

# Micropropagação e conservação de *Lychnophora ericoides* Mart.: uma espécie medicinal do cerrado brasileiro

## In vitro propagation and germoplasm conservation of *Lychnophora ericoides* Mart: a medicinal species from the Brazilian cerrado

<sup>1</sup>\*Pereira, A. M. S.; <sup>1</sup>Bertoni, B. W.; <sup>1</sup>Fonseca, V. S.; <sup>2</sup>Amarante, M. F. C.; <sup>2</sup>Lopes, N. P.; <sup>2</sup>Paron, M. E.; <sup>1</sup>França, S. C.

<sup>1</sup>Unidade de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Avenida Costábile Romano, 2201, 14096-380 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP.

\*Correspondência: E-mail: apereira@unaerp.br

**Unitermos:** Cultura de células, Arnica, Lactones sesquiterpênicas, Metabólitos secundários.

**Key words:** Cell culture, Arnica, Sesquiterpene lactones, Secondary metabolites.

### Resumo

Gema apical e embriões de *Lychnophora ericoides* foram cultivados in vitro em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA). A concentração de 1,11 M de BAP foi a mais adequada ao desenvolvimento das plântulas (1,02 cm) e a concentração de 4,93 M de ácido 3-butil-indolacético (ABI) promoveu melhor enraizamento. Análises de extratos de plântulas micropropagadas e cultivadas a partir de sementes foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), e o perfil químico de ambos extratos mostraram-se semelhantes quanto à presença de lactonas sesquiterpênicas. A conservação de plântulas de *L. ericoides* em banco de germoplasma in vitro foi realizada em meio de cultura meio de Murashige and Skoog MS/2, suplementado com 2% de sacarose e 4% de sorbitol (p/v). As plântulas foram mantidas nesse meio por 10 meses com 96,6 % de sobrevivência.

### Abstract

Axillary buds excised from *Lychnophora ericoides* in vitro plantlets were inoculated onto MS medium supplemented with different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and indolacetic acid (IAA). Developed plantlets were transferred to MS medium supplemented with indol-3-butyl-acetic acid (IBA) or naphthalenacetic acid (NAA) for rooting. BAP at a concentration of 1,11 M promoted plant growth (1,02 cm). Murashige and Skoog half-strength medium (MS/2) medium supplemented with indol-3-butyl-acetic acid (IBA, 4,93 M) was the most suitable for rooting. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis of the in vitro and ex vitro plant extracts showed the presence of sesquiterpene lactones. For germoplasm maintenance, cultures of *L. ericoides* were stored on MS/2 with 3% (w/v) sucrose plus 4% (w/v) sorbitol and maintained viable at a low growth rate with no subcultures during 10 months.

### Introdução

O gênero *Lychnophora* (Asteraceae) tem sido bastante estudado por conter biomoléculas com atividade antitumoral (PETIT et al., 1990), tripanocida (OLIVEIRA et al., 1996; GRAEL et al., 2000) e antimicro-



biana (MIGUEL et al., 1996). Estudos fitoquímicos com *L. ericoides* e *L. pseudovillosissima* levaram ao isolamento de lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e flavonas (BORELLA et al., 1998). Duas entre as várias substâncias isoladas, centraterina e goyazensolida, mostraram potente ação antiinflamatória *in vitro* pela inibição seletiva de fator de transcrição NF- $\kappa$ B (RUNGELER et al., 1999).

