

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA



**“MORFOANATOMIA, GERMINAÇÃO E PERFIL QUÍMICO
DE ESPÉCIES DE *Smilax* L. (SMILACACEAE)”**

ALINE REDONDO MARTINS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Aline Redondo Martins
Beatriz Appezzato da Glória
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia,
UNICAMP, para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal.**

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória
Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Campinas - SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M366m	Martins, Aline Redondo Morfoanatomia, germinação e perfil químico de espécies de Smilax L. (Smilacaceae) / Aline Redondo Martins. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientadores: Beatriz Appezzato-da-Glória, Wagner Vilegas. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Salsaparrilha. 2. Plantas medicinais. 3. <i>Smilax</i>. 4. Morfologia vegetal. 5. Anatomia vegetal. I. Appezzato-da-Glória, Beatriz. II. Vilegas, Wagner. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)
--------------	---

Título em inglês: Morphology and anatomy, seed germination and chemical profile of Smilax L. (Smilacaceae).

Palavras-chave em inglês: Greenbrier; Medicinal plants; Smilax; Plant morphology; Plant anatomy.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Beatriz Appezzato da Glória, Sandra Maria Carmello Guerreiro, Vera Lúcia Garcia Rehder, Adriana Hissae Hayashi, Nanuza Luiza de Menezes.

Data da defesa: 14/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

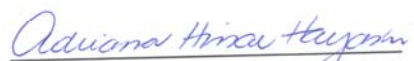
Campinas, 14 de dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a) Beatriz Appezzato da Glória (Orientador(a))


Assinatura

Profa. Dra. Adriana Hissae Hayashi


Assinatura

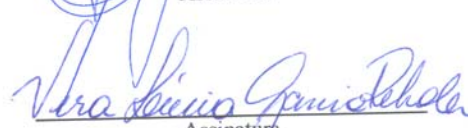
Prof(a). Dr(a) . Nanuza Luiza de Menezes


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Sandra Maria Carmello Guerreiro


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Vera Lúcia Garcia Rehder


Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Graziela Cury

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Luis Vitor Silva do Sacramento

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Regina Helena Potsch Andreatta

Assinatura

“Se soubesse que o mundo acabaria amanhã, eu ainda hoje plantaria uma árvore.” (Martín Luther King)

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente; mas sim, o que melhor se adapta às mudanças.” (Charles Darwin)

DEDICO

Aos meus amados pais, Eugenia e Gilberto, razão do meu viver.

OFEREÇO

A todas as inúmeras mãos (de meus familiares, de meus amigos, de meus anjos da guarda, de meus auxiliares de campo, dos profissionais espalhados por todos os lugares que visitei e que me deram condições através de seus inestimáveis conhecimentos de realizar cada pequena parte dessa tese) que se uniram a mim nessa jornada de minha vida e tornaram esse trabalho real.

AGRADECIMENTO

Em especial, agradeço à Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória, por me proporcionar o privilégio de ser sua doutoranda, por sua amizade e paciência durante nossos cinco anos de uma harmoniosa, agradável e produtiva convivência. Agradeço pelo vasto conhecimento a mim transmitido e por me incentivar sempre nas minhas jornadas em busca do conhecimento em diversificadas áreas e por consequência ser sempre meu porto seguro nos momentos em que precisávamos juntar todo esse conhecimento em relatórios e artigos. A Profa. Beatriz sempre será o modelo que eu busco alcançar para minha carreira profissional.

Ao Programa de Biologia Vegetal da pós-graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, por ter possibilitado a realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão do auxílio financeiro para a execução desse estudo (Projeto FAPESP nº: 05/58964-9) e pela concessão de minha bolsa de estudo (Projeto FAPESP nº: 05/54984-5) que também possibilitou a realização de meu Doutorado Sanduíche na Hochschule Vechta (Universidade de Vechta) na Alemanha.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão inicial de minha bolsa de estudo (dois meses iniciais de meu curso de doutorado).

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por assumir a co-orientação deste trabalho e por seus preciosos conhecimentos transmitidos na área de química de produtos naturais.

Ao Dr. Norbert Pütz da Hochschule Vechta (Universidade de Vechta) na Alemanha pela oportunidade de realizar meu estágio de Doutorado Sanduíche sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP) pelo apoio na execução da parte de estudos com controle de qualidade de drogas vegetais.

À Profa. Dra. Ana Dionísia da Luz Coelho Novembre, e a técnica do Laboratório de Sementes da ESALQ/USP, Helena Pescarin Chamma, pelo auxílio na realização dos experimentos de germinação de sementes.

À Profa. Dra. Sandra M. Carmello Guerreiro por contribuir com minha formação e por participar como co-autora de um dos capítulos do presente trabalho.

À Profa. Dra. Regina Helena Potsch Andreatta pela identificação dos espécimes vegetais.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, do NAP/MEPA – ESALQ – USP – Piracicaba-SP, pelo uso dos equipamentos para Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima e a sua equipe do Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP pelos ensaios farmacológicos dos extratos vegetais.

Ao Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge e a sua equipe, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da USP de São Paulo-SP, pelas análises químicas do endosperma das sementes.

À farmacêutica Sra. Marli K. M. Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), pela amizade e pelo apoio técnico durante as atividades práticas.

À doutoranda Juliana Aparecida Severi pelo auxílio e acompanhamento de todas as análises químicas desse trabalho.

Aos Departamentos de Ciências Biológicas e Produção Vegetal da “Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz” ESALQ/USP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por todo suporte técnico necessário para realização dos experimentos de minha tese.

Ao Instituto Florestal e ao IBAMA pela permissão de coleta do material vegetal e a coordenação dos parques estaduais e nacionais pelo apoio ao nosso trabalho.

A toda equipe do Projeto *Smilax* (Aline Bombo, Anielca Soares e João Marcelo Silva) e demais alunos do Laboratório de Anatomia Vegetal da ESALQ/USP por sua contribuição ao meu trabalho, pelo companheirismo e amizade.

A todos os técnicos, auxiliares e voluntários que participaram diretamente nas atividades de campo desse trabalho, deixo meu profundo agradecimento.

Sumário

Introdução	08
Revisão Bibliográfica	10
1. A família Smilacaceae	10
2. O gênero <i>Smilax</i>	10
3. Utilização	13
Capítulo 1 - New insights about the germination and development of rhizophores in the Brazilian species <i>Smilax polyantha</i> (Smilacaceae)	15
Resumo	16
Introdução	17
Material e métodos	17
Resultados	19
Discussão	28
Referências bibliográficas	31
Capítulo 2 - New approaches to underground systems in Brazilian <i>Smilax</i> species (Smilacaceae)	34
Resumo	35
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultados	38
Discussão	48
Referências bibliográficas	53
Capítulo 3 - Morfoanatomia da folha e do caule não espessado de espécies de <i>Smilax</i> L. (Smilacaceae)	58
Resumo	59
Introdução	60
Material e métodos	61
Resultados	63
Discussão	75
Referências bibliográficas	78
Capítulo 4 - Germinação de sementes e morfologia das plântulas de espécies de <i>Smilax</i> L. (Smilacaceae)	82
Resumo	83
Introdução	84
Material e métodos	85
Resultados	87
Discussão	95
Referências bibliográficas	98
Capítulo 5 - Ontogenia e estrutura da semente de <i>Smilax polyantha</i> (Smilacaceae) e análise comparativa da composição química do endosperma com <i>S. rufescens</i>	102
Resumo	103
Introdução	104
Material e métodos	105
Resultados	106

Discussão	114
Referências bibliográficas	115
Capítulo 6 - Análise granulométrica e microscópica comparada de drogas pulverizadas e originadas de espécies de salsaparrilha (<i>Smilax</i> L.)	118
Resumo	119
Introdução	120
Material e métodos	121
Resultados	124
Discussão	131
Referências bibliográficas	132
Capítulo 7 - Estabelecimento dos perfis cromatográficos de espécies de <i>Smilax</i> por HPLC-UV-PDA	134
Resumo	135
Introdução	136
Material e métodos	138
Resultados	143
Discussão	149
Referências bibliográficas	151
CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156

INTRODUÇÃO

O gênero *Smilax* consta da Farmacopéia Brasileira de 1929 com as espécies *Smilax papyraceae*, *S. syphilitica*, *S. officinalis* e *S. medica*, denominadas como salsaparrilha, sendo descritas de acordo com o modo como as raízes são amarradas em feixes da seguinte maneira: “feixes cilíndricos formados de raízes cortadas em pedaços do mesmo comprimento, que atingem até 1,5m, colocadas paralelamente e amarradas por cipó; feixes cilíndricos, mais ou menos compactos, de comprimentos e diâmetros variáveis, formados de raízes cortadas e envolvidas por outras da mesma planta; ou ainda, feixes desatados ou comprimidos em pacotes, sendo que cada feixe contém de 20 a 30 raízes dobradas e fixadas a uma cepa com um ou mais rizomas grossos”. Além da observação da maneira como os feixes de raízes são amarrados, a distinção entre as espécies também se baseou em características como comprimento e coloração externa das mesmas, bem como pela proporção entre os tecidos do córtex e cilindro vascular em secção transversal.

Em 1997, Andreatta fez a revisão do gênero *Smilax* no Brasil. A autora descreveu 31 espécies como válidas, sendo 14 exclusivamente brasileiras. Das 31 espécies, 11 são denominadas salsaparrilhas, sendo que sete destas possuem propriedades medicinais.

Devido às características morfológicas e composição química semelhante entre as espécies do gênero *Smilax* e entre essas e o gênero *Herreria*, a identificação taxonômica fica dificultada (Lorenzi 2002).

Cunha (1937a,b, 1940) e Stellfeld (1940) comentam a falsificação da salsaparrilha, ou seja, a utilização de *Herreria salsaparrilha* com propósitos medicinais, atribuindo a essa espécie a mesma denominação e propriedades medicinais de *Smilax aspera*.

Segundo a resolução da ANVISA (RDC 48/04, Brasil 2004)) a correta identificação e a caracterização morfoanatômica das plantas são fundamentais para o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de fitoterápicos, garantindo desta forma, a confiabilidade dos mesmos. De acordo com Ferreira *et al.* (1998), a indústria farmacêutica nacional de fitoterápicos necessita investir na pesquisa, especialmente no controle de qualidade para atingir os padrões mundiais.

A despeito da importância dos estudos morfoanatômicos das espécies de *Smilax*, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura. Dentre eles, destaca-se o de Vandercolme (1947) que analisou as raízes de quatro espécies brasileiras (*S. longifolia*, *S. syringoides*, *S. syphilitica* e *S. pseudosyphilitica*). Segundo Cunha (1937b) e Stellfeld (1938), a estrutura interna da raiz é que realmente proporciona o maior número de elementos para diagnose segura da espécie não só pela característica dos tecidos como também pela proporção entre córtex, tecidos vasculares e medula. Caponetti & Quimby (1956) estudaram a anatomia foliar, caulinar e radicular de cinco espécies: *S. auriculata*, *S. hispida*, *S. glauca*, *S. bona-nox*, *S. herbacea*. Ervin & Evert (1967) estudaram o floema em *S. rotundifolia*. Martin & Tucker (1985) analisaram ápices caulinares em *S. bona-nox*, *S. rotundifolia*, *S. laurifolia* e *S. pumila*. Oliveira *et al.* (1973), Andreata & Menezes (1999) e Martins & Appezzato-da-Glória (2006) estudaram o sistema subterrâneo de *S. japecanga*, *S. quinquenervia* e *S. polyantha* respectivamente.

Visto que os problemas de falsificação da salsaparrilha ainda ocorrem nos dias de hoje (Lorenzi 2002), que faltam estudos de caráter anatômico e ontogenético para solucionar os problemas relacionados à morfologia do gênero *Smilax* (Andreata 1997) e que a caracterização morfoanatômica das plantas é fundamental para o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de fitoterápicos (Ming 1994), o presente trabalho teve como objetivos:

- a) Descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos de seis espécies de *Smilax* L.. (*Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. campestris* Grisebach, *S. cissoides* Martius ex Grisebach, *S. goyazana* A. De Candolle, *S. oblongifolia* Pohl ex Grisebach e *S. rufescens* Grisebach).
- b) Realizar ensaios de germinação de sementes (*Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*) e acompanhar a ontogênese do sistema subterrâneo de *Smilax polyantha* Grisebach.
- c) Estudar a anatomia da semente de *S. polyantha* para tentar solucionar problemas relacionados à germinação de sementes.
- d) Analisar a droga vegetal pulverizada (*Smilax brasiliensis*, *S. cissoides* e *S. polyantha*) para estabelecer padrões para o controle de qualidade das espécies comercializadas.

- e) Analisar o perfil químico de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A família Smilacaceae

A família Smilacaceae é agrupada na Ordem Liliales no grupo das monocotiledôneas, e possui apenas o gênero *Smilax* com 310 espécies que se distribuem nas regiões temperadas e tropicais (Judd et al. 2009).

A família é composta por lianas ou trepadeiras herbáceas, raramente subarbustos ou arbustos, dióicas. Podem apresentar rizóforos e seus caules e ramos aéreos são, em geral, aculeados. Possuem folhas simples, alternas, com bainhas bilabiadas; pecíolos providos ou não de um par de gavinhas; lâminas coriáceas a membranáceas, venação primária acródroma, nervuras principais 3-5-7. As inflorescências são cimas umbeliformes (Andreata 2000).

2. O gênero *Smilax*

Todas as espécies apresentam folhas simples, alternas, glabras, providas de lâmina, pecíolo e bainha bem diferenciados. O pecíolo além de apresentar um par de gavinhas, também pode apresentar torções que determinam a posição da lâmina foliar (Andreata 1995).

A origem das gavinhas no gênero *Smilax* foi atribuída, por diferentes autores, às estípulas, à lígula, à folha composta e aos tricomas (Arber 1920). No entanto, segundo a autora, as gavinhas nada mais são do que um desdobramento do pecíolo como descrito anatomicamente para *Smilax polyantha* por Martins e Appezzato-da-Glória (2006).

Barradas & Figueiredo (1974) estudaram, quanto à nervação foliar, seis espécies do gênero *Smilax* (*S. irrorata*, *S. cissoides*, *S. spinosa*, *S. undulata*, *S. fluminensis* e *S. oblongifolia*) da flora dos cerrados. Todas as espécies têm o mesmo padrão de nervação (tipo acródromo), porém as mesmas podem ser distinguidas em relação a particularidades

apresentadas pela rede de nervuras, que permitiram às autoras organizar uma chave de identificação dessas espécies.

Com respeito aos estudos de caráter biométrico ou de morfometria foliar, podemos citar os realizados por Mandarin-de-Lacerda et al. (1992), que apresentam variação tanto no porte quanto na biometria foliar de *Smilax rufescens*; o de Marquete & Pontes (1994), cujo estudo anatômico comparativo entre *Smilax spicata*, *S. rufescens* e *S. fluminensis* apresenta como única diferença entre as três espécies a ocorrência dos estômatos e o de Mandarin-de-Lacerda & Andreatta (1994/1995) que estudaram comparativamente as folhas adultas de *S. campestris* e *S. cognata*.

Ainda podem ser encontrados na literatura trabalhos sobre citogenética, tal como de Speese (1939), que determinou que o número de cromossomos presentes em folhas de *Smilax rotundifolia* e *S. bona-nox* é 32. Esse tipo de informação, segundo o autor, é importante na determinação e controle da ocorrência ou não de hibridização no gênero.

Segundo Caponetti & Quimby (1956), existem diferenças entre as células tanto da epiderme quanto da hipoderme dos caules aéreos entre as cinco espécies estudadas (*Smilax auriculata* Walt., *S. hispida* Muhl., *S. glauca* Walt., *S. bona-nox* L. e *S. herbacea* L.). Além disso, os autores encontraram endoderme presente nos entrenós basais do caule aéreo, porém essa endoderme não era mais morfológicamente diferenciada nos entrenós apicais.

Segundo Cunha (1937a), a parte utilizada como droga das salsaparrilhas verdadeiras, ou seja, as pertencentes ao gênero *Smilax*, são as raízes, que depois de colhidas e secas, são amarradas em feixes de modo característico de cada região de origem. Por um longo tempo, distinguiram-se as variedades comerciais ora pela embalagem, ora pelo aspecto exterior, ora pela quantidade de amido ou pela espessura relativa das camadas observadas no corte transversal.

Entretanto, considerando a facilidade com que poderiam variar tais características e a pouca segurança de tais meios de investigação, Cunha (1937b) propôs a utilização das características da endoderme para estabelecer diferenças entre as raízes das diferentes espécies de salsaparrilha. Sendo assim, o autor descreve a endoderme da salsaparrilha-do-México (*Smilax medica*) como sendo uma camada de células retangulares cujo lume das células é triangular com o vértice voltado para a parte interna. Em *Smilax salsaparrilha*

(salsaparrilha-de-Honduras) a endoderme apresenta células quase quadradas, com o lume celular de formato oval ou arredondado. Já as células endodérmicas de *Smilax syphilitica* (salsaparrilha-do-Pará) possuem dimensões irregulares e são alongadas no sentido radial, sendo seu lume quadrangular.

Caponetti & Quimby (1956) também observaram diferenças no tipo de espessamento da endoderme nas cinco espécies do gênero *Smilax* (*Smilax auriculata* Walt., *S. hispida* Muhl., *S. glauca* Walt., *S. bona-nox* L. e *S. herbacea* L.) analisadas.

Stellfeld (1938) comenta o fato de que ocorre a reabsorção do córtex externo em *Smilax aspera*, e ao mesmo tempo ocorre a formação de uma bainha de revestimento, através do espessamento das células das últimas camadas do córtex. Tal fato também foi descrito para *Smilax polyantha* por Martins e Appezzato-da-Glória (2006).

Holm (1890) descreveu a ontogênese do sistema subterrâneo em *Smilax rotundifolia* e *Smilax glauca*, espécies comuns na América do Norte. Segundo o autor, a região tuberizada do sistema subterrâneo de *Smilax rotundifolia* é denominada rizoma, e tem origem a partir da gema axilar do cotilédone. Esta gema se desenvolve formando uma porção tuberizada e seu ápice gradualmente se curva até atingir a posição horizontal. Esta gema axilar do cotilédone pode não desenvolver a porção tuberizada, e sim outro ramo ascendente. Com respeito às raízes, o autor comenta que a raiz primária permanece na planta durante todo o primeiro ano de vida, e que as primeiras raízes adventícias surgem a partir do hipocótilo, sendo mais espessas e brancas do que a raiz primária. O autor ainda diz que é possível saber a idade de cada planta pela quantidade de ramos caulinares, sendo que cada ramo corresponde a um ano de vida.

Davis (1891) também estudou *Smilax glauca*, mas sob o aspecto de como o ambiente pode influenciar o crescimento do rizoma. Ele observou que em plantas desta espécie que crescem em ambientes secos, o número de tuberizações é maior do que em plantas da mesma espécie que crescem em ambientes úmidos, e relacionou este fato ao princípio de que as plantas de ambiente seco precisam armazenar mais água e nutriente em relação às plantas de ambiente úmido. Além disso, as plantas de ambiente úmido possuem entrenós mais espaçados.

O sistema subterrâneo de *Smilax japecanga* Grisebach apresenta forma irregular e possui nós e entrenós por vezes bem delimitados. Situa-se paralelamente ao solo, ficando parcialmente enterrado e ramificando-se com frequência. Quando observado em cortes transversais, apresenta epiderme constituída por células com paredes espessadas e alongadas tangencialmente, parênquima cortical formado por 15 a 20 camadas de células isodiamétricas, geralmente com paredes espessadas. Neste parênquima se observa idioblastos de cristais de oxalato de cálcio (Oliveira et al. 1973).

Utilizando-se de uma nomenclatura atual, Andreata & Menezes (1999) relatam que a planta adulta de *Smilax quinquenervia* é constituída por um caule aéreo e um subterrâneo posicionado horizontalmente em relação ao solo, o qual foi denominado rizóforo pelas autoras.

