, otimização do crescimento, permite estudos de metabólicos secundários, 5 realizar clonagem, organogênese, entre outros possibilidades (QUISEN, CRISTINA, 2008).

Ademais, a técnica de micropropagação compreende 4 etapas diferentes, entre elas, a etapa de introdução de uma cultura asséptica in vitro (GEORGE, HALL, KLERK, 2008), o qual este trabalho tem como por objetivo para a espécie *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, *Asteraceae*. Para isso, neste trabalho iremos avaliar a efetividade de descontaminação de caules dos seguintes agentes descontaminantes: Coryna 116-XC, Cercobin®, Hipoclorito de sódio e Iodopovidona comercial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

No trabalho optou-se por utilizar 4 agentes desinfestantes diferentes, sendo eles o Cercobin, Hipoclorito de Sódio, Coryna 166 X-C e Iodopovidona, contendo 3 concentrações diferentes para cada tratamento (Tabela 1), com 25 repetições cada protocolo. Foi utilizado o meio MS com adição de carvão ativo para evitar a oxidação dos explantes e estimular o crescimento de raízes.

**Tabela 1.** Protocolos de desinfecção avaliados para introdução de guaco

Tratamento	Protocolo	Tipo de desinfetante	Tempo de desinfecção (min.)
T1	P1	Hipoclorito de sódio (NaOCl) 1%	15
	P2	NaOCl 1,25%	15
	P3	NaOCl 1,5%	15
T2	P4	Cercobin® 1g/L	15
	P5	Cercobin® 2/L	15
	P6	Cercobin® 3/L	15
T3	P7	Coryna 116 X-C 0,5%	15
	P8	Coryna 116 X-C 0,75%	15
	P9	Coryna 116 X-C 1%	15
T4	P10	Iodopovidona 1%	15
	P11	Iodopovidona 1,5%	15
	P12	Iodopovidona 2%	15

FONTE: O autor (2024)

Para realizar a extração dos explantes, foi definido priorizar calos que contenham menos lignina, ou seja, caules mais jovens, além disso, como não dispúnhamos de uma planta matriz e precisaríamos de grandes quantidades de explantes, optou-se por adquirir mudas comercialmente. Como método de identificação das mudas, foi utilizado a morfologia das folhas para a comprovação de mudas da espécie *Mikania laevigata* com base nos estudos de Cruz et al. (2018) e Santos (2005).

O método de assepsia consiste em 5 passos, primeiro é realizado a pré lavagem em agitação utilizando detergente e água corrente para limpar sujeiras superficiais, após isso, é realizado a



imersão em agitação em solução de álcool etílico 70% por 30 segundos para desfazer qualquer acúmulo de gordura e eliminar bolhas de ar, em seguida, imersão em agitação em Hipoclorito de sódio a 1% + 3 gotas de Tween 20 por 15 minutos, aplicação do tratamento por 15 minutos em agitação (exceto para o tratamento com hipoclorito de sódio) e enxague 3 vezes em capela de fluxo laminar com água deionizada autoclavada.

Após a introdução *in vitro* os explantes foram deixados em uma incubadora a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ , além disso, por 1 semana, os explantes foram deixados em uma cobertura feita com papel alumínio para evitar a passagem de luz.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura existem poucos trabalhos publicados utilizando a técnica de micropropagação aplicado ao Guaco, entre os trabalhos, dois estudos descreveram seus protocolos de assepsia utilizados. Mendes e Pezzopane (2012) utilizaram o hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min e Pereira, França e Câmara (1999) utilizaram o hipoclorito de sódio a 0,25 % por 30 min, posteriormente, imergiram os caules em solução gentamicina a 0,001%, entretanto, somente o segundo trabalho apresentou os seus resultados, apresentando 90% de contaminação dos explantes. Devido a isto, este trabalho não tem muitas bases teóricas para comparar o resultado com outros protocolos aplicados à *M. laevigata*.

Entretanto, podemos comparar com dados obtidos em outras espécies, mesmo não sendo o cenário ideal. Os explantes ficaram um período médio de 18 dias *in vitro*, entretanto, houve uma exceção com o tratamento de hipoclorito de sódio a 1,50% que ficou por um mês. Nos protocolos utilizando hipoclorito de sódio, o tratamento de 1,50% teve a maior taxa de descontaminação de todos os tratamentos, alcançando a taxas de 84% de explantes viáveis, as concentrações menores de hipoclorito alcançaram taxas semelhantes, em torno de 45% (Fig. 1).