*L. ericoides* é conhecida no Brasil como arnica da serra e a alcoolatura das folhas é indicado como analgésico e antiinflamatório. Devido sua eficácia terapêutica, desde o século XVIII *L. ericoides* tem sido coletada indiscriminadamente e o número de indivíduos e populações desta espécie no cerrado brasileiro está drasticamente reduzido (BASTOS et al., 1987). De acordo com a Sociedade Brasileira de Botânica (SBB, 1992) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (BRASIL, 1992), a erosão genética causada pela coleta indiscriminada de plantas e a falta de metodologia de propagação apropriada vêm levando a *L. ericoides* à extinção. A arnica da serra é um arbusto que cresce no cerrado, compondo especificamente a florística de campo rupestre. O bioma cerrado é considerado um dos reservatórios de plantas e de vida animal mais ricos e ameaçados do planeta e foi classificado como *hotspot* (MITTERMEIER et al., 2000). Diante disto, estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies do cerrado incluindo propagação assexuada para conservação merecem grande atenção. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo otimizado para a propagação *in vitro* e conservação do germoplasma de *L. ericoides*. Este é o primeiro relato sobre cultura de tecidos de *L. ericoides* para o desenvolvimento de tecnologia *in vitro*, visando à propagação e conservação dessa espécie.

## Materiais e Métodos

**Assepsia.** As sementes (diásporos) e gemas apicais da espécie *L. ericoides* foram coletadas em três diferentes regiões do estado de Minas Gerais, próximas às cidades de Ibiraci (20° 32' 08" S; 47° 08' 14" W; altitude 1061 m), Delfinópolis (20° 20' 33" S; 46° 47' 38" W; altitude 839 m) e Furnas (20° 38' 16" S; 46° 19' 40" W; altitude 873m), (voucher n°s HPMU 054, 018 e 023, respectivamente). O material vegetal lavado em água corrente por 12 h, foi imerso em solução de Benomyl 1% (w/v) por 24 h sob agitação, mergulhado em solução álcool/água 70% (v/v) por 1 min, e depois em solução de hipoclorito de cálcio

0.5% (w/v) por 30 min. Após assepsia as sementes e gemas apicais foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sem reguladores de crescimento. Os tratamentos foram repetidos três vezes com 10 replicatas. O mesmo procedimento de desinfecção descrito acima foi repetido para diásporos coletados no estado de Minas Gerais na região de Sacramento (19° 54' 27" S; 47° 22' 35" W; altitude 920 m), São João Batista da Glória (20° 31' 58" S; 46° 24' 11" W; altitude 1277m), e Araxá (19° 42' 28" S; 46° 51' 06" W; altitude 1363 m) (voucher n°s HPMU 88, 022 e 97, respectivamente). Após a desinfecção, os diásporos foram abertos com bisturi, dentro da câmara de fluxo laminar e os embriões removidos foram inoculados em meio de cultura MS/2 sem reguladores de crescimento, suplementado com 0.5% de PVP (polivinil-2-pirrolidona). Após 20 dias, foram verificadas as porcentagens de contaminação e germinação dos embriões. Os tratamentos foram repetidos três vezes com 100 replicatas.

**Multiplicação.** As plântulas propagadas a partir das sementes coletadas na região de Ibiraci e as germinadas *in vitro* colecionadas foram cultivadas durante três meses em meio MS suplementado com 10,14  $\mu$ M de ácido naftalenoacético (ANA) e 17,76  $\mu$ M 6-benzilaminopurina (BAP). Gemas axilares excisadas de plântulas *in vitro* foram inoculadas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP ou com a combinação de BAP e ácido 3-indolacético (AIA) (Tabela 2). Após a seleção do meio de cultura mais apropriado para multiplicação, plântulas propagadas a partir das sementes coletadas na região de Delfinópolis e Furnas foram cultivadas em meio MS suplementado com 1,11  $\mu$ M de BAP e avaliadas para número e altura de brotos. Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro (8.5 cm altura x 5.5 cm i.d.) contendo 30 mL de meio MS suplementado com 3% (w/v) sacarose, solidificado com 0.2% (w/v) Phytigel®, com o pH ajustado a 6.0, autoclavado 20 min a 105 kPa. Os frascos de cultura foram fechados com tampas de polipropileno (Bellco), selados com filme plástico (Parafilm RoloPac), e mantidos à 25  $\pm$  2 °C e 55-60% umidade relativa, sob fotoperíodo de 16-h dia (40  $\mu$ Mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecido por 2 lâmpadas fluorescentes branca-frias GE, 85 W). Todos os experimentos desenvolvidos sob condição *in vitro* foram realizados com 3 repetições e 10 replicatas por tratamento.