Estudos mais recentes com respeito à morfoanatomia dos órgãos vegetativos das espécies do gênero *Smilax* são os de Gattuso (1995) com *Smilax campestris*, o de Palhares & Silveira (2005) e Palhares et al. (2009) sobre *S. goyazana*, o de Martins & Appezzato-da-Glória (2006) que descrevem *S. polyantha* e o de Guimarães (2009) que descreveu *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora*.

3. Utilização

Na Farmacopéia Brasileira de 1929 as espécies de salsaparrilha são descritas como espécies sudoríficas, e a parte utilizada é a raiz.

Stellfeld (1938) atribui à salsaparrilha a propriedade de aumentar o teor de colessterina no sangue, sendo que esta tem papel importante nos processos de imunização, como na ação anti-hemolítica, sugerindo que esta droga é promissora no tratamento via oral de úlceras de origem sifilítica, escrofulosa ou tuberculosa.

Vandercolme (1947) faz todo um histórico sobre a origem do gênero *Smilax*, sobre as características morfológicas de algumas espécies e também atribui a salsaparrilha atividades anti-sifilítica e anti-reumática. No levantamento realizado por Medeiros et al. (2007) tais enfermidades também são citadas como sendo tratadas com o uso de salsaparrilha, e as autoras ainda citam as propriedades antibiótica, diurética e depurativa.

Estudos atribuem a *S. quinquenervia* propriedades analgésicas (Monteiro & Andreato 1997), além de antioxidantes devido à presença de um componente fenólico denominado tocoferol (Demo et al. 1998). Para *Smilax goyazana* A. DC. são atribuídas propriedades depurativas, anti-reumáticas, diuréticas e para problemas hepáticos (Almeida et al. 1998).

A propriedade anti-reumática foi comprovada pelo estudo de Jiang & Xu (2003), que demonstrou a atividade do extrato aquoso do rizoma de *Smilax glabra* Roxb. atuando como agente terapêutico em doenças imuno-inflamatórias, como é o caso da artrite reumática em ratos.

Capítulo 1

*New insights about the germination and development of
rhizophores in the Brazilian species Smilax polyantha
(Smilacaceae)*

New insights about the germination and development of rhizophores in the Brazilian species *Smilax polyantha* (Smilacaceae)

Abstract: Brazilians have been using the underground organs of *Smilax* species in alternative medicine since the 19th century because of their anti-rheumatic qualities. However, even nowadays, these species are explored only by extractivism. Studies on seed germination and development of these organs could be useful to preserve these plants. After germination, seedling development of *Smilax polyantha* was analyzed to understand underground stem formation. Furthermore, to analyze the ontogenesis of the underground system, we sectioned seedlings aged from one to twelve months. One of the most striking features of this species is the presence of two stem branching systems. The plumule gives rise to the first stem branching system with negative geotropism. Its first underground axillary bud sprouted into the other caulinar axis with positive geotropism. The horizontal growth and the subsequent thickening of this underground organ depended on the development of axillary buds from basal nodes of the previous branches. The cotyledonary bud did not play a role in the underground formation, as previously described in the literature for this genus, but the buds of the basal cataphylls built the second stem branching system. In this study we discuss the terminology and suggest calling this second stem branching system as rhizophore.

Keywords: anatomy; development; greenbrier; rhizome; rhizophores; seedlings.

1-) INTRODUCTION

The *Smilax* genus consists of approximately 30 species widely distributed across the Brazilian territory. Plants are known as “salsaparrilha” and “japecanga” in the Brazilian popular medicine.

Studies on seed germination are important to solve taxonomic and phylogenetic problems, to contribute to the knowledge of plant morphology through the ontogenesis, to recognize species in the field. Moreover, these studies reinforce the necessity of conservation of species in forest and tropical savanna (Cerrado) areas of Brazilian central region (Andreato and Pereira, 1990; Oliveira, 2001).

Several authors investigated the germination and development of *Smilax* species (Holm, 1890; Andreato, 1980; Pogge and Bearce, 1989; Andreato and Pereira, 1990; Andreato and Menezes, 1999; Rosa and Ferreira, 1999; D’Antuono and Lovato, 2003; Santos et al., 2003). However, there is still a lack of information about the cultural and sustainable use of this genus. Nowadays, the Brazilian *Smilax* species are extracted from Cerrado areas, mainly to be used as medicinal plants.

Regarding the anatomical and morphological aspects, Holm (1890) extensively investigated and described the development of the underground systems of some North American species of *Smilax*. Nevertheless, he only considered the morphological character. Other study described the underground system using both morphological and anatomical features, defining thus this structure as rhizophore (Andreato and Menezes, 1999), however we have found the some other features in the species we analyzed.

The aim of present study is to follow ontogenesis of the underground system of *Smilax polyantha* Grisebach. and discuss its terminology through analyzing the germination of seeds and the seedlings development.

2-) MATERIALS AND METHODS

Plant Material—Seedlings were obtained by germination studies from seeds of *Smilax polyantha* Grisebach collected in Pratânia-SP (S 22°48’54,5’’W 48°44’33,2’’) and

Mogi Guaçu –SP (S 22°15'18,9'' W 47°9'15,7''), in Cerrado areas in southeastern Brazil, during April and May of 2006. Seedlings were cultivated in greenhouse during one year after germination.

Germination study— The experiment was conducted in a completely randomized design with six different treatments (15-35°C, 20-30°C, 20-35°C, 20°C, 25°C and 30°C) and eight replications. All treatments were exposed to a daily photoperiod of eight hours of light. For each replication, a germination box (11 x 11 x 3 cm) with cover was used, where 292g of sand was added, containing 45mL of water (60% of the restrained value) with 25 seeds.

The experiment was established in October 2006 and finished in November 2007. Seeds that showed an apparently normal embryo were submitted to the tetrazolium test (BRASIL, 1992) to verify their viability. In this test that immediately follows the longitudinal section, seeds were placed into a small plastic cup containing 1% tetrazolium. Seeds with red-colored embryo were considered to be viable.

Analyses of variance were performed (one factor: treatment), using Tukey's test in order to identify possible differences between number of germinated seeds among treatments ($p \leq 0.05$).

Morphology and anatomy— Seedlings and young plants at different stages were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965), dehydrated in ethanol series and stored in 70% ethanol. The morphology of the vegetative organs was registered through photographs and botanical illustrations.

For the anatomical analysis, samples from different developmental stages of *Smilax polyantha* were fixed as above described, dehydrated in ethylic series and embedded in historesin (Leica Historesin). Serial sections were cut at 8-10µm thickness on a rotary microtome (Sass, 1951) and stained with toluidine blue O (Sakai, 1973). Permanent slides were mounted in synthetic resin "Entellan". Images from slides were captured digitally through a Leica DMLB microscope with a video camera attached to a PC, using Leica, IM50 image analysis software.

Digital photographs documented the morphology.

3-) RESULTS

Germination study

Germination results are showed in Table 1. The total time of experiment was approximately one year. The total number of seeds used was 1200, but only 105 germinated.

The highest number of germinated seeds was found at 30°C, followed by 20-30°C (Table 1). Rates of germination for both treatments were 27% and 14.5%, respectively (Table 1). Although there is no significant difference between the temperatures 30°C and 20-30°C (Table 2), the percentage values suggest that temperature 30°C should be used for germination of seed of the studied species. The other four treatments showed a low number of germinated seeds, with rates of germination below 5% (1.0%, 4.0%, 2.5% and 3.5% for 20°C, 25°C, 15-35°C and 20-30°C, respectively).

Table 1. Seed viability results after tetrazolium tests following the end of the second stage of the seed germination experiment of *Smilax polyantha*. Photoperiod of eight hours of light, from December 2006 to July 2007.

	20°C		25°C		30°C		15-35°C		20-30°C		20-35°C	
	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV
Number of seeds	172	26	160	32	100	46	164	31	145	26	166	27
Seeds germinated	2		8		54		5		29		7	
G%	1.0		4.0		27.0		2.5		14.5		3.5	

(V) Number of seeds not germinated, but still viable; (NV) Number of seeds not germinated and not viable; percentage of seed germination (G %).

Table 2. Analysis of variance of the number of germinated seeds of *Smilax polyantha*. Data were transformed using [square root (x + 0.5)] to reduce variation. Values of F and the coefficient of variation (CV). Different letters mean significant differences between treatments (Tukey's test, $p \leq 0.05$).

Treatments	Germinated seeds
20°C	0.8365b
25°C	1.1358b
30°C	2.5833a
15-35°C	1.0105b
20-30°C	1.9760a
20-35°C	1.1197b
CV (%)	34.2324
F (treatments)	15.32***
*** $p \leq 0.001$	

By analyzing the viability of seed with tetrazolium test (Table 1), it was possible to verify that 86% of the seeds continued to be viable in the treatment 20°C (low percentage of germination) and 50% in the treatment 30°C (high percentage of germination).

Seeds which were considered to be viable had an embryo with reddish colour after the immersion in tetrazolium solution (Fig. 1). Not viable seeds were those with destroyed embryo (by fungi) or with no reddish colour after the test. Few seeds were found with no embryo (not viable seeds), as well as seeds with two embryos.

Several other factors were analyzed for *Smilax polyantha* seed germination under 30°C but none of them improved their rates of germination (Chapter 4 and 5). As *S. polyantha* seeds were viable and presented satisfactory absorption of water, it is possible that the low germination percentage of this species might be associated with the seed metabolism.

Morphology and anatomy of seedlings

The observation of the development of seedlings and underground system was performed in December 2006, when the first seedlings were obtained.

The germination of this species was cryptohypogeal (Figs. 2-4). This means that at the beginning of germination, the cotyledonary sheath, plumule, hypocotyl and radicle are pushed through the testa on the opposite side of the hilum (Figs. 3-4).

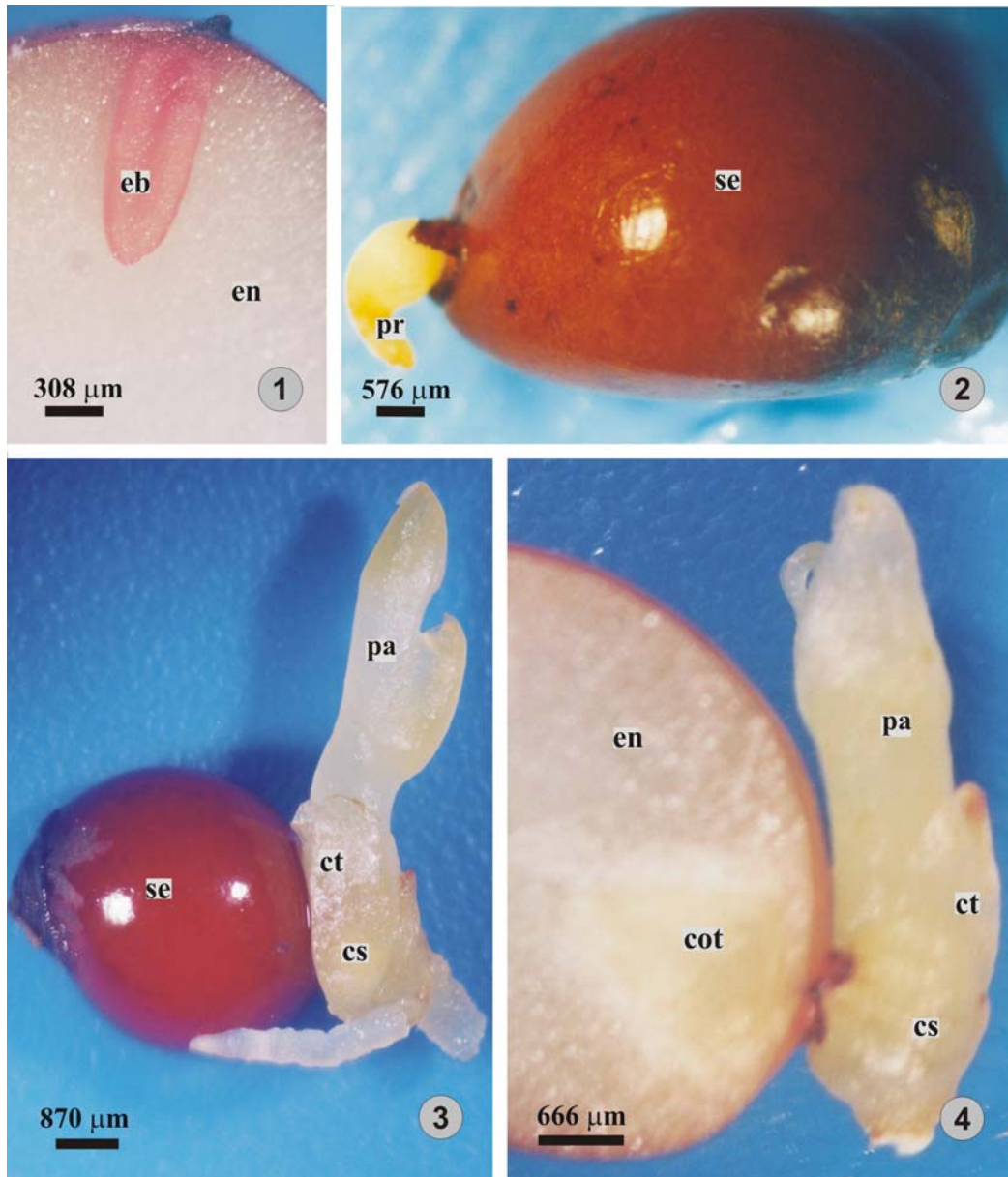
The cotyledon was compact according to Tillich (2007). It is a cotyledon consisting of a haustorial hyperphyll (Fig. 4 and 7) and a short cotyledonary sheath (Figs. 3-4) embracing the cotyledonary node and protecting the plumule axis (Figs. 5-8). The cotyledonary sheath exhibited idioblasts with raphides.

The first internode as shown in Figs. 11 and 12 is called epicotyl. The epicotyl was very short (200µm in length) and thus, the first plumular leaf and the first axillary bud were basally embraced by the cotyledonary sheath (Figs. 12-14).

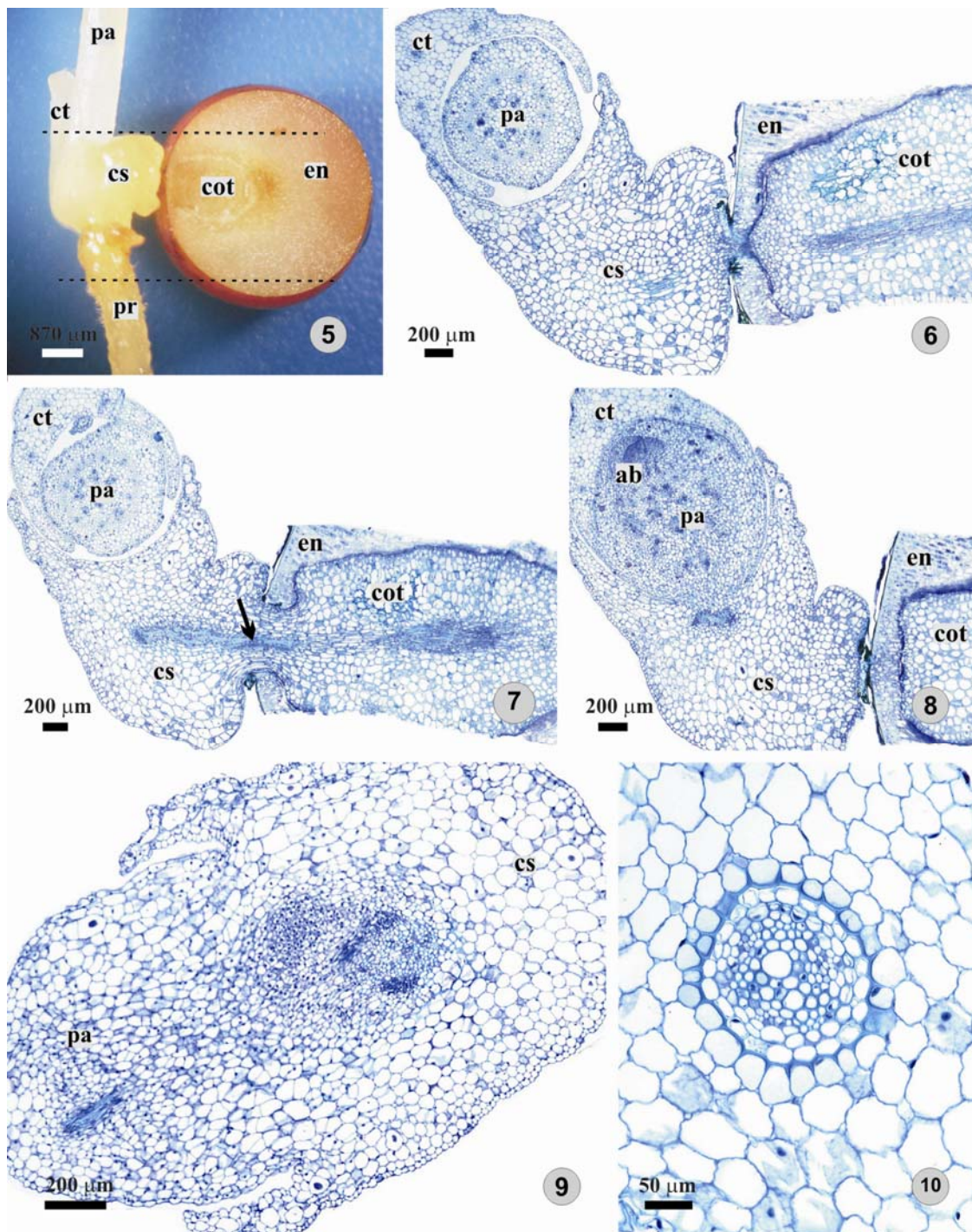
The plumule of these seedlings gave rise to at least three cataphylls before foliage leaves (eophylls) were produced. The cataphyll showed three collateral vascular bundles and stomata were observed in the epidermis of the cataphyll and cotyledonary sheath.

The anatomical analysis showed that the hypocotyl was also very short (480µm in length) (Fig. 12). It was composed by a uniseriated epidermis with stomata, the cortex was parenchymatous and a few cells of its innermost layer exhibited U-shaped thickenings. The vascular cylinder was a transition zone where it was not possible to analyze the maturation of the protoxylem strands and the arrangement of xylematic and phloematic elements (Fig. 9).

