

Conservação *in vitro* através do crescimento lento de *Carapichea ipecacuanha* (Brot) L. Andersson (ipeca)

In vitro conservation through slow growth of *Carapichea ipecacuanha* (Brot) L. Andersson (ipeca)

DOI: 10.55905/oelv21n11-236

Recebimento dos originais: 20/10/2023

Aceitação para publicação: 22/11/2023

Tássia Alana Alves Ferreira

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)
Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém, Pará
E-mail: tassia.alana@gmail.com

Maria Sintia Monteiro da Costa

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)
Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém, Pará
E-mail: sintiamonteiro@hotmail.com

Ana Caroline Batista da Silva

Graduada em Engenharia Agrônômica
Instituição: Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)
Endereço: Av. Tancredo Neves, 2501, Terra Firme, Belém, Pará
E-mail: anacarolinebatista79@gmail.com

Alex Santos Guedes

Graduando em Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)
Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém, Pará
E-mail: alex.guedes@icb.ufpa.br

Ana Paula Ribeiro Medeiros

Doutora em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares
Instituição: Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Sustentabilidade
Endereço: Tv. Lomas Valentinas, 2717, Marco, Belém, Pará
E-mail: paula.amedeiros@hotmail.com

Anderson da Silva Costa

Doutor Biodiversidade e Biotecnologia
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental
Endereço: Av. Perimetral, s/n, Marco, Belém, Pará
E-mail: anderson.costa@embrapa.br

Simone Rodrigues de Miranda

Doutora Biologia Molecular
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental
Endereço: Av. Perimetral, s/n, Marco, Belém, Pará
E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

Osmar Alves Lameira

Doutor em Fitotecnia, Biotecnologia de Plantas
Instituição: Embrapa Amazônia Oriental
Endereço: Av. Perimetral, s/n, Marco, Belém, Pará
E-mail: osmar.lameira@embrapa.br

RESUMO

A *Carapichea ipecacuanha*, popularmente conhecida como ipeca, é uma herbácea com propriedades emética, expectorante e amebicida, atividades farmacológicas relacionadas aos alcaloides, emetina e cefalina encontrados em suas raízes. Com o aumento do desmatamento da floresta, em regiões de ocorrência da ipeca, juntamente com o extrativismo predatório, devido as raízes da ipeca terem alto valor, ocorre a erosão genética, sendo necessário adotar estratégias de conservação desse material genético. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para a ipeca, visando o crescimento lento. Os explantes de ipeca foram inoculados em meio MS em duas salas distintas. Sala 1: temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, três diferentes irradiâncias de luz LED branca: 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Sala 2: temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de luz fluorescente branca fria: $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Na temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a sobrevivência abaixo de 50% durante os 480 dias avaliados, demonstra que a ipeca tem tolerância mediana em menores temperaturas. Na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve porcentagem de sobrevivência de 100% até 360 dias. Na avaliação da altura, na primeira avaliação, as irradiâncias de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a altura média das plântulas foi de 0,25; 0,20 e 0,19 cm, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre as diferentes irradiâncias durante todo o experimento. O tratamento de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, obteve alturas médias acima dos tratamentos 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em todas as avaliações. Em relação ao número de brotações, em todas as avaliações, as irradiâncias de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não apresentaram número de brotos significativos para a realização da análise estatística. Conclui-se que diferentes irradiâncias não alteram o crescimento, mas uma menor temperatura induziu o crescimento lento da ipeca, sendo uma estratégia eficaz para a conservação *in vitro* dessa espécie.

Palavras-chave: cefalina, emetina, micropropagação, recursos genéticos vegetais.