**Enraizamento.** Para promover a formação de raízes,





as plântulas, micropropagadas a partir de sementes coletadas nas três diferentes regiões, com dois pares de folhas, foram inoculadas em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) ou ANA (Tabela 3).

**Conservação de Germoplasma.** Para o estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro*, as plântulas de arnica foram transferidas para o meio MS/2 suplementado com 2% de sacarose mais adição de 3% de manitol, 4% de sorbitol e 8,3  $\mu\text{M}$  de pantotenato de cálcio (Tabela 4). As culturas foram incubadas por 10 meses a 18°C, sob fotoperíodo de 12h, fornecido por lâmpadas fluorescentes branca-fria GE com baixa luminosidade (23  $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). As plântulas foram então avaliadas quanto ao número de brotos por gemas, crescimento e sobrevivência das plântulas.

**Acimação.** Plântulas enraizadas em meio MS suplementados com auxinas e plântulas sem sistemas radiculares, cultivadas em meio MS suplementado com BAP, medindo aproximadamente 4 cm, foram transplantadas diretamente em vasos esterilizados (5 L), contendo uma mistura de solo/areia (1:1). Durante a primeira semana, as plântulas foram mantidas em estufa, irrigadas três vezes ao dia, e borrifadas diariamente com uma solução 0,005% de ampicilina (w/v). Após o período de 3 meses as plantas foram avaliadas quanto à proliferação de brotos e raízes.

**Análise por CLAE.** As folhas (20 mg p.s.) de plântulas micropropagadas e de plântulas advindas de sementes foram extraídas com 500 mL de metanol. Foi preparado um extrato metanólico, o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante (20 mL) foi analisado por CLAE, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu (LC6A) com detector UV SPD-6AV, coluna Shim-Pack ODC-18 (4.5 x 250  $\mu\text{M}$ ); sistema eluente 30:70 a 60:40 MeOH:H<sub>2</sub>O (15 min) gradiente linear, visualização a 265 nm, modo isocrático, mantido por 20 min. O goyazensolide, centratherine, 15-dioxy-goyazensolide e padrões de eremantolide utilizados nesse experimento foram isolados de *L. ericoides in natura*, de acordo com a metodologia descrita por Sakamoto et al. (2003) e dos Santos et al. (2004).

## Resultados e Discussão

O desenvolvimento de protocolos de micropropagação de plantas é particularmente útil em programas

de conservação, quando a metodologia para produção em larga escala ainda não foi estabelecida, ou quando as sementes da espécie em estudo são recalcitrantes, possuem baixa viabilidade ou perdem sua viabilidade em pouco tempo (SCHUMACHER, 1991). O experimento realizado com sementes de *L. ericoides* (Tabela 1) mostrou que a presença de embriões nas sementes é baixa (menor que 30%) e a porcentagem de embriões capazes de se desenvolver também é reduzida (menor que 50%). Independente da população analisada, o número de indivíduos obtidos por sementes foi menor que 10%. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Paron et al. (1999), que relatou que apenas 7% das sementes de *L. ericoides* são viáveis.

As gemas apicais de plantas coletadas em Ibiraci, cultivadas em meio de MS sem regulador de crescimento, contaminaram 97% ( $\pm 3$ ), as de Delfinópolis 95% ( $\pm 4$ ), e as de Furnas 91% ( $\pm 5$ ). Já os diásporos coletados em Ibiraci contaminaram 83% ( $\pm 8$ ), os de Delfinópolis 79% ( $\pm 9$ ), e os de Furnas 85% ( $\pm 10$ ). Os embriões isolados mostraram menores porcentagens de contaminação em relação aos explantes advindos de gemas apicais ou diásporos, portanto é recomendado que os primeiros sejam utilizados como explantes para introdução de acessos desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*. O alto teor de contaminação observado para esta espécie é próprio do ambiente onde ela é encontrada, que é caracterizado por uma grande diversidade de fungos, bactérias, micorriza e líquens. Segundo Leifert e Waites (1994), explantes de plantas crescidas no campo podem, em alguns casos, tornarem-se difíceis ou impossíveis de desinfetar, devido à presença de microrganismos endofíticos e epifíticos.