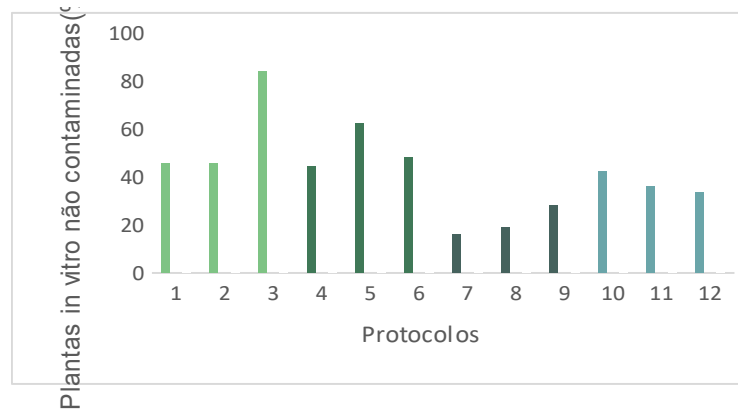
O antifúngico Cercobin®, na concentração de 2 g/L, teve a segunda maior taxa de descontaminação, alcançando 62,5% de explantes viáveis, onde foi possível perceber que sua ação contra a contaminação fúngica foi eficiente, apesar da presença de contaminação bacteriana em 13% dos casos. (Fig. 1). Em seu estudo Ishibashi et al (2017) relatou um índice de desinfestação de 62,5% aos 14 dias de cultivo utilizando explantes de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. O ensaio envolveu a imersão dos explantes por 2 g L-1 de Cercobin® 2 ml + L-1 Kasumin® por 20 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos. Os autores afirmam que o uso de Cercobin® é mais favorável quando há a adição do fungicida ao meio de cultura do que somente a imersão em solução fungicida (ISHIBASHI et al, 2017).

A análise do tratamento com Corynna revelou uma alta suscetibilidade à contaminação fúngica, atingindo até 64% em certas concentrações. Paralelamente, observou-se que a viabilidade dos explantes, embora baixa, apresentou uma variação crescente conforme o aumento da concentração, atingindo um pico de 28% a 1% (Fig. 2 - P9). Esses resultados demonstram que as



concentrações utilizadas foram baixas, dessa maneira, outros estudos deveriam ser feitos, entretanto, com concentrações mais altas. Com relação ao tratamento utilizando o Iodopovidona, a viabilidade dos explantes manteve-se relativamente baixa, variando entre 33% e 42%, (Fig. 1) representando o menor rendimento comparado aos demais tratamentos testados.

**Figura. 1.** Porcentagem de explantes introduzidas in vitro com sucesso 18 dias após o cultivo in vitro.

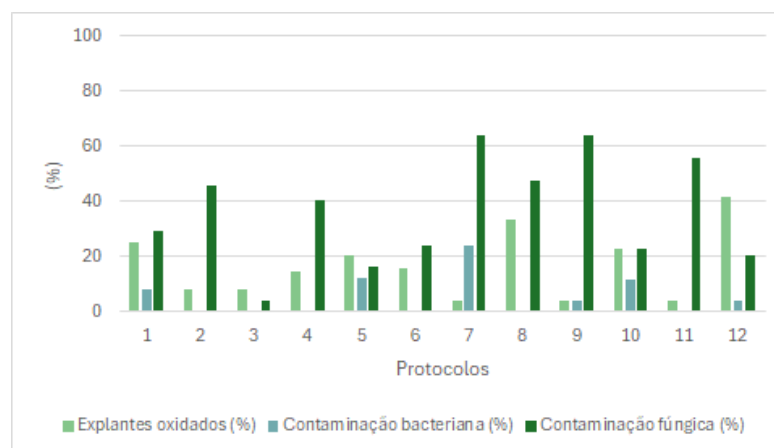


Fonte: Os autores, 2024.

No geral, a oxidação não foi um problema nos protocolos, exceto no protocolo 12, utilizando Iodopovidona a 2%, em que as taxas de oxidações chegaram a 41,7% (Fig. 2). Podemos associar a baixa taxa geral de oxidação a utilização do carvão ativado no meio de cultura, pois, o carvão tem a capacidade de absorver compostos fenólicos e outras substâncias tóxicas liberadas, promovendo a desinfestação de forma não agressiva aos tecidos vegetais e, assim, minimizando a ocorrência de oxidação. (GEORGE, SHERRINGTON, 1984).

Ao realizarmos o qui-quadrado de independência, por meio do excel, a análise demonstrou que há associação entre a quantidade de explantes viáveis e os tratamentos ( $X = 37.464$ ;  $p < 0,001$ ). Além disso, a análise dos resíduos padronizados ajustados mostrou que o tratamento 1, 2 e 3 apresenta mais explantes viáveis do que o esperado.

**Figura. 2.** Taxa de contaminação bacteriana, fúngica e oxidação por protocolo



Fonte: Os autores, 2024.



Conforme podemos observar na tabela 2, o Guaco ao ser introduzido *in vitro*, tem um comportamento de crescimento muito positivo, produzindo bastante brotações e tendo uma taxa de até 38% de formação de raízes sem a utilização de fitohormônios.

**Tabela 2.** Desempenho dos Protocolos de Cultura In Vitro: Taxa de Enraizamento e Porcentagem Média de Brotações por Explante

Protocolo	Taxa de raízes (%)	Média de Brotações por Protocolo (%)
P1	4	54
P2	29	71
P3	20	96
P4	11	85
P5	38	100
P6	32	84
P7	12	28
P8	5	38
P9	24	52
P10	23	81
P11	12	72
P12	8	46

FONTE: O autor (2024).