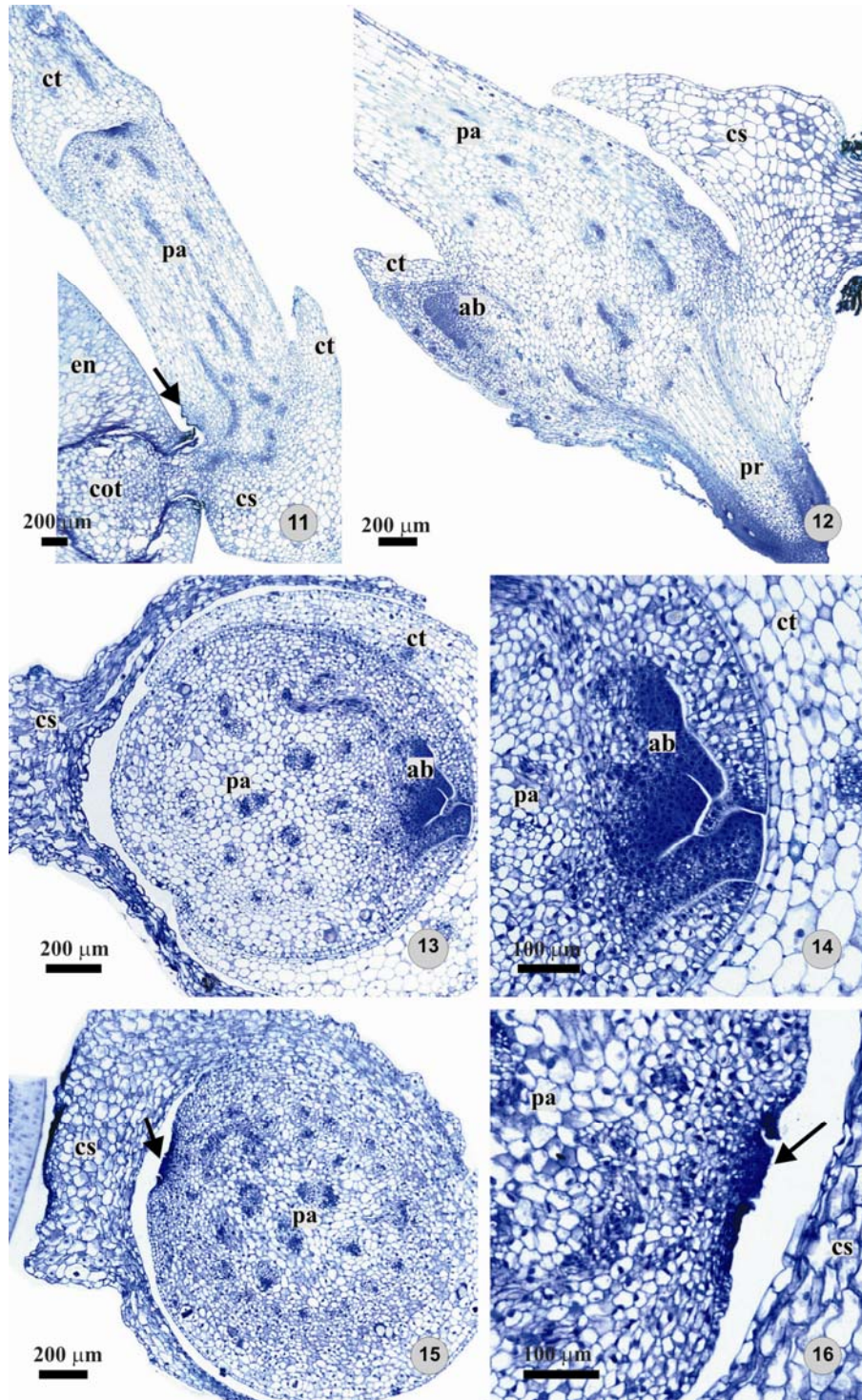
A transection of primary root showed uniseriate epidermis, cortex with isodiametrical cells, idioblasts with raphides, endodermis with thick-walled cells and a vascular cylinder - tetrarch and protostelic - surrounded by a uniseriated pericycle with thin-walled cells (Fig. 10).



Figs. 1-4. *Smilax polyantha*. 1. Longitudinally sectioned seed showing red-colored embryo after tetrazolium test. 2. Primary root after emergence. 3-4. Seedlings with few days after germination. cs = cotyledonary sheath; cot = cotyledon; ct = cataphyll, eb = embryo; en = endosperm; pa = plumular axis; pr = primary root; se = seed.



Figs. 5-10. 5. Seedling of *Smilax polyantha* with few days after germination. Dotted lines indicate the serial cross sectioned sector showed from 6 to 10. 6-8. Cotyledon consisting of a haustorial hyperphyll (cot) and a short cotyledonary sheath (cs) protecting the plumular axis (pa). 9. Vascular transition region below the insertion of the cotyledon and the cotyledonary sheath. 10. Primary root. ab = axillary bud; cs = cotyledonary sheath; cot = cotyledon; ct = cataphyll; en = endosperm; pa = plumular axis; pr = primary root; se = seed, arrow = vascular tissue.



Figs. 11-16. Longitudinal (11-12) and cross sections (13-16) of seedlings of *Smilax polyantha* a few days after germination at a similar sector indicated in 5. Notice the short epicotyl and the meristematic area (arrows in Figs. 11, 15, 16) that corresponds a rudimentary cotyledonary bud. The first axillary bud of the cataphyll (ct) is seen in detail in 12-14. ab = axillary bud; cs = cotyledonary sheath; cot = cotyledon; ct = cataphyll; en = endosperm; pa = plumular axis; pr = primary root; se = seed.

Serial longitudinal (Figs. 11-12) and cross sections (Figs. 13-16) of different seedlings allowed us to verify that the cotyledonary bud did not play a role in the rhizophore formation. There was a meristematic area that corresponded to a rudimentary cotyledonary bud at the insertion point of the cotyledonary sheath with the cotyledon (Figs. 11, 15-16).

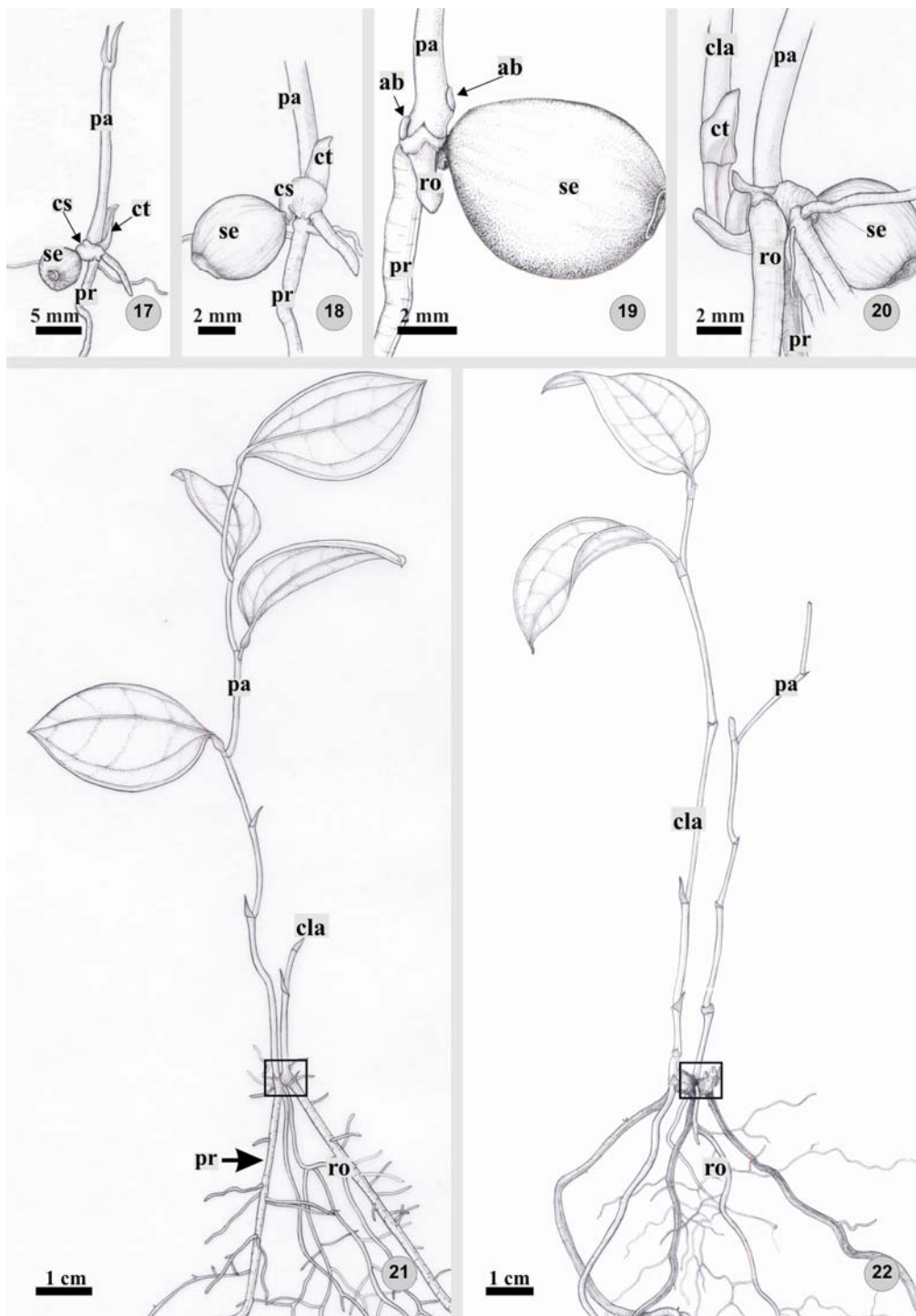
Following the development of the seedling from one month to one year of age (Figs. 17-22), it was possible to verify that the primary root was not short-lived as in other monocotyledons, whereas it did not have a conspicuous growth.

During the first month, the seedling had the primary root and white adventitious roots, plumular axis with two cataphylls and the seed was still attached to the seedling (Figs. 17-19).

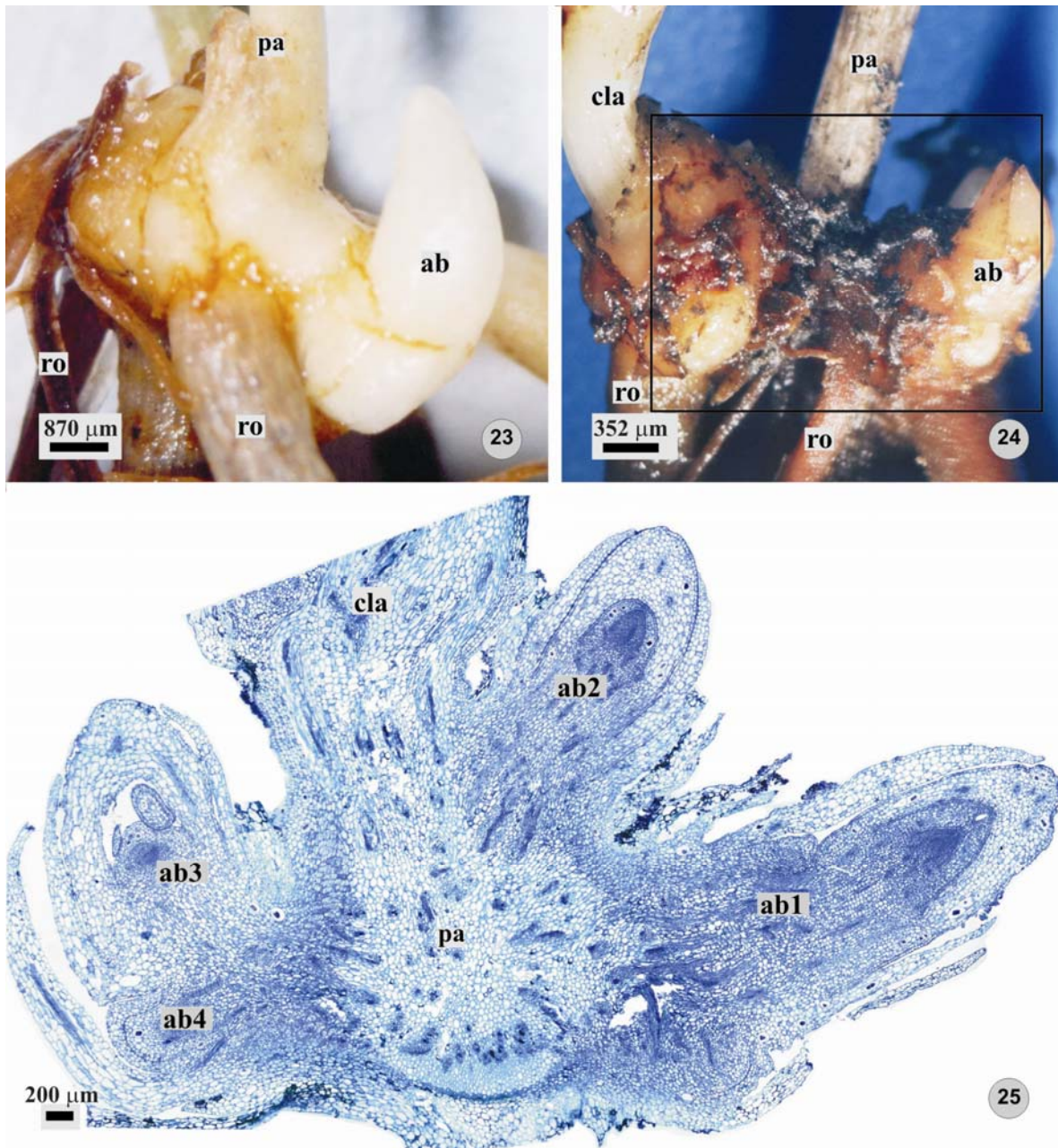
After five months, the seedling contained three visible hyaline cataphylls, the eophyll, the first metaphyll and its first stem ramification. The basis of the two-caulinar branches started to enlarge (Figs. 20-22 and Figs. 23-25), but some parts of the seed remained attached.

After six months, some adventitious roots exhibited brown coloration. After one year, the young plant had three aerial branches. The primary root was still present but it was very difficult to distinguish it from the adventitious roots in different developmental stages from the basal region of the stem branches (Figs. 22 and 23-24).

The anatomical analysis of the enlarged caulinar basis (Fig. 25) showed that the horizontal growth and the subsequent thickening of the underground organ depended on the axillary buds development from basal nodes of the previous branches (Figs. 17-25).



Figs. 17-22. Figs. 17-19. Seedlings of *Smilax polyantha* after one month. Fig. 19. Two axillary buds are indicated after removing the cataphyll. Fig. 20. The detail of the underground stem indicated in Fig. 21. Figs. 21-22. Seedlings of *S. polyantha* with 5 months (Fig. 21) and one year (Fig. 22) after germination. The sector indicated in Fig. 22 is in detail in Figs. 24-25. ab = axillary bud; cla = caulinar axis from axillary bud development; cs = cotyledonary sheath; ct = cataphyll, pa = caulinar axis from plumular development; pr = primary root; ro = adventitious roots; se = seed.



Figs. 23-25. Figs. 23-24. Details of the caulinar basis (rhizophore) of *Smilax polyantha*. Fig. 24. Detail showed in Fig. 22. Fig. 25. Longitudinal section of the structure illustrated in Fig. 24. There are two caulinar axis (cla) and four buds. Note the horizontal growth and the subsequent thickening of the underground organ depend on the axillary buds (ab) development from basal nodes of the previous branches. ro = roots.

4-) DISCUSSION

The species *Smilax polyantha* had low rates of germination (27%) compared to *Smilax campestris* (Rosa and Ferreira, 1999), *S. glauca* and *S. rotundifolia* (Pogge and Bearce, 1989). Rosa and Ferreira (1999) observed 71% of germinated seeds under constant 30°C and continuous light and 51% under alternate temperatures of 25/35°C, while Pogge and Bearce (1989) found rates of 95% for *S. rotundifolia* and 82% for *Smilax glauca* under constant 22°C.

Considering the Cerrado environment (high temperatures and radiation levels and unfertile sandy soil), where *S. polyantha* can be found, we believe that the low germination percentage of this species is not only related to temperature and light for germination of seeds, as tested by the above cited authors. In contrast, we assume that some intrinsic factors are responsible for the delay of germination and thus, prolonging the time of viability of the seeds, since a high number of seeds were still viable after one year of experiment.

This delaying effect demands a long time span before the beginning of germination. The minimum time measured in our investigation took at least 62 days. Rosa and Ferreira (1999) viewed the beginning of germination after 30 days and Pogge and Bearce (1989) only obtained 50% of seed germination after 60 days. According to Andreata (1980), the beginning of germination can vary between 39 and 93 days for the seeds of *Smilax rufescens*, *S. elastica*, *S. syphilitica*, *S. quinquenervia* and *S. syringoides*.

The delay at the beginning of germination in *Smilax* was already considered as a period of dormancy of the seed. However, in preliminary surveys (data not showed here) we verified that *S. polyantha* seeds did not have difficulties in absorbing water. Therefore, breaking the dormancy using scarification methods as presented by Santos et al. (2003) are not justified. As previously described by Andreata and Pereira (1990) in *S. syringoides*, we also noticed in our preliminary evaluations that *S. polyantha* seeds did not germinate when submitted to scarification processes.

Although unknown in chemical details, we infer that this delaying effect is useful for the species to prolong the time span of suitable seeds. Therefore, under natural

conditions in the Cerrado, there are always viable seeds of *S. polyantha* in the soil waiting for optimal conditions to germination.

After germination, we discuss the ontogenesis and development of the underground system. Holm (1890) was the first author to describe the morphology of the underground stem of *Smilax rotundifolia* and *S. glauca*, which are common species in North America. According to Holm (1890), the thickened region of the underground system of *Smilax rotundifolia* is called rhizome, and its origin is in the axillary bud of the cotyledon. Andreato and Menezes (1999) also described the formation of the underground stem in *Smilax quinquenervia* from the cotyledonary bud.

However, in our anatomical study we only observed a rudimentary bud of the cotyledon, and we were able to specify that the origin of the underground stem of *Smilax polyantha* was not from the cotyledonary bud. The underground stem developed from the axillary bud of the first cataphyll at the plumular axis.

Underground stems as the ones of the genus *Smilax* are used to be called ‘rhizome’ (Holm, 1890; Arber, 1925; Raunkiaer, 1934; Troll, 1937; Holttum, 1955). Troll (1937) defined rhizomes as underground stems, growing under the surface of the soil, with internodes and nodes, with cataphylls, their axillary buds and, of course, with adventitious roots. Their main feature is a thick structure, which is necessary to store nutrients. Several papers dealt with this definition and gave detailed information about the rhizomes of different species (Troll, 1937; Bell and Tomlinson, 1980; Pütz and Sukkau, 2002).

However, Andreato and Menezes (1999) described the underground stem of the *Smilax quinquenervia* as ‘rhizophore’. In Brazilian literature, a rhizophore is defined as an underground stem, which originates from the cotyledonary bud in *S. quinquenervia* and *S. polyantha* (Andreato and Menezes, 1999; Martins and Appezzato-da-Glória, 2006). The great difference between a rhizome and the rhizophore is that a rhizome originates from the plumule (Holm, 1929) and constitutes the only vegetative stem branching system of the plant. On the other hand, a rhizophore arises from the cotyledonary bud (Andreato and Menezes, 1999) or from the thickening of the hypocotyl (Menezes, 2006). Since the plumule gives rise to the first stem branching system, the rhizophore constitutes the second vegetative stem branching system of the plant.

In our anatomical analysis, the cotyledonary bud did not form the underground stem of *Smilax polyantha*. However, we observed that the first axillary bud of the plumular axis produced the underground stem. Hence, neither the plumule nor the cotyledonary bud originated the underground system.

Troll (1937) called the underground stem originating from the plumule axis as ‘sympodial rhizome’ in contrast to ‘monopodial rhizomes’, which arise from the plumule stem. However, this branching pattern often changes during the next years of development. Therefore, we propose to name underground stems that originate from axillary buds (including the cotyledonary bud) of the plumule stem as ‘rhizophore’ (according to Andreatta and Menezes, 1999; Hayashi and Appezzato-da-Glória, 2005). In contrast, an underground stem that originates monopodially from the plumule axis should be called ‘rhizome’ (for example, in *Euphorbia dulcis*, for comparison see Troll, 1937).

Horizontal growth and the subsequent thickening of the underground organ depend on the development of axillary buds from basal nodes of the previous branches. The basis of these branches swells through the presence of short internodes as well as through the addition of tissue by a meristematic area. The set of thickened branches form the rhizophore containing axillary buds in the short internodes can provide a new branch for the plant in hard conditions.

As important as the adequate use of the terminology and the description of the morphology is the necessity in discussing the strategy of survival of this species in the Cerrado environment. According to Pütz (2006), we cannot consider the underground systems to be static. Rhizophores and rhizomes are dynamic systems to fulfill some survival aspects, such as occupancy sites, clonal growth and vegetative dispersal.

S. polyantha shows a low rate of germination. However, at the beginning of the seedling development, these plants already have axillary buds in the underground stem that allow them to survive and to sprout after fire, a common disturbance event in Cerrado ecosystems (see Coutinho, 1982; Hoffmann, 1998; Medeiros and Miranda, 2008). On the other hand, this type of strategy assures a successful establishment and thus, survival in the environment. The presence of underground axillary buds and the capacity of sprouting

should be examined under ecological point of view of clonal growth (compare Klimeš et al., 1997). However, we did not observe vegetative propagation of *S. polyantha*.

Regarding the efforts of conservation biologists in protecting species from the Cerrado, we could consider *S. polyantha* as a threatened species, mainly by the extractivism activity. On one hand, this species showed low rates of germination and very slow development (in the period of one year it presents only one branch). On the other hand, the part used in the popular medicine is the underground system. Hence, extractivism activities hinder sprouting and may therefore be a great threaten to the protection of this species in Cerrado ecosystems.