ABSTRACT

Carapichea ipecacuanha, popularly known as ipecac, is a herbaceous plant with emetic, expectorant, and amebicide properties, pharmacological activities related to alkaloids, emetine, and cephalin found in its roots. With the increase in deforestation of the forest, in regions where ipeca occurs, along with predatory extraction, due to the roots of ipeca having high value, genetic erosion occurs, and it is necessary to adopt strategies for the conservation of this genetic material. The objective of the present study was to develop an in vitro conservation protocol for ipecca, aiming at slow growth. The ipeca explants were inoculated into MS medium in two distinct rooms. Room 1: temperature $18 \pm 1^\circ\text{C}$, three different irradiances of white LED light: 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Room 2: temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiance of cold white fluorescent light: $25 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. At a temperature of $18 \pm 1^\circ\text{C}$, survival below 50% during the 480 days evaluated demonstrates that ipeca has median tolerance at lower temperatures. At a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, the irradiance of $25 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ achieved a survival percentage of 100% for up to 360 days. In the height assessment, at the first assessment, the irradiances of 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, at $18 \pm 1^\circ\text{C}$, the mean seedling height was 0.25, 0.20 and 0.19 cm, respectively. There was no statistically significant difference between the different irradiances during the whole experiment. Treatment of $25 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, achieved mean heights above treatments of 35, 45, and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in all assessments. In relation to the number of shoots, in all evaluations, the irradiances of 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ did not show any significant number of shoots for carrying out the statistical analysis. It is concluded that different irradiances do not alter growth, but a lower temperature induced the slow growth of ipeca, being an effective strategy for the in vitro conservation of this species.

Keywords: cephalin, emetine, micropropagation, plant genetic resources.

1 INTRODUÇÃO

A *Carapichea ipecacuanha*, família Rubiaceae, é popularmente conhecida por ipeca ou poaia (LAMEIRA, 2002). A origem do nome popular tem origem de indígenas brasileiros (SANDWITH et al., 1914 *apud* FERREIRA JÚNIOR et al., 2012), cuja etimologia vem das palavras indígenas ipê (casca), caa (planta), cua (perfumado), nha (ranhurado) (SAINT-HILAIRE, 2009).

A ipeca pode ser encontrada em florestas e regiões de vegetação adensada em boa parte do território brasileiro (NEVES et al., 2019). O uso medicinal da ipeca é diverso, mas os principais usos estão relacionados as suas propriedades emética, expectorante e amebicida, atividades farmacológicas relacionadas aos alcaloides, emetina e cefalina (LAMEIRA, 2002; CAMPELO et al., 2021).

Figura 1: Plantas de ipeca pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará, Brasil.



Fonte: Autores (2023).

O desmatamento em regiões de ocorrência natural da ipeca, juntamente com o extrativismo indiscriminado, resulta na erosão genética dessa espécie. A preocupação com a erosão genética de espécies, deu origem a conservação *in vitro*, de modo a proteger germoplasmas de eventuais perdas e garantir seu uso futuro (SOUZA et al., 2009; TYAGI et al., 2009)

Assim, adotar estratégias de conservação da ipeca é essencial para a manutenção da variabilidade genética dessa espécie que tem elevado valor econômico atual e potencial (ALVES; AZEVEDO, 2018).

A micropropagação, aplicada a conservação *in vitro* de plantas, resulta no aumento do intervalo entre os subcultivos (COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012). O crescimento lento e sucesso na conservação *in vitro* envolve a otimização de condições da cultura *in vitro*. Em geral, a temperatura, a luz e o meio de cultura são os principais fatores na conservação *in vitro* de diversas espécies (DA SILVA et al., 2016), sendo a

redução na temperatura o método mais empregado para reduzir o crescimento *in vitro* de plantas (COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a temperatura e a luminosidade (irradiância), podem ser usados como estratégias de conservação *in vitro* (crescimento lento) para a ipeca.

2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos (LBRG), da Embrapa Amazônia Oriental, localizada em Belém, Pará. Os explantes (gemas) utilizados neste estudo foram obtidos de plantas micropropagadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pertencentes ao LBRG.

2.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTURA

Os explantes de ipeca, medindo aproximadamente 1,0 cm, foram inoculados horizontalmente em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS. Os meios foram suplementados com sacarose ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$), o pH foi ajustado a $5,7 \pm 0,1$ e em seguida gelificados com Phytigel™ ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$). Os frascos contendo os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

Na sala de conservação, temperatura de $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$, os frascos foram mantidos sob as fontes de luz: lâmpada LED branca. Irradiância de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (9 W), irradiância de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (12 W) e irradiância de $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (15 W), durante um fotoperíodo de 12 horas/dia.

Esse experimento foi comparado com as condições do controle (testemunha), usado no laboratório para a produção de mudas: temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, os frascos foram mantidos sob a fonte de luz: lâmpada tubular fluorescente branca fria Empalux® e irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante um fotoperíodo de 14 horas/dia.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições por tratamento (irradiância), sendo cada repetição composta por 3 explantes.