Os resultados obtidos nos experimentos com diferentes concentrações (1.11 - 8.88  $\mu\text{M}$ ) de BAP mostraram que não existiu diferença significativa quanto ao número de brotos, porém concentração mais baixa de BAP propiciou alongação de broto (1,02 cm) e foi portanto considerado o meio mais apropriado para o desenvolvimento *in vitro* (Tabela 2). As plantas coletadas em Ibiraci, Delfinópolis ou Furnas enraizaram *in vitro*, porém os acessos coletados em Furnas apresentaram um índice mais baixo de enraizamento e um número menor de raízes. O meio MS suplementado com 4,92  $\mu\text{M}$  AIB foi o meio mais adequado para induzir o enraizamento (Tabela 3). Tanto as plântulas com ou sem raízes, quando





transferidas para a casa de vegetação, mostraram crescimento semelhante, e depois de 3 meses as plântulas sem raiz desenvolveram o sistema radicular. A porcentagem de sobrevivência foi de aproximadamente 83,3% ( $\pm 3$ ) para as plântulas de Ibiraci, 72,4% ( $\pm 5$ ) para as de Furnas e 70,8% ( $\pm 9$ ) para as de Delfinópolis.

As análises por CLAE dos extratos das plântulas micropropagadas e de plântulas advindas de sementes mostraram perfis químicos semelhantes (Figuras 1 e 2). Além disso, extratos de plântulas *in vitro* mostraram a presença de goiazensolideo, um furanoheliangolideo inibidor do fator da transcrição NF-kB, considerado um potente agente antiinflamatório (RUNGELER et al., 1999).

Tabela 1 - Porcentagem, desenvolvimento e contaminação de embriões originados de plantas coletadas em diferentes localidades.

Porcentagem de embriões	Local de coleta		
	Sacramento	S.J.B. do Gloria	Araxá
% de sementes contendo embriões	28,7 $\pm$ 3	27,1 $\pm$ 9	19,6 $\pm$ 3
% de embriões que desenvolveram	29,6 $\pm$ 4	36,3 $\pm$ 3	47,7 $\pm$ 8
% de embriões contaminados	10,6 $\pm$ 3	6,1 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 2

A conservação de *L. ericoides* em banco de germoplasma *in vitro* foi possível, conforme está demonstrado na Tabela 4. O crescimento foi limitado em meio MS/2 contendo 2% sacarose e 4% sorbitol. Collin e Edwards (1998) recomendaram a redução de sais pela metade como uma forma para reduzir o crescimento. Todavia este não foi um procedimento eficaz para a conservação *in vitro* de *L. ericoides*, uma vez que a redução de sais do meio MS promoveu o desenvolvimento de explantes. Contudo, a combinação de MS/2 e sorbitol protegeram 96.6% das plântulas das condições de estresse do banco de germoplasma. Todavia, são necessários estudos em longo prazo para assegurar que estresses abióticos ambientais como a alta concentração de sais e a excessiva pressão osmótica não induzirão anomalias morfológicas e fisiológicas. Concluindo, este protocolo é uma ferramenta útil para propagação em massa de arnica-da-serra, e pode servir como um modelo para conservação *ex situ* de espécies medicinais do cerrado, especialmente aquelas consideradas em extinção. Este é o primeiro relato sobre a propagação *in vitro* da espécie *Lichnophora ericoides*. O banco de germoplasma *in vitro* assegurará a preservação da diversidade de populações remanescentes dessa espécie.