5-) REFERENCES

- Andreato, R.H.P., 1980. *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae) Ensaio para uma revisão das espécies brasileiras. Arq. Jard. Bot. Rio de J. 24, 179-301.
- Andreato, R.H.P., Menezes, N.L., 1999. Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. Bol. Bot. Univ. São Paulo 18, 39-51.
- Andreato, R.H.P., Pereira, T.S., 1990. Morfologia das plântulas de algumas espécies de *Smilax* L. Pesqui. Bot. 41, 7-24.
- Arber, A., 1925. Monocotyledons: a morphological study. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bell, A.D., Tomlinson, P.B., 1980. Adaptive architecture in rhizomatous plants. Bot. J. Linn. Soc. 80, 125-160.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992. Regras para Análise de Sementes. SNAD-DNDV- CLAV, Brasília.
- Coutinho, L.M., 1982. Ecological effects of fire in Brazilian Cerrado. In: Huntley, B.J., Walker, B.H. (Eds.), Ecology of tropical savannas. Springer Verlag, Berlin, pp. 273-291.
- D'Antuono, L.F., Lovato, A., 2003. Germination trials and domestication potential of three native species with edible sprouts: *Ruscus aculeatus* L., *Tamus communis* L. and *Smilax aspera* L. Acta Hort. 598, 211-218.

- Hayashi, A.H., Appezzato-da-Glória, B., 2005. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. *Aust. J. Bot.* 53, 273-279.
- Hoffmann, W.A., 1998. Post-burn reproduction of woody plants in a neotropical savanna: the relative importance of sexual and vegetative reproduction. *J. Appl. Ecol.* 35, 422-433.
- Holm, T., 1890. Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. *Mem. Torr. Bot. Club* 2, 57-108.
- Holm, T., 1929. The application of the term "rhizome". *Rhodora* 361, 6-20.
- Holtum, R.E., 1955. Growth-habits of monocotyledons - variations on a theme. *Phytomorphology* 5, 399-413.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137-138.
- Klimeš, L., Klimešová, J., Hendriks, R., Groenendaal, J. van, 1997. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In: Kroon, H., Groenendaal, J. van (Eds.) *The ecology and evolution of clonal plants*. Backhuys Publishers, Leiden, pp. 1 – 29.
- Martins, A.R., Appezzato-da-Glória, B., 2006. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). *Rev. Bras. Bot.* 29, 555-567.
- Medeiros, M.B., Miranda, H.S., 2008. Post-fire resprouting and mortality in cerrado woody plant species over a three-year period. *Edinb. J. Bot.* 65, 53–68.
- Menezes, N. L., 2006. Rhizophores in *Rhizophora mangle* L: an alternative interpretation of so-called "aerial roots". *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78, 213-226.
- Oliveira, D.M.T., 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosieae*. *Rev. Bras. Biol.* 24, 85-97.
- Pogge, F.L., Bearce, B.C., 1989. Germinating Common and Cat Greenbrier. *Tree Planters' Notes* 40, 34-37.
- Pütz, N., 2006. Seedling establishment, underground kinetics, and clonal reiteration: How do *Potentilla inclinata* and *Inula ensifolia* get their multifunctional subterranean systems? *Flora* 201, 298-306.

- Pütz, N., Sukkau, I., 2002. Seedling establishment, bud movement, and subterranean diversity of subterranean systems in Apiaceae. *Flora* 197, 385-393.
- Raunkiaer, C., 1934. The life form of plants and statistical plant geography. Clarendon Press, Oxford.
- Rosa, S.G.T., Ferreira, A.G., 1999. Germination of medicinal plant: *Smilax campestris* Griseb. (salsaparrilha). *Acta Hortic.* 502, 105-111.
- Sakai, W.S., 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Tech.* 48, 247-249.
- Santos, M.R.A., Paiva, R., Gomes, G.A.C., Paiva, P.D.O., Paiva, L.V., 2003. Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* Grisebach. *Ciênc. Agrotec. Lavras* 27, 319-324.
- Sass, J.E., 1951. Botanical microtechnique. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Tillich, H.J., 2007. Seedling diversity and the homologies of seedlings organs in the order Poales (Monocotyledons). *Ann. Bot.* 100, 1413-1429.
- Troll, W., 1937. Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen, 1. Vegetationsorgane. Borntraeger, Berlin.

Capítulo 2

New approaches to underground systems in Brazilian Smilax species (Smilacaceae)

New approaches to underground systems in Brazilian *Smilax* species (Smilacaceae)

Abstract. Scientific studies show that the watery extract of the thickened underground stem (previously called rhizome) and its adventitious roots of the genus *Smilax* can act as a therapeutic agent in immunoinflammatory disorders, such as the rheumatic arthritis. Brazilians have used this genus of plants in folk medicine, however it is very hard to identify these species, since the morphology of the underground systems is very similar in this group. For better identification of those systems, we studied six species of *Smilax* L. (*S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. goyazana*, *S. oblongifolia* and *S. rufescens*), collected in different regions of Brazil with different physiognomies and soil characteristics. The main purpose is to describe the morpho-anatomy of the underground systems and to analyze if their structure and ecological function depend on environmental conditions. The underground stem (rhizophore) is of brown color and it is knotty, massive, slender (*S. rufescens*) or tuberous (*S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. goyazana* and *S. oblongifolia*). The tuberization is a result of primary thickened meristem (PTM) activity. The color and thickness of the adventitious roots change during development because the epidermis and outer cortex are disposed of, so the inner cortex becomes the new covering tissue with lignified and dark color cells. There are differences in starch grain shapes in mature roots. The chemical attributes of the soil are very similar in all studied environments and, even when soil characteristics varied, all species presented an underground system distributed close to the surface (10 to 15cm of depth). The species exhibited clonal growth hence their underground system functions as storage structures and the axillary buds can sprout into new stems. Only *Smilax rufescens*, collected in sandy soil of Restinga, presents vegetative dispersal due to the runners.

Keywords: adventitious roots; greenbrier; medicinal plants; morphology; phenolic compounds; rhizophores.

1-) INTRODUCTION

Scientific studies demonstrate that the watery extract of the thickened underground stem (previously called rhizome) and the roots of the genus *Smilax* can act as therapeutic agent in immunoinflammatory disorders, such as the rheumatic arthritis (Jiang and Xu, 2003). Brazilians have used this genus of plants in the popular medicine, but it is very difficult to identify these species, since the morphology of the underground system is very similar and we can find about 30 species of this genus in Brazil (Andreata, 1997).

A rigorous characterization including morphology and anatomy of underground parts of medicinal species has essential importance for the quality control of the plant material used in phytotherapy research (Ming, 1994). According to Ferreira et al. (1998), the Brazilian pharmaceutical industry still needs to make huge investments in the research, especially in the quality control to meet international standards.

Davis (1891) studying *Smilax glauca* observed that the environment can influence the growth of the underground system. According to the author plants growing in dry environment present an elevated number of tubers when compared to plants of the same species that grow in wet conditions. However, there is not enough information about Brazilian species of *Smilax* to develop controlled experiments. In order to do so, the first step is to organize a survey of anatomic and morphologic features considering the environment conditions to provide a set of characteristics to better understand the kind of growth and the survival strategy adopted by the *Smilax* species.

We studied six species of *Smilax* L. (*S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. goyazana*, *S. oblongifolia* and *S. rufescens*), collected in different regions of Brazil with different physiognomies and soil characteristics. The main purpose is to describe the morpho-anatomy of the underground systems for a better identification and to analyze if their structure and ecological function depend on the environmental conditions.

2-) MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Adult plant materials of six *Smilax* species were collected in natural populations from different biomes and regions of Brazil (Table 1).

The species *Smilax brasiliensis*, *S. goyazana* and *S. oblongifolia* were collected from open habitat Cerrado (tropical savanna) physiognomies (Figs. 1-3); *S. campestris* in *Campos* (subtropical grasslands); *S. cissoides* in Caatinga and *S. rufescens* in Restinga (sandy coastal plain) (Figs. 4-6). The samples were registered and added to the plant collection of the Herbarium (ESA) of the Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” of the Universidade de São Paulo.

Morphology and anatomy

Underground systems (thickened stem and adventitious roots) of three adult plants were fixed in FAA (formalin-acetic acid-alcohol) (Berlyn and Miksche, 1976), dehydrated in ethanol series and stored in 70% ethanol. The morphology of the vegetative organs was analyzed and registered through digital photographs and botanical illustrations.

For the anatomical analysis, cross-sections of different parts of the thickened underground stem were barehanded obtained also on sliding microtome (30-60 μm), clarified in sodium hypochlorite and stained with safranin and astra blue (Bukatsch, 1972; Burger and Richter, 1991) or crystal violet and orange G (Ma et al., 1993; Purvis et al., 1964) and then dehydrated in a graded ethylic series, and 50 and 100% butyl acetate, respectively. Permanent slides were mounted in synthetic resin “Entellan”.

Young swollen axillary buds from negative geotropic stems of *Smilax brasiliensis* and adventitious roots of all studied species were fixed as described above, dehydrated in ethylic series and embedded in historesin (Leica Historesin). Serial sections were cut at 8-10 μm thickness on a rotary microtome (Sass, 1951) and stained with toluidine blue O (Sakai, 1973). Permanent slides were mounted in synthetic resin.

For histochemical tests, Sudan IV was used to locate lipids (Jensen, 1962); zinc chloride iodate for starches (Strasburger, 1913); iron chloride for phenolic compounds (Johansen, 1940) and ruthenium red for pectin (Johansen, 1940).

Images from slides were captured digitally through a Leica DMLB microscope with a video camera attached to a PC, using Leica, IM50 image analysis software.

Soil analyses

We analyzed soil characteristics according to the procedures described by Raij et al. (1987): Air dried soil samples were sieved (2.0 mm) and analysed for total organic carbon (OM) by spectrophotometry after oxidation with sodium dichromate in presence of sulfuric acid and a subsequent titration with ammoniac ferrous sulfate; phosphorus (P) was determined by spectrophotometry after anion exchange resin extraction; exchangeable aluminum (Al) and basic cations (K, Ca, Mg) were extracted with 1 molc L⁻¹ KCl, cation exchange resin, and buffer SMP, respectively; the cation exchange capacity (CEC) was determined based on the sum of K, Ca, and Mg; the base saturation (V) was calculated as a percentage of the total CEC; the aluminum saturation (m) was calculated based on effective cation exchange capacity; the sum of bases (SB) was represented as the sum of Ca, Mg, and K; and the pH soil was determined in CaCl₂ (0.01 M) solution.

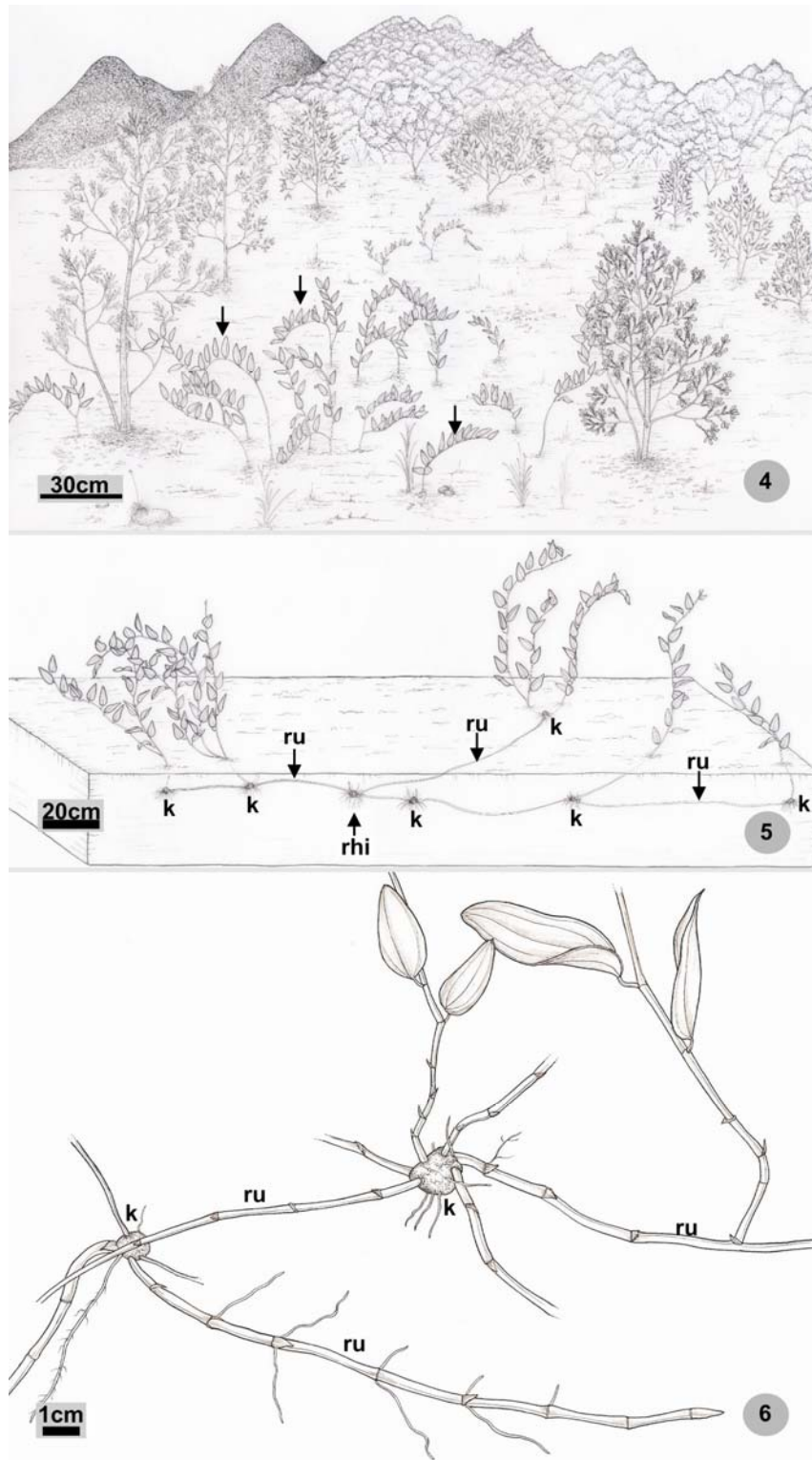
3-) RESULTS

The underground stem system of *Smilax* begins with a rhizophore (see Chapter 1).

Smilax rufescens grows in sandy soils. In the field, the connection is not visible. The disperse distribution of stems can be mistakenly identified as a population of plants. However, analyzing the underground systems makes it clear that all the aerial stems are emitted from an underground stem system distributed horizontally close to the soil surface (10 to 15cm of depth). This underground stem system of *S. rufescens* (Figs. 4-6) forms swollen nodes, separated from each other by horizontal elongated stem parts (runners). The runners are formed by elongated internodes and nodes presenting cataphylls protecting the axillary buds. At regular intervals, we observed that some nodes of the runners swell. These swollen nodes are able to produce new aerial stems, underground runners, and adventitious roots.



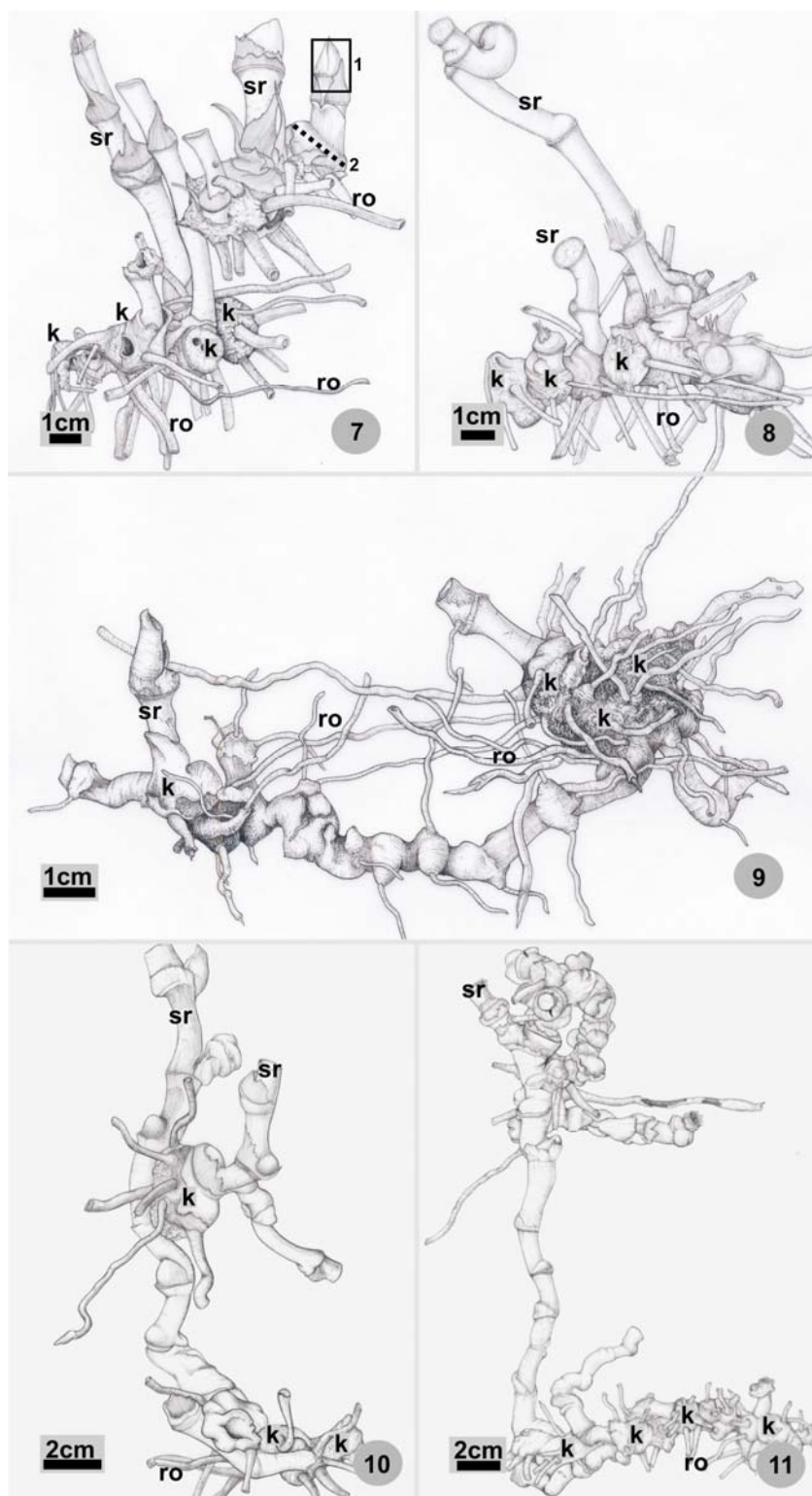
Figs. 1-3. *Smilax brasiliensis* (Fig. 1) and *S. goyazana* (2-3) collected from open habitat Cerrado (tropical savanna) physiognomies. 1. The characteristic environment with predominance of herbs and dispersal trees. 2-3. Stony soil and vegetation composed by herbs.