2.3 INDICADORES NA CONSERVAÇÃO *in vitro*

Foram avaliados durante 480 dias (16 meses), mensalmente, indicadores quantitativos e qualitativos como contaminação (fungo ou bactéria), altura da planta, número de brotações, sobrevivência. A altura da planta ocorreu por medição direta aproximada com régua graduada, ocorrendo sem que houvesse a remoção da plântula de dentro do frasco.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença das amostras (altura e número de brotações) foi calculada com a utilização do software BioEstat versão 5.3. (AYRES et al., 2007). Para verificar a normalidade dos dados, foi usado o teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (Dunn). O valor do nível de significância foi de 5%.

3 RESULTADOS

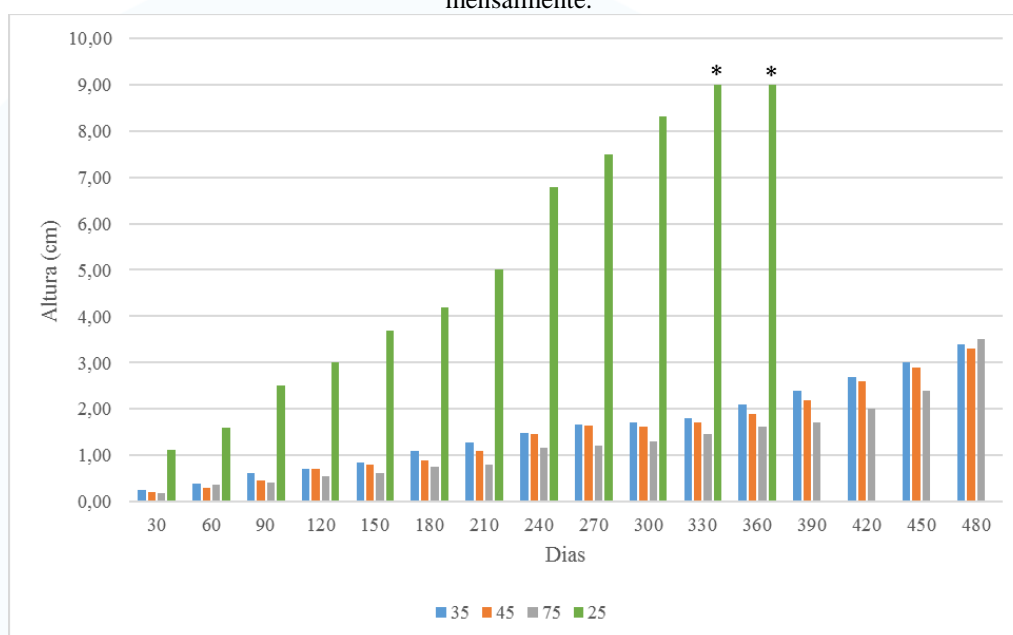
Na sala de conservação, temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obtiveram porcentagem de sobrevivência abaixo de 50% nos 480 dias (16 meses), sendo os descartes por oxidação, com ausência de contaminação bacteriana ou fúngica. Na sala de multiplicação, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve porcentagem de sobrevivência de 100% até 360 dias de avaliação, sendo o descarte por senescência.

Na avaliação da altura, na primeira avaliação, nos tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, alocados na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a altura média das plântulas foi de 0,25; 0,20 e 0,19 cm, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Nas avaliações seguintes, a altura média dos tratamentos aumenta discretamente, mas a indiferença estatística permanece entre os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante os 480 dias (16 meses) (Figura 2).

Na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, nos 480 dias avaliados, os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não atingiram o limite de 9 cm do frasco. Enquanto que na sala de multiplicação, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve alturas

médias acima dos tratamentos 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em todas as avaliações. A altura máxima de 9 cm foi atingida em 330 dias (11 meses) (Figura 2).

Figura 2: Altura média das plântulas de *C. ipecacuanha*. Irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Irradiâncias de 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservação *in vitro* após 480 dias, avaliadas mensalmente.



Fonte: Autores (2023).

*Limite de altura de 9 cm.