Tabela 2 - Efeito de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) na proliferação *in vitro* de *L. ericoides*

Regulador de crescimento	Concentração ( $\mu$ M)	Nº de brotos/gemas			Altura do broto (cm)		
		Origem das plantas			Origem das plantas		
		Ibiraci	Delfinópolis	Furnas	Ibiraci	Delfinópolis	Furnas
BAP	1,11	8,7 a	5,23 B	1,56 C	1,02 a	1,40 B	2,33
BAP	2,22	7,9 a	-	-	0,56 b	-	-
BAP	4,44	8,5 a	-	-	0,50 b	-	-
BAP	8,88	9,8 a	-	-	0,53 b	-	-
BAP + AIA	17,76+11,42	3,2 c	-	-	0,50 b	-	-

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam médias entre as linhas e minúsculas comparam médias entre as colunas.

Tabela 3 - Efeito de ácido indol-3-butírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) no enraizamento *in vitro* de *L. ericoides*

Regulador de crescimento	Concent. ( $\mu$ M)	% de enraizamento			Nº de raízes/planta		
		Origem das plantas			Origem das plantas		
		Ibiraci	Delfinópolis	Furnas	Ibiraci	Delfinópolis	Furnas
IBA	0,49	55,6 abB	66,6 abA	9,6 bC	5,43 abA	5,33 aA	1,26 bB
IBA	4,92	43,6 abB	75,3 aA	36,6 aB	9,00 aA	6,10 aAB	4,20
ANA	0,53	73,0 aA	47,6 bB	39,3 aB	7,76 abA	5,00 aAB	2,33 bB
ANA	5,37	34,6 bA	16,0 cA	0	4,43 bA	1,66 bB	0

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. Letras maiúsculas comparam médias entre as linhas e minúsculas comparam médias entre as colunas.

Tabela 4 - Efeito de diferentes agentes osmóticos no desenvolvimento e sobrevivência de plântulas de *L. ericoides* em banco de ger-

Meio de cultura	Nº de Brotos/gema	Altura de brotos (cm)	% de sobrevivência
MS + sorbitol	2.3 a	0.53 a	43.3 b
MS/2 + sorbitol	3.1 a	0.76 a	
MS + sorbitol + pantotenato de cálcio	2.3 a	0.46 a	46.6 a
MS/2 + sorbitol + pantotenato de cálcio	1.7 a	0.41 a	43.3 a
MS + manitol + pantotenato de cálcio	2.5 a	0.26 a	40.4 a
MS/2 + manitol + pantotenato de cálcio	2.1 a	0.39 a	36.6 a

MS = meio Murashige and Skoog; MS/2 = meio Murashige and Skoog com metade da concentração dos sais (MURASHIGE; SKOOG 1962). Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 1 - Cromatograma de extrato de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* (acesso de Ibiraci): 18,017 - goiazensolideo; 21,85 - centraterina; 25,55 - 15-dioxi-goiazensolideo; 32,217 - eremantolideo C

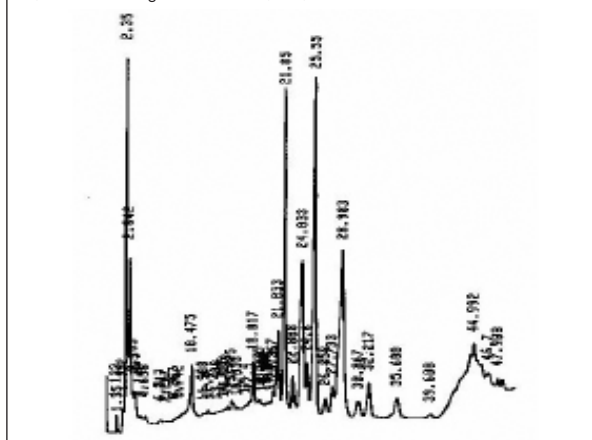
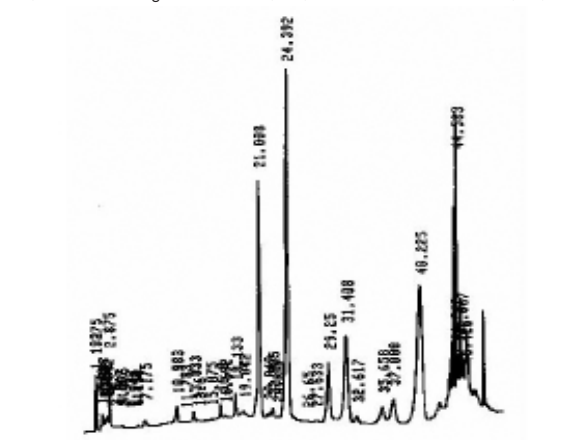