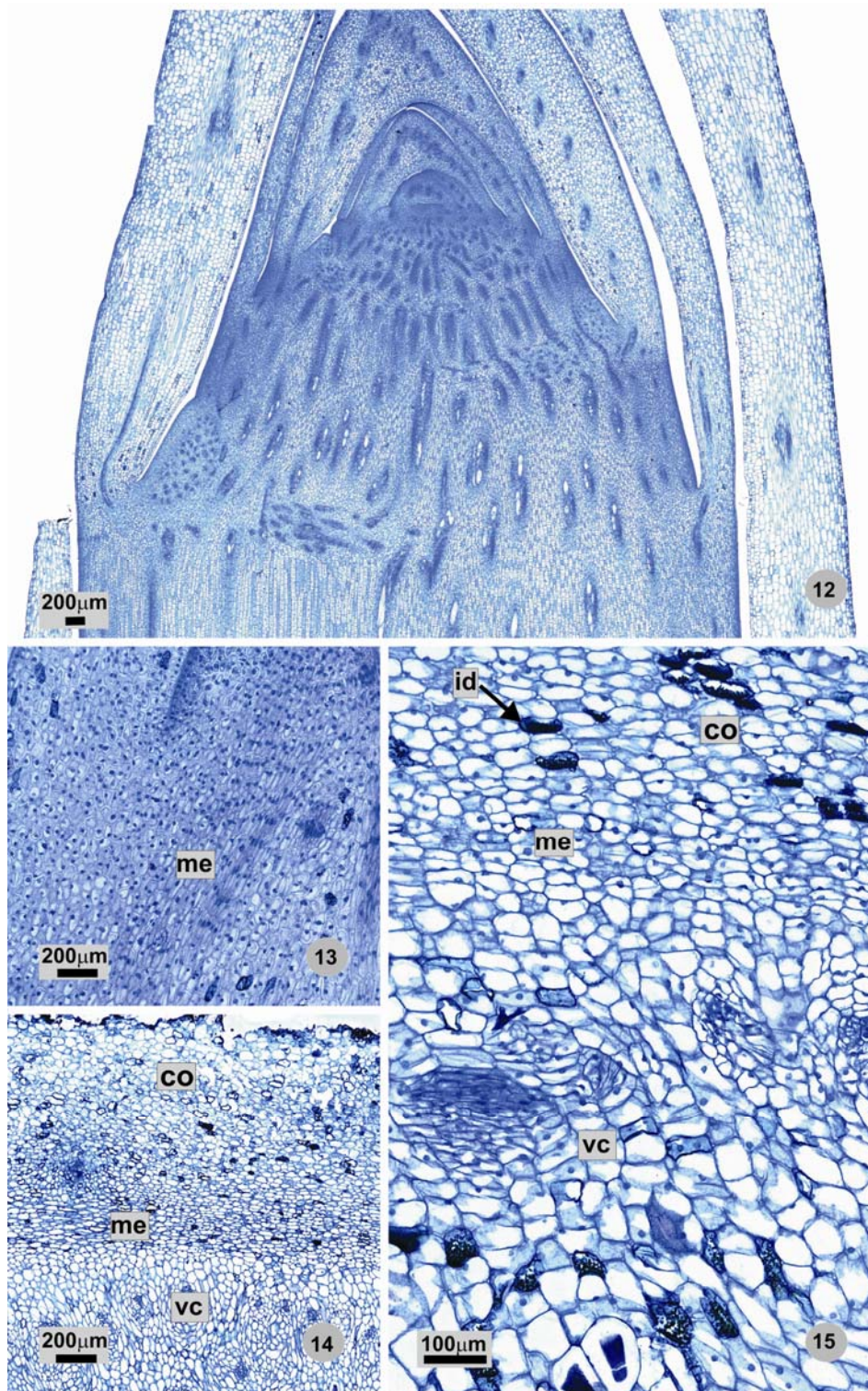
Figs. 4-6. *S. rufescens* in Restinga environment (sandy coastal plain). 4. General view of the environment. One plant appears like a population because of the branch system (arrows). 5. The underground distribution of the runners (ru) and knotty's (k). 6. Detail of underground system. rhi = rhizophore

The underground stem of *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. goyazana* and *S. oblongifolia* is also distributed horizontally close to the surface of the ground (10 to 15cm of depth). It is brownish, woody and measures approximately five to ten centimeters in length. It is constituted by swollen nodes (knotty) (Figs. 7-11) that can produce negative geotropic stems and adventitious roots. We noticed that some axillary buds in the upper nodes of these underground stems had swollen, like the knotty of the original rhizophores (Fig. 7 “2”). These young swollen axillary buds also produced both stem ramifications (Fig. 7 “1”) increasing the underground system complexity. We analyzed the anatomy of these swollen axillary buds to clarify the tuberisation process (Figs. 12-15). In cross section, we observed discontinuous epidermis and cataphylls protecting new buds. The cortex is formed by 10 to 20 layers of parenchyma cells with phenolic idioblasts and raphid idioblasts. Between the cortex and the vascular cylinder, a meristematic area originating new vascular bundles and cortical cells was visible. Thus, the swelling of young swollen axillary buds is a result of the activity of this meristematic area working as a Primary Thickening Meristem (PTM). The anatomy of these swollen axillary buds is similar to the old swollen nodes (rhizophore), as described bellow, differing only on the absence of lignification.

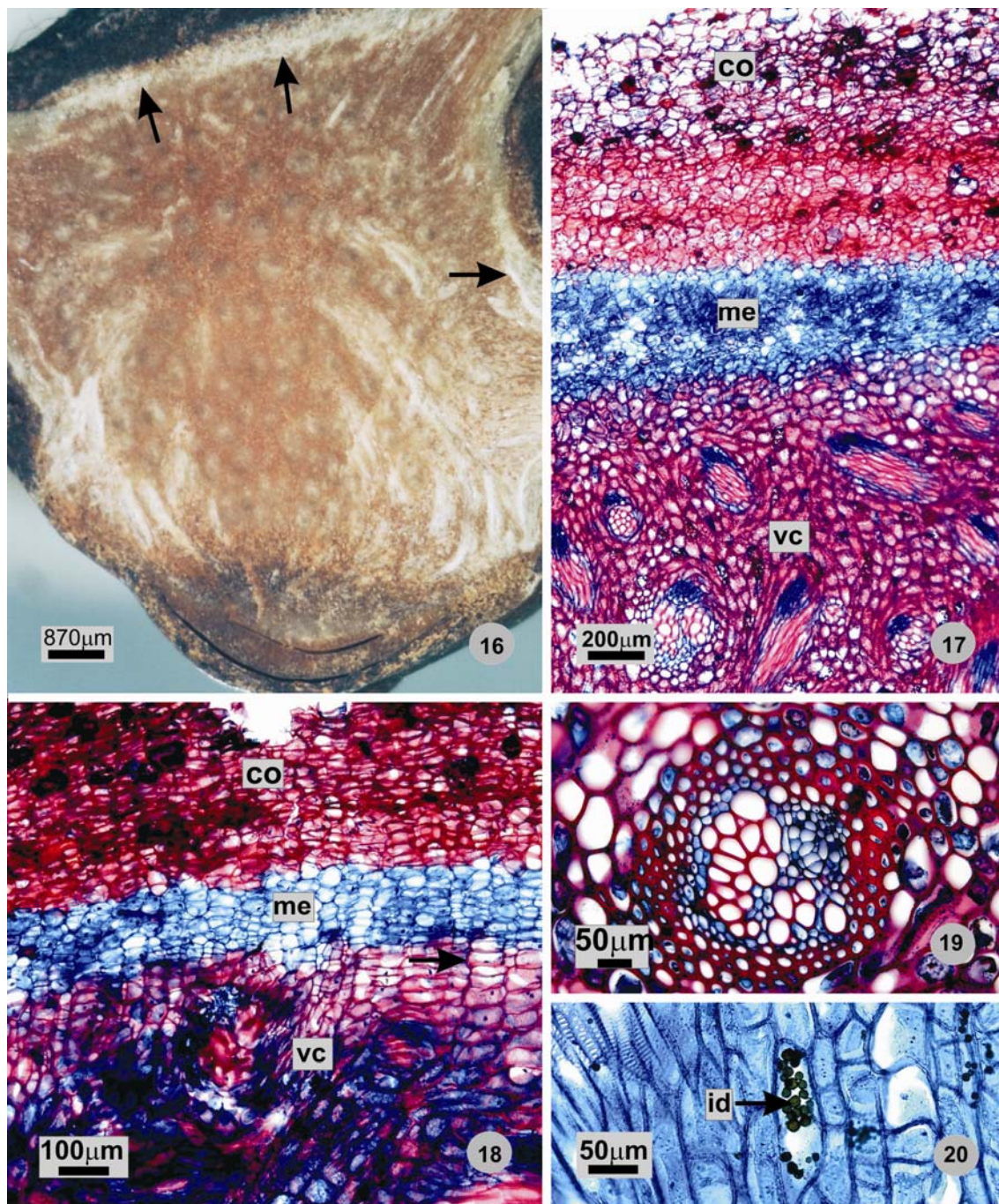
Cross section of elder swollen nodes in the six species presented natural reddish (Figs. 16-20) or yellowish coloration. The anatomical features are similar to younger ones. Anatomical analyses verified a loss of the epidermal cells in the swollen nodes. In this case, cortical cells were covering the inner structures (Figs. 17 and 18). It is interesting to note that the meristematic area is almost continuous with the endoderm and the pericycle. The vascular cylinder of old swollen nodes is comprised of vascular bundles of the collateral type, involved by parenchyma cells with thick and lignified walls (Figs. 17 and 19). Phenolic idioblasts were found among the parenchyma cells of the vascular cylinder (Fig. 20). In cross sections without stain, the content of these idioblasts presents yellow and brown coloration. During the iron chloride test we observed a strong reaction indicating the presence of phenolic compounds. The phenolic compounds were founded in the chemical analysis in Chapter 7. On the other hand, using zinc chloride iodated the majority of starch grains was detected in parenchyma cells surrounding the bundles.



Figs. 7-11. General view of the morphology of the rhizophores of the five species of *Smilax*. 7. *Smilax brasiliensis*. 8. *Smilax cissooides*. 9. *Smilax campestris*. 10. *Smilax goyazana*. 11. *Smilax oblongifolia*. k = knotty; ro = roots; sr = stem ramification. Further explanation in the text.



Figs. 12-15. Longitudinal (12-13) and cross sections (14-15) of shoot apex of *Smilax brasiliensis*. 12. General view of the area showed in 7 '1'. It was not observed intercalary meristem. 13. Detail of the PTM (Primary Thickening Meristem) closer to the axillary buds formation. 14. General view of the swollen area showed in 7 '2'. 15. Detail of the PTM activity forming new and vascular bundles and cortical cells. co = cortical cells; id = phenolic idioblasts; me = meristem layers; vc = vascular cylinder.

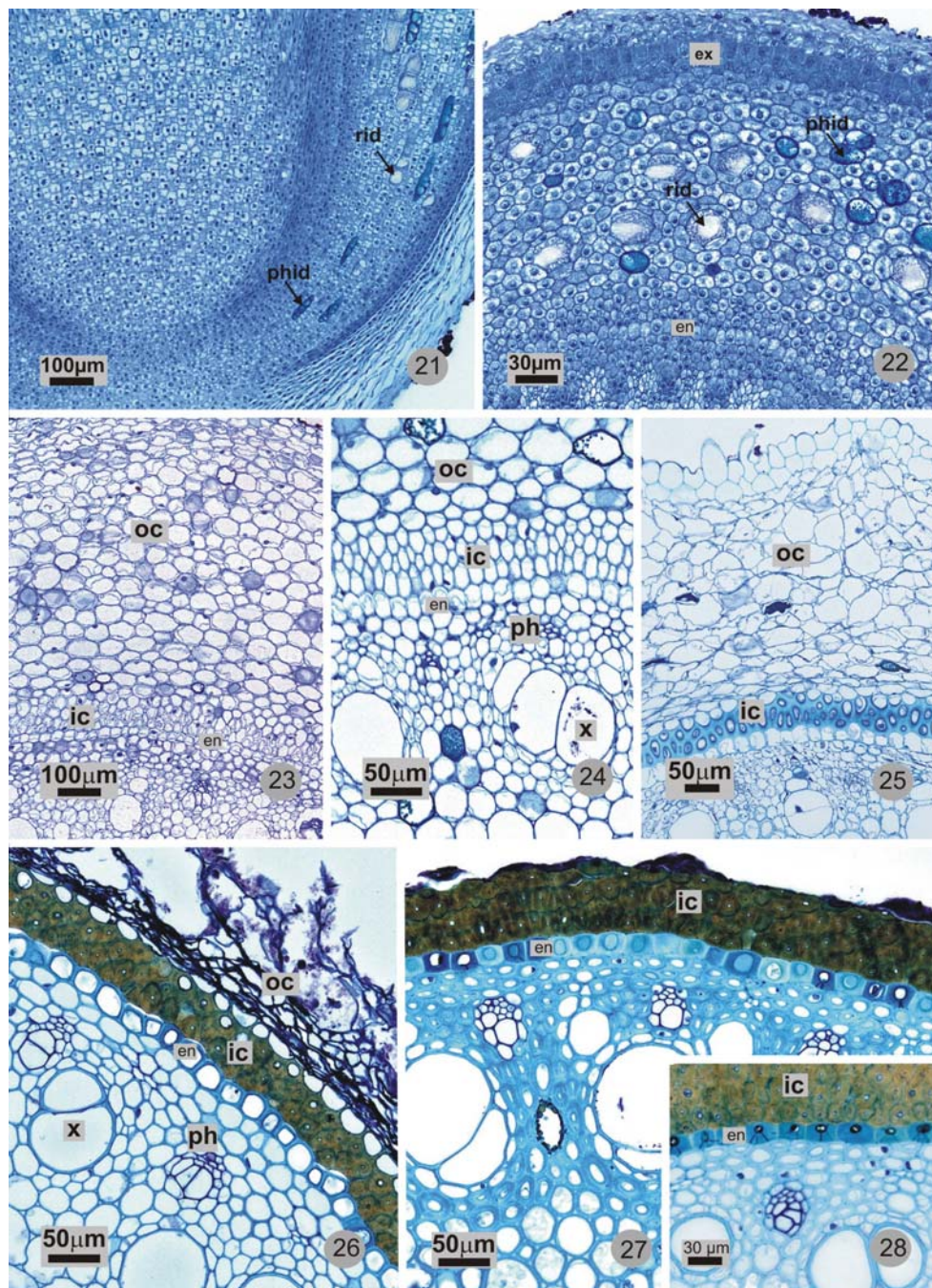


Figs. 16-20. Cross sections of the old swollen nodes (rhizophore). 16. *Smilax campestris*. 17-19. *Smilax cissoides*. 20. *Smilax brasiliensis*. 16. Cross section of swollen nodes in the six species presented natural reddish. The arrows indicate the meristematic layers. 17. General view of the cortical area and of the vascular cylinder. 18. The cortical cells were covering the structure. The meristematic cells can originate new vascular bundles and cortical cells (arrow). 19. Vascular bundles of the collateral type. 20. Phenolic idioblasts. Co = cortical area, id = idioblasts, me = meristematic cells, vc = vascular cylinder.

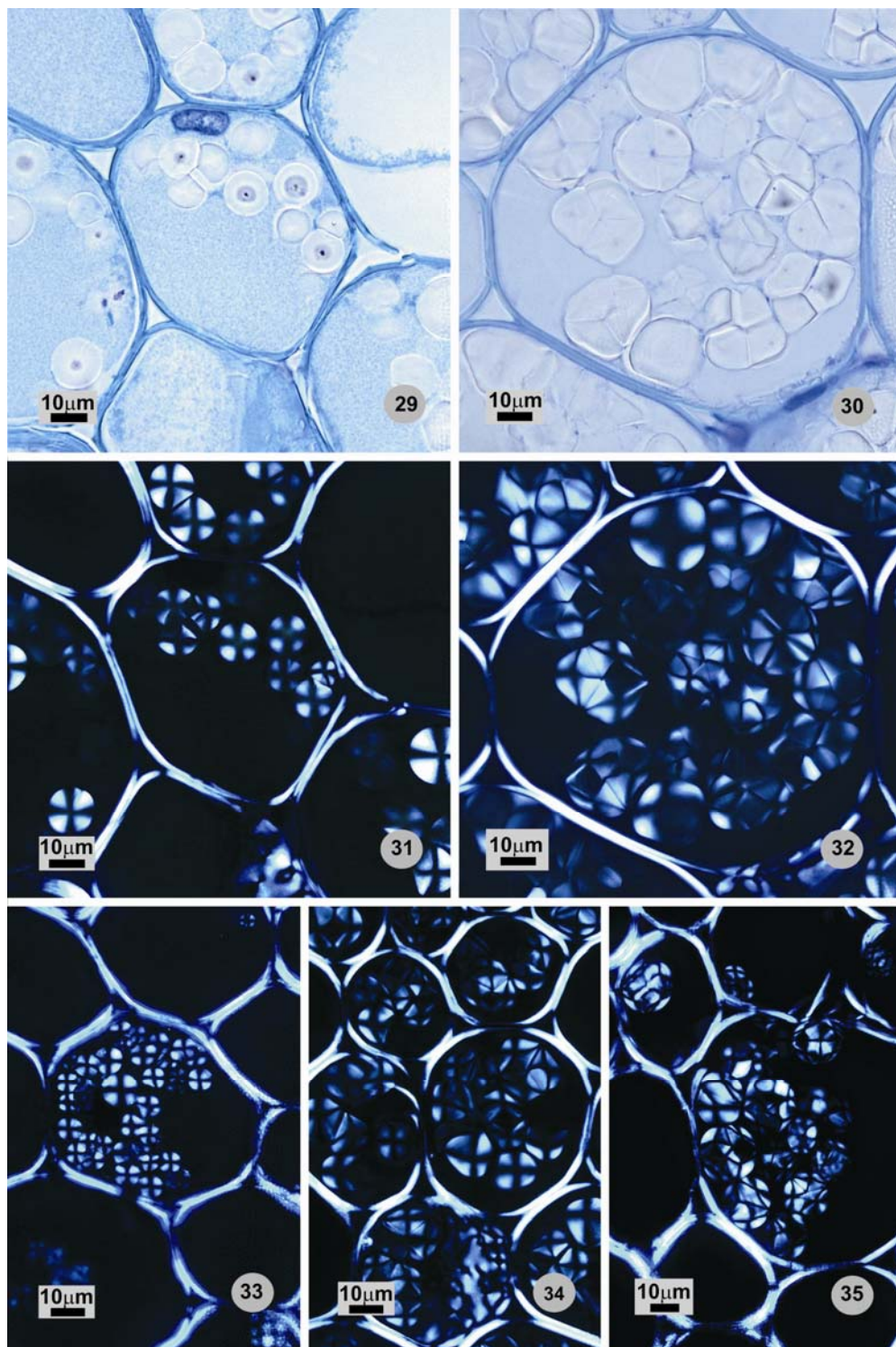
Finally, the adventitious roots were studied in all six species (Figs. 21-28). These roots are rather long, sometimes more than one meter, distributed mainly horizontally at depths between 10 and 30 cm (occasionally 100 cm). We observed roots in two stages of development: young roots, with soft texture and white color and rigid roots of brown color and smaller diameter. In longitudinal section of the root apex (Figs. 21) we found for the six species studied an apical open-type organization which is protected by the root cap. Analyses of the cross sections of the root apex showed the uniseriate protodermis, the single layered exodermis and the cortex divided in an inner and an outer part (Figs. 21-28). Outer cortical cells are isodiametric (many times the cells are under division) with large intercellular spaces and idioblasts in differentiation. The inner cortex is constituted of 2 or 3 layers of small, quadrangular and juxtaposed cells. The endoderm is already identified in the root apex due to its cell size and cytoplasm density (Fig. 22).

The white root is covered by the root epidermis (Fig. 23-25). The cortex is composed by single-layered exodermis with thick-walled cells, several layers (18-20) of large, isodiametric parenchyma cells (outer cortex) and two or three layers of small, juxtaposed cells (inner cortex). The outer cortex presents phenolic and crystals idioblasts. The endodermis can be distinguished despite the absence of an identifiable Casparian band in the cells. The vascular cylinder is polyarch, with wide parenchymatous pith and is surrounded by two layered pericycle of thin-walled cells.

During root maturation progressively occurs secondary thickening of the cell walls, and the outer cortex breaks down. The inner cortex cells and the endodermis exhibit O-shaped cell wall thickenings. The inner cortex cells become brown in color due to deposition of tannins in the walls. The pericycle and the vascular parenchyma also becomes thickened (Fig. 26-28). So, the older roots are thinner and brown in color because they are covered by the inner cortical cell. These roots present great amount of starch grains in the pith parenchyma (Figs. 29-35). These starch grains may be: simple (isolated) and spherical in *S. goyazana* and *S. brasiliensis* (Figs. 29, 31, 33); and polyhedral and composed (grouped) in *S. oblongifolia*, *S. campestris* and *S. cissoides* (Figs. 30, 32, 34, 35).