## CONCLUSÃO

O Guaco (*Mikania laevigata*) tem um ótimo comportamento ao ser introduzido *in vitro*, com apenas um tratamento simples utilizando álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1,50, é possível obter 84% por explantes descontaminados, embora ainda sejam necessárias otimizações na concentração e tempo, além disso, é uma espécie que cresce bem *in vitro* sem a necessidade de fitohormônios, refletindo a sua propensão em ser micropropagada.

## AGRADECIMENTO

Aos colegas David Michel e Edson Kenzo pela ajuda na estatística e nas etapas práticas do trabalho.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, F. GARCIA, E. BASTOS, E. GRANDI, T. DUARTE, M. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 442-448, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300018>>. Acesso em: 23 mai 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira 6ª Edição: Volume II – Monografias (Plantas medicinais). 744 p, Brasília, DF, 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/6a-edicao-volume-2>>. Acesso em: 24 mai 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa N° 02 De 13 De Maio De 2014, publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro



simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de mai 2010. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/instrucao-normativa-in-no-2-de-13-de-maio-de-2014.pdf/view>>. Acesso em: 23 mai 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME. 181 p, Brasília, DF, 2022. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/publicada-a-relacao-nacional-de-medicamentos-renomado-2022/>>. Acesso em: 23 mai 2024.

CRUZ, V. AUGUSTO, A. LISCHKA, J. CHRISTINE, A. Comparison of the morphology, anatomy, and chemical profile of *Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*. **Planta Medica**, v. 84, n. 03, p. 191-200, 2018. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0043-119226>>. Acesso em: 23 mai 2024.

GASPARETTO, J. CAMPOS, F. BUDEL, J. PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, *Asteraceae*: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/SNxzTRTMQmjYwCnQyqQGhxH/>>. Acesso em: 23 mai 2024.

GEORGE, E. HALL; M. KLERK, G. **Plant propagation by tissue culture**. 3º edição. Dordrecht: Springer, 2008. p. 57-59. ISBN 978-1-4020-5005-3 (*e-book*). Acesso em: 19 abr 2024.

GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstone: Exegetics, 1984. 709p. ISBN: 978-0950932507. Acesso em: 19 abr 2024.

ISHIBASHI, V., VANELLI, K FLÔRES, P. RIOYEI, A. Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild.(Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909**, v. 13, n. 1, p. 15-21, 2017. Disponível em: <<http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/104>>. Acesso em: 25 mai. 2024.

JUDD, W., CAMPBELL, C., KELLOGG, E., DONOGHUE, M. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Ecologia mediterrânea**, v. 25, n. 2, p. 215, 1999. Acesso em: 23 mai 2024.

LIMA, N., BIASI, L., ZANETTE, F., NAKASHIMA, T. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura brasileira**, v. 21, n. 1, p. 106-109, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000100022>>. Acesso em: 23 mai 2024.

MENDES, D; PEZZOPANE, G. Cultura De Tecidos Do Guaco (*Mikania Glomerata*): Protocolos Iniciais Para A Cultura In Vitro. In: Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense, I, 2012, Criciúma. Anais, Criciúma: Revista Técnico-Científica do IFSC. 2012. Disponível em: <<https://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/741>>. Acesso em: 25 mai 2024.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809–820, jul. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1211/jpp.62.07.0001>>. Acesso em: 20 de abril de 2024.

PEREIRA, A., FRANÇA, S., CÂMARA, F. Vegetative Propagation of *Mikania Glomerata*: Micro-Propagation And Cuttings. **Acta Horticulturae**, v. 502, n. 20, p. 347-352, 1999. Disponível em: <[https://www.actahort.org/books/502/502\\_57.htm](https://www.actahort.org/books/502/502_57.htm)>. Acesso em: 24 mai 2024.

QUISEN, R; CRISTINA, P. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. 1º Edição. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.



Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/665576/manual-de-procedimentos-do-laboratorio-de-cultura-de-tecidos-da-embrapa-amazonia-ocidental>>. Acesso em: 18 abr 2024

SANTOS, S. Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* SCHULTZ BIP. EX BAKER e *M. glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar. Tese (Mestrado Ciências Farmacêutica) - Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Itajaí, 93 p, 2005. Disponível em: <[https://www.univali.br/Lists/TrabalhosMestrado/Attachments/283/SHEILA\\_CRISTINA\\_DOS\\_SANTOS.pdf](https://www.univali.br/Lists/TrabalhosMestrado/Attachments/283/SHEILA_CRISTINA_DOS_SANTOS.pdf)>. Acesso em: 23 mai 2024.

SÃO PAULO. Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Comunicado técnico dextru 02/2021: Guaco *Mikania glomerata* Spreng. e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker. 5 p, Campinas, SP, 2021. Disponível em: <[https://www.cati.sp.gov.br/portal/themes/unify/arquivos/produtos-e-servicos/acervo-tecnico/producao\\_vegetal/comunicado-tecnico-guaco.pdf](https://www.cati.sp.gov.br/portal/themes/unify/arquivos/produtos-e-servicos/acervo-tecnico/producao_vegetal/comunicado-tecnico-guaco.pdf)>. Acesso em: 23 mai 2024