Figura 2 - Cromatograma do extrato de folhas de plântulas de *L. ericoides* cultivadas *ex vitro* (acesso de Ibiraci): 21,008 - centraterina; 24,392 - 15-dioxi-goiazensolideo; 29,25 - 15-dioxi-centraterina; 31,401



## Referências

- BASTOS, M.; CERQUEIRA, S.; SOUZA, J.T.; JÚNIOR, R.A.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart (arnica). *Ciência e Cultura*, v.39, n.5/6, p.551-553, 1987.
- BORELLA, C.B.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W.R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.26, p.671-676, 1998.
- COLLIN, H.A.; EDWARDS, S. Plant Cell Culture Oxford: BIOS Scientific Publishers, p.83-90, 1998.
- DOS SANTOS, P.A.; AMARANTE, M.F.; PEREIRA, A.M.; BERTONI, B.; FRANCA, S.C.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PEREIRA, M.R.; LOPES, N.P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.52, n.12, p.1433-1435, 2004.
- GRAEL, C.F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.; LOPES, J.L.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir, Leitão Filho. *Phytotherapy Research*, v.14, n.3, p.203-206, 2000.
- BRASIL. Lei n.º 7.804/89 e n.º 7.951/89, Portaria n.º 37, IBAMA, Ministério do Meio Ambiente, de 3 de abril de 1992.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M. Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control point. In: LUMSDEN, P.J.; NICHOLAR, J.R.; DAVIES, W.J. (eds) Physiology, Growth and Development of plants in culture. *Kluwer Academic Pub. Netherlands*, p.363-378, 1994.
- MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; DELLE-MONACHE, F.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CHECHINEL, F.V. Antimicrobial Activity of Constituents Isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, v.10, p.694, 1996.
- MITTERMEIER, R.A.; MYERS, M.; GIL, P.R.; MITTERMEIER, C.G. Hotspots Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregion. *Cemex, Conservation International Pub.*, p.134-159, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DÂMARIS, S.D.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* Species. *Phytotherapy Research*, v.10, p.292-294, 1996.
- PARON, M.E.; LOPES, N.P.; MACHADO, J.O. Germinação de aquênios de *Lychnophora ericoides* Mart (Asteraceae) In: IV Jornada Paulista de Plantas Medicinais 12-15 de outubro, Ribeirão Preto, Livro de Resumo PN 6 08, 1999.
- PETIT, G.R.; HERALD, D.L.; CRAGG, G.M.; RIDEOUT, J.A.; BROWN, P. Antineoplastic agents, 178. Isolation and structure of lychnostatin 1 and 2 from the South. *American Lychnophora antillana. Journal of natural products*, v.53, n.2, p.382-390, 1990.
- RUNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GOREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.7, n.11, p.2343-2352, 1999.
- SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. *Journal of natural products*, v.66, n.5, p.693-695, 2003.
- SBB - SOCIEDADE BRASILEIRA DE BOTÂNICA. *Centuria Plantarum Brasiliensium Exstintionis Miniata*, Brasília, p.176, 1992.
- SCHUMACHER, H.M. Biotechnology in the production and conservation of medicinal plant In: AKERELE, O.; HEYWOOD, H.; SYNGE, H. (eds). The consevation of medicinal plant. *Cambridge University Press*, p.179-198, 1991.