Figs. 21-28. 21. Longitudinal sections of the root apex of *Smilax campestris*. 21. Apical open-type organization which is protected by the root cap. 22. Detail of the uniseriate protodermis, the single-layered exodermis and endodermis. 23-25. Cross sections of the white root. 23. *Smilax brasiliensis*. 24, 26-27. *Smilax cissoides*. 25 and 28. *Smilax campestris*. 23-24. The cortex is divided in an inner and an outer part. 25. The secondary thickening of endodermic cell walls and the progressive degeneration of the outer cortex. 26-28. The inner cortex cells become brown in color due to deposition of tannins in the walls. The pericycle and the vascular parenchyma also becomes thickened. 27. Endodermis exhibit O-shaped cell wall thickenings. en = endodermis; ep = root epidermis, ex = exodermis; ic = inner cortex; oc = outer cortex; ph = phloem; phid = phenolic idioblasts; rid = raphid idioblasts; x = xylem.



Figs. 29-35. Cortical cells of young roots of *Smilax goyazana*. (29, 31), *Smilax oblongifolia* (30, 32), *Smilax brasiliensis* (33). *Smilax campestris* (34) and *Smilax cissoides* (35). 29,31,33. Starch grains type simple (isolated) and spherical. 30, 32, 34, 35. Starch grains type polyhedral and composed (grouped).

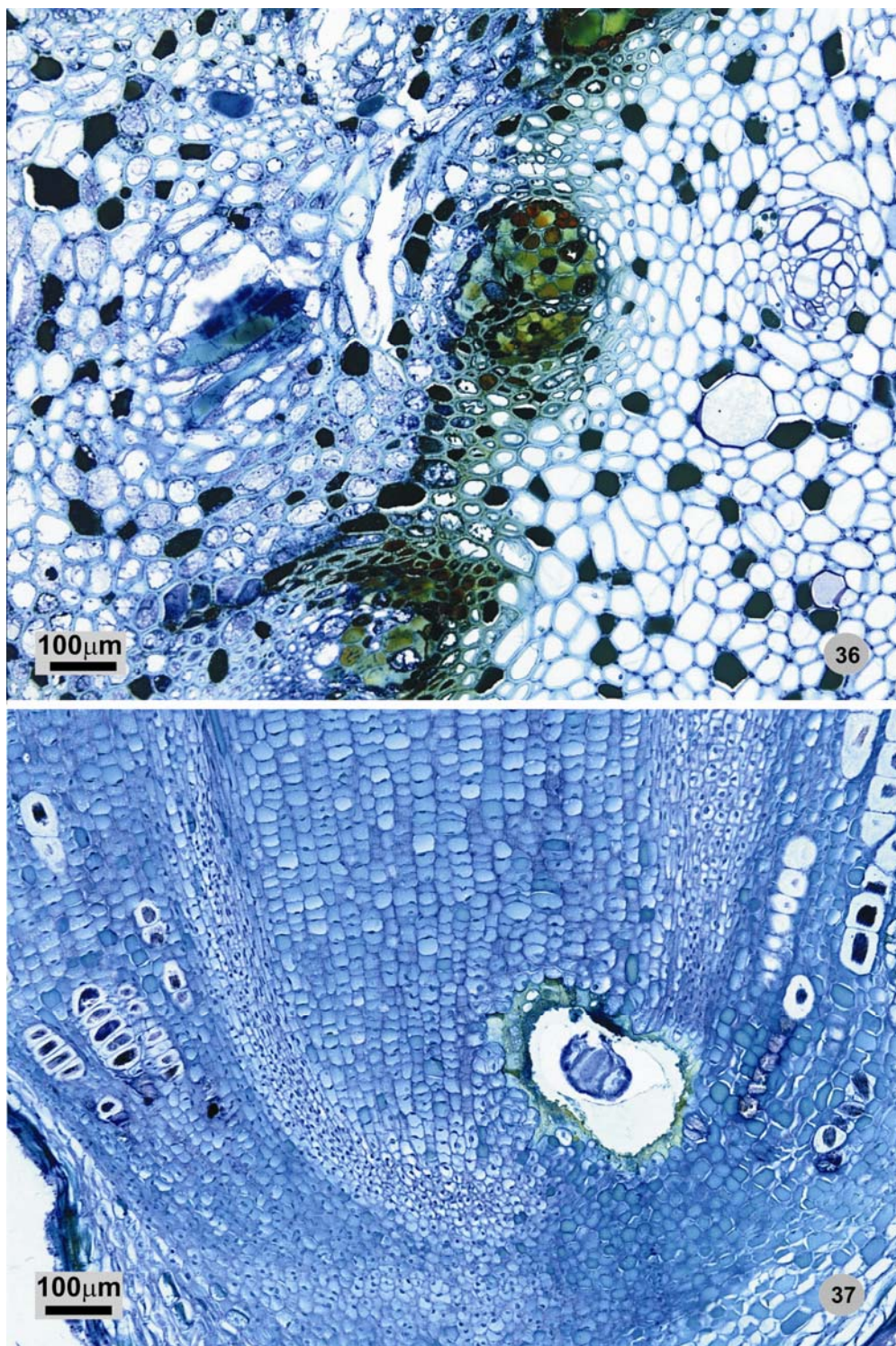
It is interesting to notice that we found some fungus infecting the rhizophore (Fig. 36), and ground parasites infecting the meristematic area of the root apex (Fig. 37). However, in these cases we always found a great concentration of phenolic and raphid idioblasts surrounding the infected area (Figs. 36-37).

The chemical attributes of the soil were very similar in all studied environments. The soil analyses (Table 2) showed typical characteristics of the Cerrado environment, *i. e.*, a very acid pH, high concentration of aluminum in most cases, low level of phosphorus and low cation exchange capacity. In all collected areas, the organic matter content was higher at 0-20 cm soil depth. Our field observations revealed similarities in soil surface (for comparison see Figs. 1-6), in contrast with *Smilax goyazana*, collected from a stony soil (Fig. 2). However, the underground system morphology and distribution is very similar to *S. brasiliensis* collected in a non stony soil (Fig. 1).

4-) DISCUSSION

The first classification as rhizophore of the underground system of the *Smilax* genus was adopted by Andreata (1997) and Andreata and Menezes (1999). These authors described the underground system as constituted by two stem branching systems: one aerial (plumule origin) and one subterranean (cotyledonary bud origin). This underground vegetative system is called rhizophore (Andreata, 1997). In our study with adult plants of *Smilax polyantha* (Martins and Appezzato-da-Gloria, 2006) we also adopt this classification. In contrary, rhizome originates from the plumule (Holm, 1929) and constitutes the only vegetative stem branching system of the plant. However, most authors do not study the origin of underground systems from the seedling, and thus, called the underground system of *Smilax* as rhizome (Davis, 1891; Holm, 1890; Caponetti and Quimby, 1956; Oliveira et al., 1973; Gatuso, 1995; Ju and Jia, 1992; Du et al., 2005; Ooi et al., 2004).

The sympodial system of the rhizophore is originated from the seedling. In *Smilax* it forms by a set of swollen axillary buds connected by sympodial growth. In most cases the swollen buds are very close together and form a short thickened underground stem. The *Smilax* rhizophores are very similar to other tuberous-stems rhizomes (for example *Scrophularia nodosa*, Hegi, 1943).



Figs. 36-37. 36. Cross section of a swollen node (knotty) of *Smilax goyazana* with some fungus infecting the cortical cells of the rhizophore. 37. Longitudinal section of the root apex of *Smilax campestris* with ground parasites infecting the meristematic area. It was observed a great concentration of phenolic and raphid idioblasts surrounding the infection areas in both cases.

However, classification is difficult, because the description of underground stems has its basis on a snapshot mostly. One digs out some individuals and categorizes them with items like rhizophore, rhizome, stolon and so on. But the behavior of a geophilous plant starts with the seedling, and is characterized by different developmental phases, in which the fulfillment of different functions is required. The analysis of the subterranean organ systems development within a holistic-temporal context is necessary. In this case, the three-step model of the geophilous development (Pütz, 2006) offers an ideal basic pattern. Geophilous systems are dynamic and mobile. They are dynamic, because they can adapt their morphological configuration to the changing functional requirements and they are mobile, because their position within the soil is marked by continuous movement. This has been emphasized by several ecological researches (Bell and Tomlinson, 1980; Pütz, 1994; Meyer and Schmid, 1999; Brock et al., 2000 and many more). In the present study no examination on the dynamic development of *Smilax* rhizophores has been made, but the underground system distribution (0–20cm soil depth) in all species coincides with higher contents of organic matter whether the soil is stony or not. All of them exhibited clonal growth hence their underground system functions as storage structures and the axillary buds can sprout into new stems. Only *Smilax rufescens*, collected in sandy soil of Restinga, presents vegetative dispersal due to the runners.

Our anatomical examination clarified up for some details. Caponetti and Quimby (1956) describe the presence of a periderm which covers the underground system. We cannot verify a periderm in any of the six species. However, covering of the rhizophores is constituted by some remaining epidermal cells or by the cortex. The cortex with the function of covering was already observed in *Smilax polyantha* (Martins and Appezzato-da-Glória, 2006) and in *Raphonticum carthanoides* (Lotočka and Gieszprych, 2004).

Cunha (1940) and Caponetti and Quimby (1956) related that the type of thickening of the endoderm could be used like a distinctive anatomical criteria for the identification of the species. Again we have to say that for the species studied and for *S. polyantha* (Martins and Appezzato-da-Glória, 2006) the type of thickening of the endoderm (type “O”) is not a distinctive character.

The anatomy of young swollen axillary buds in underground parts of the stem ramification of *Smilax* species examined is very similar to the anatomy of the swollen nodes of the rhizophore, differing only lignification degree. Such evidences strengthen the idea of the formation of the rhizophore by a set of swollen axillary buds present in the basis of each new stem considering the sympodial growth.

The Primary Thickening Meristem (PTM) found in swollen nodes of the underground parts of new ramifications is similar in position to the meristematic area observed in the rhizophore of the six studied species of *Smilax*.

Considering the described characteristics between stem and scape in the studies with Cyperaceae according Estelita and Rodrigues (2007) it can be argued that aerial stems of *Smilax* are possibly scapes (flower stem). For Estelita and Rodrigues (2007) the presence of intercalary meristem and absence of PTM are two characteristics for the differentiation of a stem and a scape. However, we did not observe intercalary meristem in the species studied, so there is no possibility of the aerial stem of *Smilax* to be one floral scape.

The alternative medicinal use of the roots and rhizophore of the *Smilax* genus was registered in the first edition of the Brazilian Pharmacopeia of 1929 (Silva, 1929). In this edition of the Pharmacopoeia the medicinal species of *Smilax*, which popular name was 'salsaparrilha', could be identified through the way that the roots were packed, the diameter of the root and its coloration. These criteria of identification adopted in the Brazilian Pharmacopeia did not find fundament for *S. polyantha* (Martins and Appezzato-da-Glória, 2006). The six species studied show as well that this criterion is untenable. The roots of the studied species are anatomically very similar, and the difference in coloration and thickness depends on the development phase of the root. Roots with white coloration and higher diameter are just younger, and roots with brown coloration and lesser diameter are older ones. The roots have turned brown due to deposition of tannins in the walls of cells external to the endodermis as verified by McKenzie and Peterson (1995) in *Pinus banksiana* and *Eucalyptus pilularis*.

However the roots change in coloration give hint to an interesting anatomical feature. The diameter decreased by the loss of the area of the outer cortex. Cunha (1940) and Stellfeld (1940) also observed the loss of cortical parenchyma in some Brazilian species of *Smilax*. However, we found that the covering tissue in older roots is formed by

the inner cortex with highly lignified cell walls that can prevent the invasion of microorganisms (Sexton and Roberts, 1982).

The early differentiation of raphides idioblasts and phenolic idioblasts in the apex of the roots of the species can be associated to protection. An evidence of this was the presence of a higher number of phenolic idioblasts surrounding the parasite in the root apex of *S. campestris*. We also observed idioblasts surrounding an infection area caused by fungus in the rhizophore of *S. goyazana*, regarding the idea of protection of these idioblasts. According to Falco et al. (2001) polyphenol oxidase enzymes are highly expressed in sugarcane apical meristems which produce the typical browning of this tissue after cutting or wounding. The large amount of raphides idioblasts found in the underground system of *Smilax* can also be attributed to the protection. Sawidis et al. (2005) showed that raphides seem to be vital for the protection of the root tuber parenchyma of *Asphodelus aestivus* (Asparagales) from herbivores.

In relation to present diagnostic anatomical characters, we can conclude that only the anatomy of the vegetative organs does not allow distinguishing the six studied species. Such species still needs to be identified by the morphology of its leaves. However, the data presented in this study will be able to assist in the distinction of other genus of medicinal plants that are also called popularly of ‘salsaparrilha’, as the *Herreria* genus, mentioned in some studied cases of fake of ‘salsaparrilha’ (Cunha, 1937, Stellfeld, 1940).

5-) REFERENCES

- Andreata, R.H.P., 1997. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). *Pesqui Bot* 47, 7-244.
- Andreata, R.H.P., Menezes, N.L., 1999. Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. *Bol Bot Univ São Paulo* 18, 39-51.
- Bell, A.D., Tomlinson, P.B., 1980. Adaptive architecture in rhizomatous plants. *Bot J Linn Soc.* 80, 125–160.
- Berlyn, G.P., Miksche, J.P., 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press, Ames.

- Brock, J.L., Albrecht, K.A., Tilbrook, J.C., Hay, M.J.M., 2000. Morphology of white clover during development from seed to clonal populations in grazed pastures. *J. Agric. Sci.* 135, 103–111.
- Bukatsch, F., 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61, 255.
- Burger, L.M., Richter, H.G., 1991. *Anatomia da Madeira*. Nobel, São Paulo.
- Caponetti, J.D., Quimby, M.W., 1956. The comparative anatomy of certain species of *Smilax*. *J. Am. Pharm. Assoc.* 45, 691-696.
- Cunha, N.S., 1937. Curiosa falsificação de salsaparrilha. *Rev. Bras. Farm.* 18, 399-352.
- Cunha, N.S., 1940. As salsaparrilhas em face da Farmacopéia Brasileira. *Trib. Farm.* 8, 105-112.
- Davis, W.T., 1891. Variations in rootstock of *Smilax glauca* dependent upon environment. *Bull. Torrey Bot. Club.* 18, 118-119.
- Du, Q., Li, L., Jerz, G., 2005. Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1077, 98-101.
- Estelita, M.E.M., Rodrigues, A.C., 2007. Subsídios estruturais à caracterização do sistema caulinar em Cyperaceae. *Rev. Bras. Bot.* 30, 401-409.
- Falco, M.C., Marbach, P.A.S., Pompermayer, P., Lopes, F.C.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genet. Mol. Biol.* 24, 113-122.
- Ferreira, S.H., Barata, L.E.S., Salles, S.L.M., Queiróz, S.R.R., Heluy Neto, N.E., Corazza, R., Farias, R.C., 1998. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Gattuso, S.J., 1995. Exomorfología y anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). *Acta Farm. Bonaer.* 14, 181-190.
- Hegi, G., 1943. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. Carl Hanser Verlag, München.
- Holm, T., 1890. Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. *Mem Torr Bot Club* 2, 57-108.
- Holm, T., 1929. The application of the term “rhizome”. *Rhodora* 361, 6-20.
- Jensen, W.A., 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. W. H. Freeman, San Francisco.

- Jiang, J., Xu, Q., 2003. Immunomodulatory activity of aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 85, 53-59.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York.
- Ju, Y., Jia, Z., 1992. Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax menispermoides*. *Phytochemistry* 31, 1349-1351.
- Lotocka, B., Geszprych, A., 2004. Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of *Rhaponticum carthamoides* (Asteraceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 144, 207–233.
- Ma, Y.; Sawhney, V.K., Steeves, T.A., 1993. Staining of paraffin-embedded plant material in safranina and fast green without prior removal of the paraffin. *Can. J. Bot.* 71, 996-999.
- Martins, A.R., Appezzato-da-Glória, B., 2006. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Grisebach (Smilacaceae). *Rev. Bras. Bot.* 29, 555-567.
- Martins, A.R., Pütz, N., Novembre, A.D.L.C., Piedade, S.M.S., Appezzato-da-Glória, B., 2009. New insights about the germination and development of rhizophores in the Brazilian species *Smilax polyantha* (SMILACACEAE). *Flora* (Manuscript submitted).
- McKenzie, B. E., Peterson, C. A., 1995. Root browning in *Pinus banksiana* Lamb. and *Eucalyptus pilularis* Sm. 2. Anatomy and permeability of the cork zone. *Bot. Acta* 108, 127-137.
- Meyer, A.H., Schmid, B., 1999. Experimental demography of rhizome populations of establishing clones of *Solidago altissima*. *J.Ecol.* 87, 42–54.
- Ming, L.C., 1994. Estudos e pesquisas de plantas medicinais na agronomia. *Hortic. Bras.* 12, 3-9.
- Oliveira, F., Silva, J. B., Rocha, A. B., 1973. Contribuição para o reconhecimento do rizoma de *Smilax japecanga* Grisebach. *Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara* 7, 7-18.
- Ooi, L.S.M.S., Wang, H., Ooi, V.E.C., 2004. New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of salsaparrilha *Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). *J. Agric. Food Chem.* 52, 6091-6095.
- Purvis, M.J., Collier, D.C., Walls, D., 1964. Laboratory techniques in botany. Butterworths, London.
- Pütz, N., 1994. Vegetative spreading of *Oxalis pes-caprae*. *Plant Syst. Evol.* 191, 57–67.

- Pütz, N., 2006. Seedling establishment, underground kinetics, and clonal reiteration: how do *Potentilla inclinata* and *Inula ensifolia* get their multifunctional subterranean systems? *Flora* 201, 298–306.
- Raij, B. van, Quaggio, J.A., Cantarella, H., Ferreira, M.E., Lopes, A.S., Bataglia, O.C., 1987. Análise química do solo para fins de fertilidade. Fundação Cargill, Campinas.
- Sakai, W.S., 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Tech.* 48, 247-248.
- Sass, J.E., 1951. Botanical microtechnique. Iowa State University Press, Ames.
- Silva, R.A.D., 1929. Farmacopéia (Pharmacopéia) dos Estados Unidos do Brasil. Companhia Editora Nacional, Rio de Janeiro.
- Stellfeld, C., 1940. Sarçaparilha e Jupicanga. *Trib. Farm.* 8, 193-202.
- Strasburger, E., 1913. Handbook of practical botany. (Transl. W. Hillhouse). George Allen and Company Ltda., London.
- Sawidis, T., Kalyva, S., Delivopoulos, S., 2005. The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*. *Flora* 200, 332–338.
- Sexton, R., Roberts, J. A., 1982. Cell biology of abscission. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 133- 162.

Table 1. Information about adult plant materials of six *Smilax* species collected in natural populations from different biomes and regions of Brazil.

Species	Local	Date of collect	Map
<i>Smilax brasiliensis</i> Sprengel	Itapagipe – MG S 19°32'39.6'' W 49°26'36.2''	December 2005	
<i>Smilax campestris</i> Grisebach	Porto Alegre - RS S 30°03'34.2'' W 51°07'31.8''	January 2007	
<i>Smilax cissoides</i> Martius ex Grisebach	Feira de Santana – BA S 12°12'07'' W 38°57'57.4''	July 2006	
<i>Smilax goyazana</i> A. De Candolle	Itapaci – GO S 15°02'42.1'' W 49°48'18.9''	January 2007	
<i>Smilax oblongifolia</i> Pohl ex Grisebach	Distrito de Santo Antônio Leite - Ouro Preto – MG S 20°21'17.4'' W 43°41'13.8''	May 2007	
<i>Smilax rufescens</i> Grisebach	Parque Estadual da Ilha do Cardoso – Cananéia – SP S 25°03'57.7'' W 47°55'06''	March 2006	

Table 2. Soil chemical properties at two different depths. (OM = organic matter, P = phosphorus, K = potassium, Ca = calcium, Mg = magnesium, Al = exchangeable aluminum, V% = base saturation, m% = aluminum saturation, total of bases (SB), total cation exchange capacity calculated (CEC).