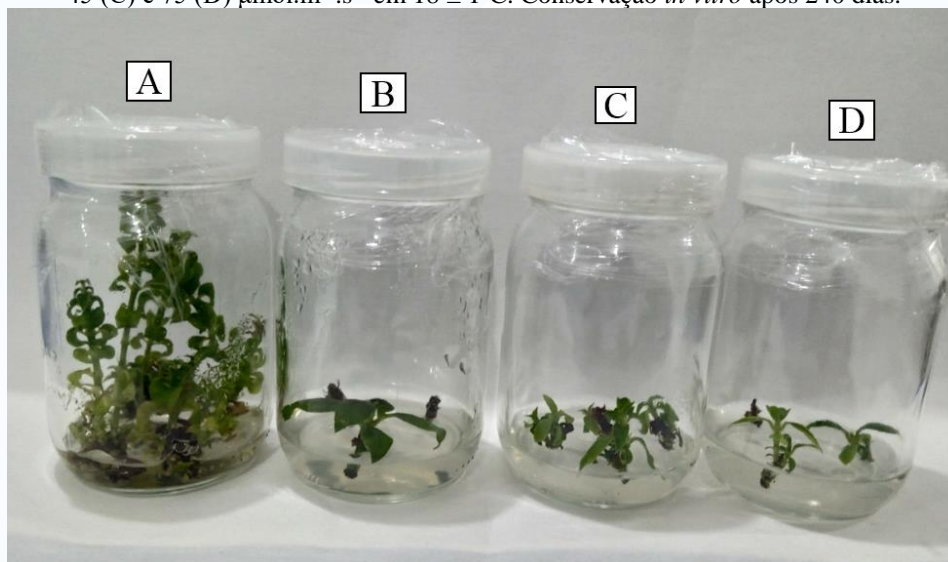
A redução no metabolismo das plântulas, na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, resultou na ausência até 300 dias (10 meses), no número de brotos significativos para análise estatística. Além disso, também houve ausência na presença de raízes nas plântulas.

A indiferença estatística entre as irradiâncias de 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figuras 3B, 3C, 3D), alocados na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, sugere que a luz, através de diferentes irradiâncias, não alterou de forma significativa o crescimento das plântulas *in vitro*. Enquanto que a temperatura foi determinante na diminuição no crescimento apical das plântulas de ipeca.

Apesar de diferentes irradiâncias não terem alterado de forma significativa o desenvolvimento *in vitro* da ipeca, o tratamento de menor irradiância 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi o tratamento que apresentou maior viabilidade de conservação *in vitro*.

A análise estatística somente foi realizada entre as irradiâncias, alocadas na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, porque a irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, foi alocada em sala com temperatura e irradiância diferentes das analisadas nas irradiâncias de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Assim, a comparação estatística seria questionável.

Figura 3: *C. ipecacuanha in vitro*. Irradiância de 25 (A) $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Irradiâncias de 35 (B) 45 (C) e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservação *in vitro* após 240 dias.



Fonte: Autor (2023).

4 DISCUSSÃO

A conservação *in vitro* baseada no crescimento lento, desacelera o desenvolvimento das plântulas, o que, por sua vez, estende o intervalo entre as subculturas. Como consequência, há a redução de despesas laboratoriais (reagentes) e mão de obra qualificada. Além disso, essa abordagem contribui para a minimização das potenciais perdas por contaminações (bactérias ou fungos) durante o subcultivo (BENELLI et al., 2022).

O prazo para conservação *in vitro* varia entre curto e médio. Algumas espécies exibem um crescimento naturalmente lento quando cultivadas *in vitro*. No entanto, na maioria das espécies, o crescimento lento é induzido por meio da manipulação de fatores, tais como menores temperaturas, a utilização de reguladores de crescimento, a diminuição

de nutrientes no meio de cultura, a supressão ou completa eliminação da luz, entre outras estratégias (COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012; DA SILVA et al., 2016)

Na sala de conservação a $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$, nos 480 dias (120 semanas), os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não necessitaram de subcultivo. A redução no crescimento *in vitro* da ipeca, provavelmente, foi devido a menor temperatura da sala de conservação. Na conservação *in vitro* de plantas, a redução da temperatura é o método mais abordado e eficaz (COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012).

Da Silva e colaboradores (2023), investigaram o desenvolvimento *in vitro* da herbácea *Aeollanthus suaveolens* (catinga de mulata). Como resultado, diferentes irradiâncias de fótons (luz), promoveram mudanças significativas na altura e no número de brotos durante o processo de regeneração *in vitro*.