Place	Sample	pH	H+Al	Al	K	Na	OM	Ca	Mg	P	SB	CEC	V	m
Units			(mmol _c /dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(g/dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(mg/dm ³)	(mmol _c /dm ³)	(mmol _c /dm ³)	%	%
Porto Alegre	0-20 cm of depth	4.13	98.67	17.17	2.44	10.08	34.72	19.67	6.67	6.88	38.86	137.52	30.56	29.29
	20-40 cm of depth	3.93	133.33	30.63	1.07	9.45	22.63	11.67	5.33	2.92	27.52	160.86	18.87	51.43
Itapaci	0-20 cm of depth	4.13	40.00	7.90	1.14	1.89	17.67	4.33	2.00	3.15	9.36	49.36	19.41	45.54
	20-40 cm of depth	4.20	27.00	7.17	0.60	1.26	8.06	1.67	1.00	1.28	4.53	31.53	14.25	61.49
Itapagipe	0-20 cm of depth	4.62	31.67	4.73	1.24	2.52	23.25	10.33	7.67	3.62	21.76	53.43	39.06	21.90
	20-40 cm of depth	4.61	31.67	7.00	0.75	1.89	17.67	7.43	5.67	3.27	15.74	47.41	30.99	37.46
Feira de Santana	0-20 cm of depth	4.59	19.67	0.77	1.33	6.93	18.60	17.30	9.00	5.60	34.56	54.22	63.80	2.22
Ilha do Cardoso	0-20 cm of depth	4.61	11.00	1.93	0.36	3.15	8.68	0.00	1.67	2.22	5.18	16.18	31.54	28.61
	20-40 cm of depth	4.76	9.33	1.60	0.31	3.78	5.58	0.00	2.00	1.87	6.09	15.43	39.53	20.78
Ouro Preto	0-20 cm of depth	5.08	16.67	1.67	0.90	1.89	19.53	8.10	5.33	3.15	16.23	32.89	42.88	21.76
	20-40 cm of depth	4.98	16.00	2.67	0.53	1.26	16.12	6.73	4.00	2.80	12.53	28.53	37.10	35.60

Capítulo *3*

Morfo-anatomia da folha e do caule não espessado de espécies de Smilax L. (Smilacaceae)

Morfo-anatomia da folha e do caule não espessado de espécies de *Smilax* L. (Smilacaceae)

Resumo: As espécies do gênero *Smilax* ocorrem principalmente em áreas de Cerrado e são utilizadas como plantas medicinais obtidas pelo extrativismo. O objetivo desse estudo foi descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* visando encontrar caracteres diagnósticos que diferenciem as espécies. Amostras do material vegetativo foram fixadas em FAA 50. Parte do material foi infiltrado em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin), seccionado em micrótomo rotativo, corado com azul de toluidina e montado em resina sintética. A outra parte foi seccionada em micrótomo de deslize e corada com azul de Astra e safranina. Para as análises ao microscópio eletrônico de varredura, amostras de folhas foram fixadas em Karnovsky, desidratadas em série etílica e pelo método do ponto crítico de CO₂, montadas sobre suportes de alumínio e metalizadas. A folha das três espécies é anfiestomática, os estômatos são paracíticos e a epiderme é uniestratificada. O mesofilo nas três espécies tende à dorsiventral. *S. brasiliensis* e *S. cissoides* apresentam uma ou duas camadas de células curtas em formato de “M” de arranjo justaposto voltada para a face adaxial. Em *S. campestris*, as células dessas camadas possuem formato retangular. As demais camadas do mesofilo nas três espécies apresentam amplos espaços intercelulares com células brachiformes. No mesofilo são encontrados idioblastos contendo compostos fenólicos e idioblastos com ráfides. Em *S. brasiliensis* há menos idioblastos com ráfides que nas demais espécies. Os feixes colaterais nas três espécies podem variar em tamanho, mas sempre são envolvidos por células lignificadas. A nervura central de *S. brasiliensis* e *S. cissoides* possui três feixes vasculares centrais de tamanhos semelhantes envolvidos individualmente por células lignificadas, enquanto em *S. campestris* há quatro feixes vasculares: três centrais envolvidos por uma única bainha de células lignificadas e um feixe menor. O bordo foliar das três espécies apresenta células esclerificadas e idioblastos contendo ráfides. No caule, a organização do cilindro vascular também não varia entre as espécies em estudo, porém ocorre variação no grau de lignificação das células dependendo da porção a ser analisada. Na região do terceiro entrenó e na porção caulinar próxima ao solo, o cilindro vascular é envolvido por anel esclerenquimático. Na porção subterrânea não se observa o anel esclerenquimático, sendo que cada feixe colateral é envolvido por uma bainha esclerenquimática. No cilindro vascular do caule das três espécies podem ser encontrados idioblastos contendo fenóis e células contendo amido.

1-) INTRODUÇÃO

Segundo Judd et al. (2009) a família Smilacaceae possui apenas o gênero *Smilax* com 310 espécies que se distribuem nas regiões temperadas e tropicais.

As plantas são dióicas, lianas ou trepadeiras herbáceas, raramente subarbustos ou arbustos; as folhas são simples, alternas, com pecíolos providos de gavinhas, venação primária acródroma; os caules espessados são rizóforos e os caules aéreos são, em geral, aculeados (Andreato 1997).

Encontramos na literatura alguns autores que já descreveram características da anatomia foliar de espécies do gênero *Smilax* tais como Mandarin-de-Lacerda et al. (1992), que apresentam variação tanto no porte quanto na biometria foliar de *Smilax rufescens*; Marquete & Pontes (1994), cujo estudo anatômico comparativo entre *Smilax spicata*, *Smilax rufescens* e *Smilax fluminensis* apresenta como única diferença entre as três espécies o fato de que as folhas de *S. fluminensis* são anfiestomásticas e das outras duas espécies, hipostomásticas; e o de Mandarin-de-Lacerda & Andreato (1994/1995), cujo estudo comparativo foi entre as folhas adultas de *S. campestris* e *S. cognata*. Também podemos citar os estudos de Gattuso (1995) com a caracterização de *S. campestris* e Palhares et al. (2009) com a caracterização das folhas de *S. goyazana*.

As espécies desse gênero são popularmente conhecidas como salsaparrilha ou japecanga e são utilizadas na medicina popular como fortificante, contra o reumatismo e anti-sifilítico (Andreato 1997). Estudos comprovam que o extrato aquoso do rizóforo pode atuar como agente terapêutico em doenças imuno-inflamatórias, como é o caso da artrite reumática (Jiang & Xu 2003), e também foi encontrada nas folhas da espécie *Smilax aspera* uma substância denominada tocoferol, que é um componente fenólico conhecido por sua eficiência como antioxidante (Demo et al. 1998).

Apesar das atividades farmacológicas atribuídas ao gênero *Smilax*, tais plantas apresentam dificuldade em sua identificação taxonômica devido às suas características morfológicas, composição química e nomes populares semelhantes (Andreato 1997).

O objetivo do trabalho foi descrever a morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos de três espécies de *Smilax* L. (*S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides*) visando à

caracterização e definição de particularidades anatômicas de cada espécie para auxiliar na identificação.

2-) MATERIAL E MÉTODOS

A) Material botânico

Para os estudos morfoanatômicos dos órgãos vegetativos aéreos e subterrâneos, foram estudadas três espécies de *Smilax* L., ocorrentes no Cerrado, que possuem propriedades medicinais e recebem a denominação salsaparrilha (Andreato 1997): *Smilax brasiliensis* Sprengel (Figura 1A), coletada na cidade de Itapagipe – MG durante o mês de dezembro de 2005, *Smilax campestris* Grisebach (Figura 1C), coletada em São José do Rio Preto – SP durante o ano de 2003 e em Porto Alegre – RS em janeiro de 2007 e *Smilax cissoides* Martius ex Grisebach (Figura 1E), coletada em Feira de Santana – BA, durante o mês de julho de 2006.

As espécies foram identificadas pela especialista Profa. Dra. Regina Helena Potsch Andreato e as exsicatas foram registradas e incorporadas ao acervo do Herbário (ESA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

B) Estudos anatômicos

As análises anatômicas foram realizadas com os órgãos vegetativos. Na folha completamente expandida, foi analisada a região mediana da lâmina foliar, nas porções da nervura central, área internervural e bordo. O caule foi analisado na região do terceiro entrenó, na parte aérea próxima ao solo (região intermediária) e na sua porção subterrânea.

As amostras foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940). Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos.

As secções (transversais e longitudinais) foram feitas à mão-livre (folhas e caule) e em micrótomo de deslize (caules) com 30-60 µm de espessura, clarificadas com hipoclorito de sódio a 20% e lavadas em água destilada. Alguns cortes foram corados com verde iodo e vermelho Congo (Dop & Gautié 1928) e montados em gelatina glicerizada (lâminas semi-permanentes). Outros cortes foram corados em safranina e azul de astra (Bukatsch 1972;

Burger & Richter 1991), desidratados em série etílica, acetato de butila 50% e 100% e montados em resina sintética “Entellan” (lâminas permanentes).

Amostras dos órgãos vegetativos também foram desidratadas em série etílica, incluídas em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin) e os blocos obtidos foram seccionados a 8-10 µm de espessura. O material foi corado com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico pH 4,5 (Sakai 1973) e as lâminas montadas em resina sintética “Entellan”.

Para o estudo das células do mesófilo foi utilizada a técnica de dissociação de tecidos, na qual as amostras foram tratadas com ácido crômico 10% e ácido nítrico 10%, coradas, desidratadas e montadas em gelatina glicerina (Johansen 1940).

Os testes histoquímicos foram realizados utilizando-se secções de material fixado dos órgãos vegetativos. As secções foram feitas à mão-livre, com auxílio de lâmina de barbear, e em micrótomo de deslize. A presença de substâncias lipídicas foi visualizada pelo emprego de Sudan IV (Jensen 1962). A presença de amido foi verificada pelo cloreto de zinco iodado (Strasburger 1913) e pelo lugol (Berlyn & Miksche 1976); a presença de compostos fenólicos pelo emprego de cloreto férrico (Johansen 1940); a presença de lignina foi evidenciada por meio da floroglucina em meio ácido (Johansen 1940) e as substâncias pecticas pelo vermelho de rutênio (Johansen 1940).

A descrição da morfologia foliar e a classificação dos padrões de nervação foram baseadas em Ash et al. (1999).

As fotomicrografias dos materiais preparados em lâminas foram feitas em microscópio trinocular Leica DM LB, acoplado na câmera de vídeo modelo Leica DC 300 F, sendo que as imagens e as escalas micrométricas foram capturadas no microcomputador nas mesmas condições ópticas.

A morfologia dos órgãos vegetativos foi documentada por meio de fotografias com máquina digital ou por ilustrações botânicas.

C) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises ao microscópio eletrônico de varredura, amostras de folhas foram fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e pelo método do ponto crítico de CO₂, montadas sobre suportes de alumínio e metalizadas com ouro.

As análises e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 940A, operado a 20kV, com as escalas diretamente impressas nas mesmas.

3-) RESULTADOS

Morfo-anatomia da folha

O limbo foliar em *Smilax brasiliensis* Sprengel é de formato oval, do tipo coriáceo, com ápice levemente emarginado, apiculado, base arredondada, margem inteira, às vezes aculeada, venação do tipo acródroma basal com três nervuras principais e duas inconspícuas, que podem apresentar emergências espiniformes em suas extensões (Figura 1 A-B).

Em *S. campestris* Grisebach, o limbo foliar apresenta formato oblongo, lanceolado ou elíptico (Figura 1 C-D), do tipo coriáceo, com o ápice convexo com um curto apículo, base convexa ou levemente cordada, margem inteira, às vezes aculeada, venação do tipo acródroma basal com três nervuras principais e duas inconspícuas que podem apresentar emergências espiniformes em suas extensões.

Em *S. cissoides* Martius ex Grisebach, o limbo é elíptico ou oval, do tipo membranáceo, com ápice convexo, apiculado, base arredondada ou cordada, margem inteira, às vezes provida de estruturas espinescentes (Figura 1 E-G), venação do tipo acródroma basal com cinco nervuras principais e duas inconspícuas (Figura 1 F), que podem apresentar emergências espiniformes em suas extensões (Figura 1 F).

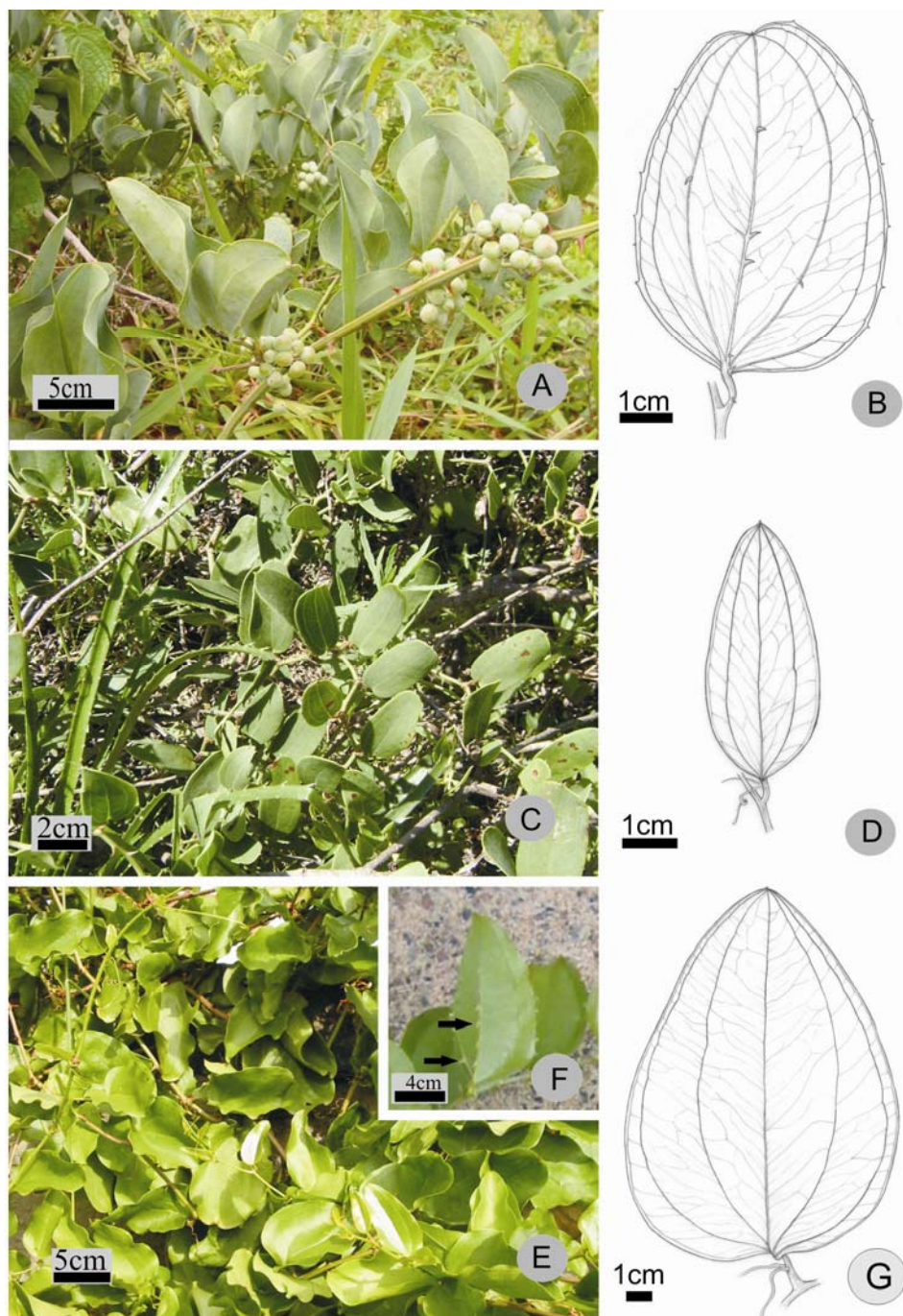


Figura 1. A-B. *Smilax brasiliensis* Sprengel. A. Visão geral da planta no campo. B. Detalhe da folha. C-D. *S. campestris* Grisebach. C. Visão geral da planta coletada no campo. D. Detalhe da folha. E-G. *S. cissoides* Martius ex Grisebach. E. Visão geral da planta coletada no campo. F. Folha com estruturas espinescentes na margem e ao longo da nervura central (setas). G. Folha com cinco nervuras principais proeminentes.

Em vista frontal, as paredes da epiderme da face adaxial são retas em *S. brasiliensis* e *S. cissoides* (Figuras 2 A e E) e sinuosas em *S. campestris* (Figura 2 C). As paredes da epiderme da face abaxial são retas em *S. brasiliensis* (Figura 2 B), sinuosas em *S. campestris* (Figura 2 D) e onduladas em *S. cissoides* (Figura 2 F). A folha de *S. brasiliensis* é anfi-hipoestomática e *S. campestris* e *S. cissoides* é hipoestomática. Na espécie *S. brasiliensis* os estômatos são paracíticos e em *S. campestris* e *S. cissoides* os estômatos são anomocíticos (Figura 2 B, D e F). O conjunto de características da folha das três espécies pode ser observado na Tabela 1.

As análises ultra-estruturais revelaram tipos distintos de deposição de ceras e ornamentação da cutícula da folha (Figura 3). Na face adaxial de *S. brasiliensis* a cutícula apresenta-se em cristais de cera formando protuberâncias crostosas, já na superfície abaxial a deposição de ceras na cutícula apresenta-se do tipo papilosa, também encontrada em ambas as faces de *S. campestris*. Outro tipo de deposição da cutícula encontrado entre as espécies é o tipo granular, observado em ambas as faces foliares de *S. cissoides* no formato de grânulos diminutos.

Nos cortes transversais (Figura 4) pode-se observar que a epiderme é unisseriada e que o mesofilo tende a dorsiventral nas três espécies, pois apresenta uma ou duas camadas de células curtas, em formato de “M” de arranjo justaposto voltada para a face adaxial (Figura 4). As demais camadas do mesofilo são constituídas por células braciiformes (5 A-C, F-H, L-M) deixando amplos espaços intercelulares (Figura 4).

No mesofilo são encontrados idioblastos contendo compostos fenólicos e idioblastos com ráfides (Figura 4 A, C, E). Em *S. brasiliensis* há menos idioblastos com ráfides que nas demais espécies. Os feixes vasculares laterais nas três espécies podem variar em tamanho (Figura 4 A, D-E), mas sempre são envolvidos por células lignificadas do tipo esclereide e fibra (Figura 5 D-E, I-J, N-O).

Nas três espécies podem ser observadas emergências espiniformes sem vascularização (Figura 6 A) que partem da nervura principal central, ou ainda das nervuras principais periféricas.