Chaudhuri e Jha (2008), relataram a conservação *in vitro* de *Cephaelis ipecacuanha* Rich. (ipeca) a longo prazo, por mais de 12 anos. A micropropagação ocorreu em meio MS com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento como cinetina, benzilaminopurina, 6-(g,g-dimetilaliminol) purina, ácido 1-naftalenoacético e adenina. A viabilidade da cultura foi testada após o período de conservação e a regeneração foi realizada com sucesso. Entretanto, o uso de reguladores de crescimento podem alterar o metabolismo das plantas (ONG et al., 2011). Na conservação *in vitro* de ipeca, não foi necessário o uso de reguladores de crescimento, sendo uma metodologia eficaz para a conservação *in vitro* dessa espécie.

Desenvolver protocolos de conservação *in vitro* de plantas é fundamental importância para resguardar bancos e coleções de germoplasma (PÁDUA; ALBUQUERQUE; MELLO, 2020) que podem estar em risco de erosão genética. O melhoramento genético de plantas depende da identificação e utilização de variantes genéticas de uma espécie, resultando no desenvolvimento de novas plantas com características desejáveis como maior produtividade ou resistência a condições ecológicas desafiadoras (SOUZA et al., 2009).

Além disso, a conservação *in vitro* é vantajosa em relação a conservação em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), pois ocupa menos espaço e oferece maior segurança contra doenças, pragas e mudanças climáticas (ARBELOA et al., 2017).

5 CONCLUSÕES

- Para a conservação *in vitro*, visando o crescimento lento, o fator temperatura é eficiente na diminuição do crescimento das plântulas de ipeca e o fator irradiância não demonstrou alterar de forma significativa o metabolismo das plântulas de ipeca.
- Na conservação *in vitro* da ipeca, o prolongamento entre os subcultivos é de pelo menos 480 dias (120 semanas).

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA), da Embrapa Amazônia Oriental e da Universidade Federal do Pará (UFPA).

REFERÊNCIAS

- AYRES, M. et al. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências Biomédicas**. 5ª edição. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007, p. 364
- ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 350–360, 2018.
- ARBELOA, A. et al. *In vitro* conservation of fruit trees by slow growth storage. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 101–106, 2017.
- BENELLI, C. et al. *In Vitro* Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 1–18, 2022.
- CAMPELO, M. F. et al. Fenologia reprodutiva de *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson e sua correlação com a temperatura média do ar e precipitação pluviométrica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2021.
- CHAUDHURI, R. K.; JHA, T. B. Conservation and Production of Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* Rich.) Plants from Long Term Shoot Cultures. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 157–164, 2008.
- COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. 1ª edição ed., Brasília: Embrapa, 2012.
- DA SILVA, A. C. B. et al. Efeito da intensidade de luz no desenvolvimento de espécies medicinais e aromáticas em condições *in vitro*. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v. 16, n. 5, p. 2632–2649, 2023.
- DA SILVA, R. L. et al. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 123–133, 2016.
- FERREIRA JÚNIOR, W. S. et al. Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 4, p. 103–112, 2012.
- LAMEIRA, O. A. Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. **Circular técnica Embrapa**, v. 28, p. 1–4, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NEVES, R. L. P. et al. **CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA PARTE AÉREA DE ACESSOS DE PSYCHOTRIA IPECACUANHA (IPECA)**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. p. 13-24
- ONG, S. et al. Production of Flavonoid compounds in cell cultures of *Ficus deltoidea* as influenced by medium composition. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 2, p. 62–74, 2011.

PÁDUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; MELLO, S. C. M. DE. Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: Conservação e uso. **Documentos Embrapa**, v. 371, p. 1–167, 2020.

SAINT-HILAIRE, A. **Plantas usuais dos brasileiros**. 1ª edição ed., Belo Horizonte: Fino Traço Editora Ltda, 2009, p. 348

SANDWITH, F.M.; DURH, M.D.; LOND, F.R.C.P. The lettsonian lectures on dysentery. **The Lancet**. v.184, n. 4751, p. 731–736, 1914.

SOUZA, A. DA S. et al. Preservação de Germoplasma Vegetal, com Ênfase na Conservação *in vitro* de Variedades de Mandioca. **Circular Técnica Embrapa** v. 90, p. 1–24, 2009.

TYAGI, R. K. et al. Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 6, p. 721–729, 2009.