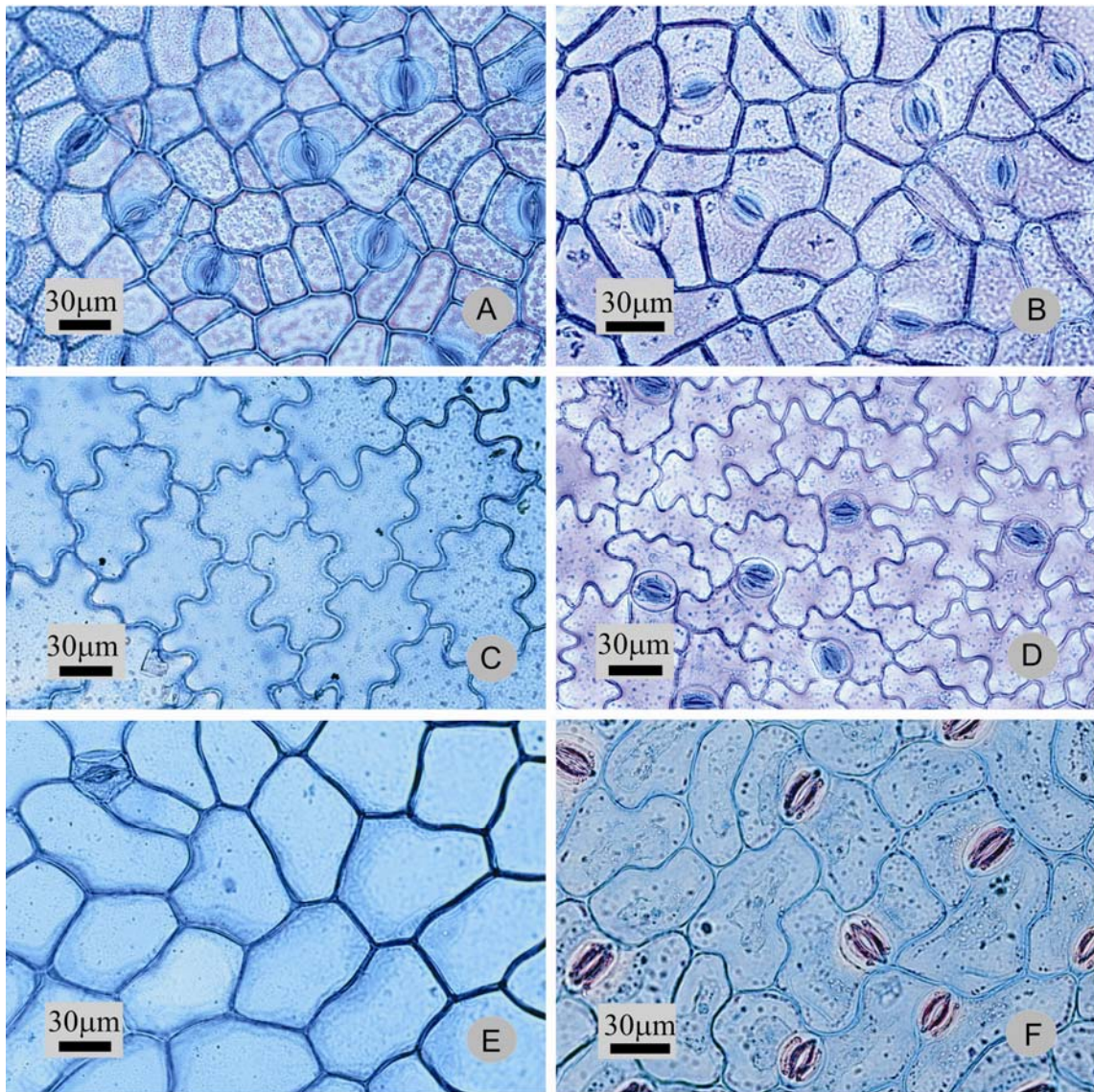


Figura 2. A-B. *Smilax brasiliensis*. A. Epiderme da face adaxial. B. Epiderme da face abaxial. C-D. *S. campestris*. C. Epiderme da face adaxial. D. Epiderme da face abaxial. E-F. *S. cissoides*. E. Epiderme da face adaxial. F. Epiderme da face abaxial.

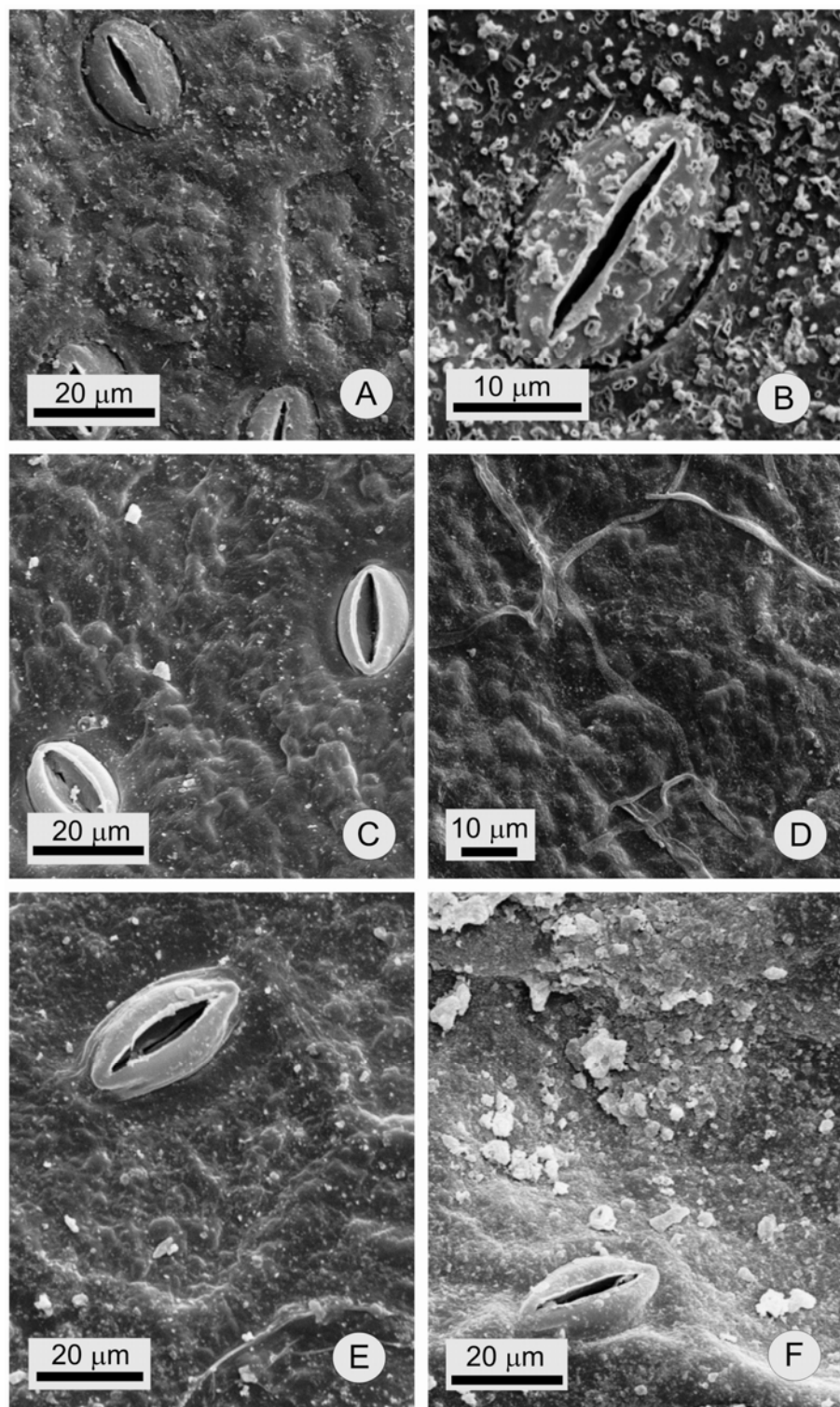


Figura 3. Eletromicrografias da superfície foliar mostrando os diferentes padrões de deposição de cera epicuticular em *Smilax brasiliensis* (A-B), em *S. campestris* (C-D) e em *S. cissooides* (E-F). A, C, E. Epiderme da face abaxial. B, D, F. Epiderme da face adaxial.

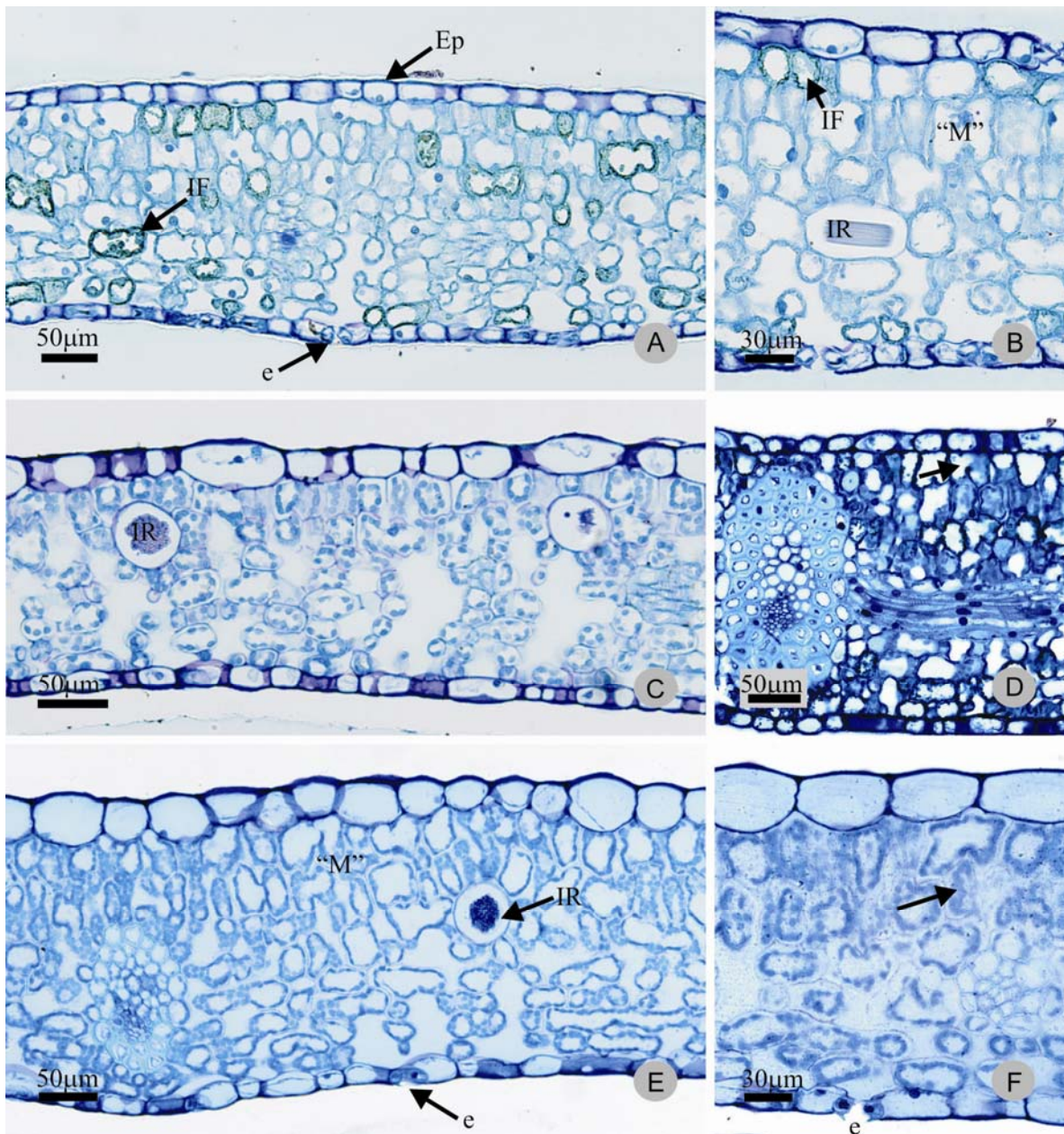


Figura 4. Secções transversais do limbo foliar. A-B. *Smilax brasiliensis*. A. Visão geral. B. Detalhe do idioblasto contendo ráfides e dos amplos espaços intercelulares. C-D. *S. campestris*. C. Visão geral. D. Detalhe do feixe vascular lateral de maior tamanho. E-F. *S. cissooides*. E. Visão geral. F. Detalhe da célula em formato de “M” (seta) e do estômato. e = estômato; Ep = epiderme; IF = idioblastos contendo compostos fenólicos; IR = idioblastos contendo ráfides; “M” = células com formato em “M”.

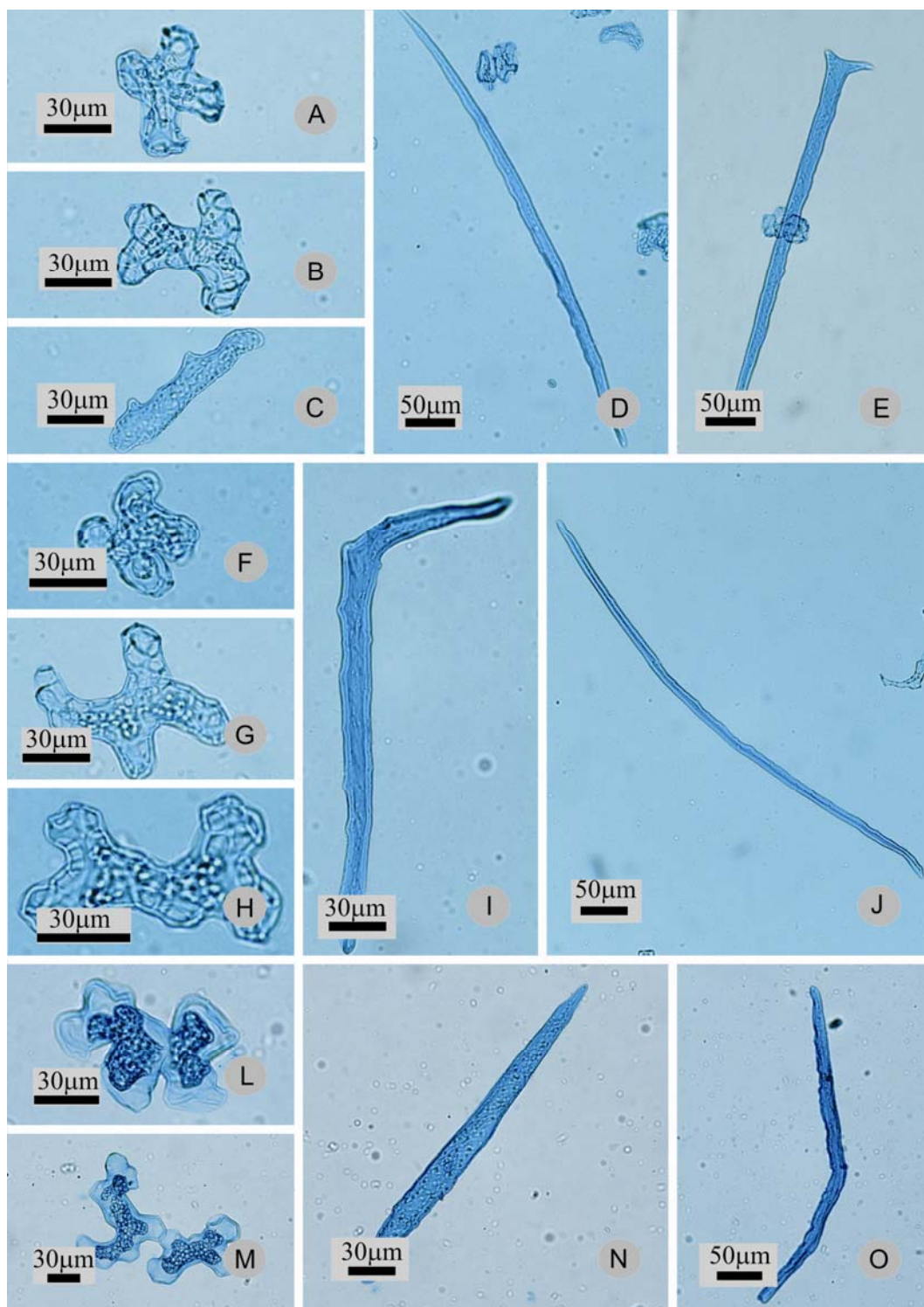


Figura 5. A-E. *Smilax brasiliensis*. A-C. Células braciformes do mesofilo dissociado. D. Fibra. E. Esclereide colunar. F-J. *S. campestris*. F-H. Células braciformes do mesofilo dissociado. I. Esclereide colunar. J. Fibra. L-O. *S. cissoides*. L-M. Células braciformes do mesofilo dissociado. N-O. Esclereides colunar (N) e fibriforme (O).

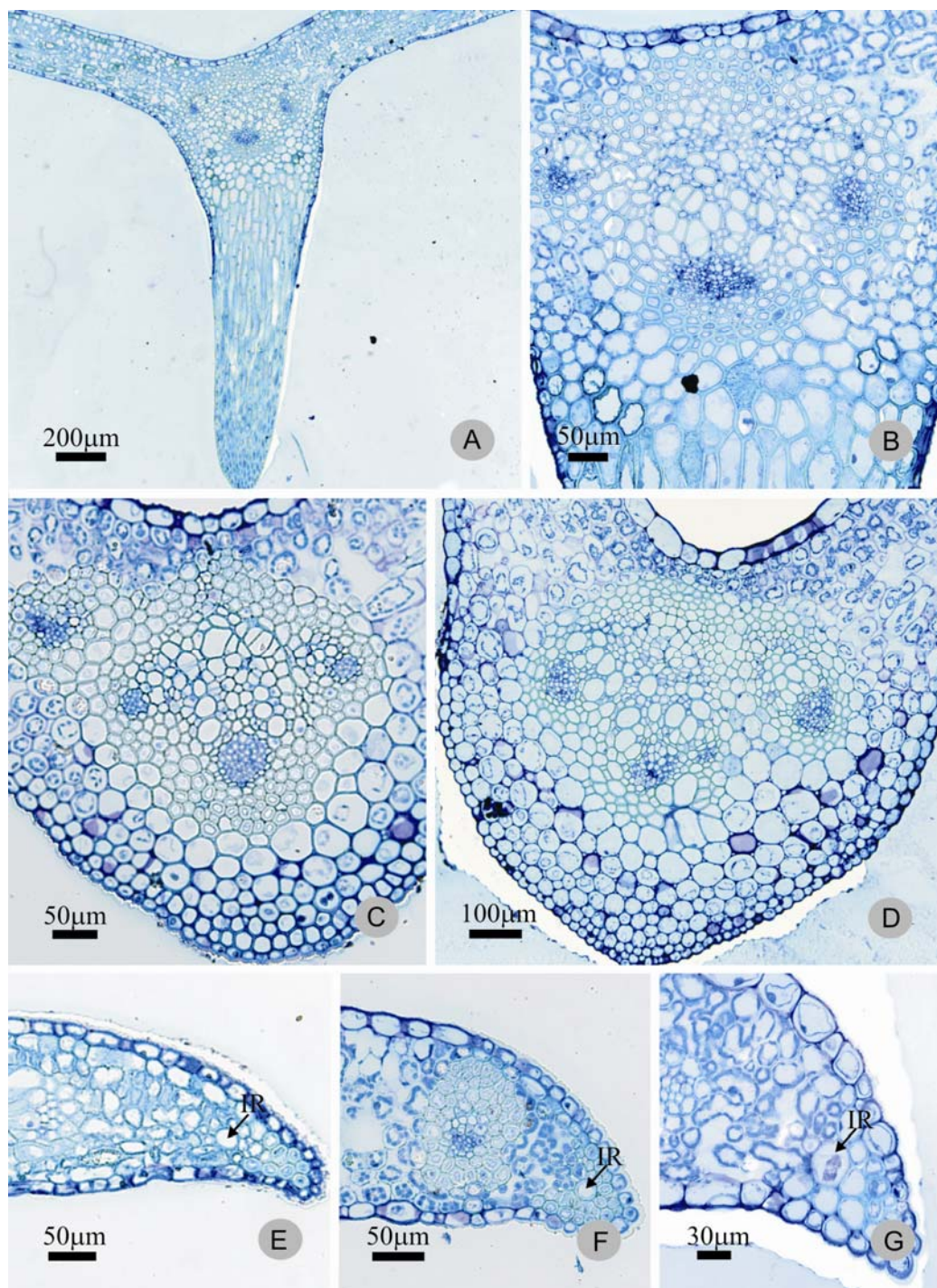


Figura 6. A-B. *Smilax brasiliensis*. Secções transversais do limbo foliar na região da nervura central. A. Visão geral. Observar a emergência não vascularizada. B. Detalhe dos três feixes vasculares individuais. C-D. Secções transversais da nervura central de *S. campestris* e de *S. cissoides*. Observar os três feixes envolvidos por uma única bainha e um feixe isolado em (C) E-G. Bordo foliar de *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides*, respectivamente. IR = Idioblasto contendo ráfides.

A nervura central de *S. brasiliensis* e *S. cissoides* possui três feixes vasculares centrais de tamanhos semelhantes (Figura 6 A, D) envolvidos individualmente por células lignificadas, enquanto em *S. campestris* há quatro feixes vasculares: três centrais envolvidos por uma única bainha de células lignificadas e um feixe menor provido de bainha própria (Figura 6C).

O bordo foliar das três espécies apresenta células esclerificadas e idioblastos contendo ráfides (Figura 6 E-G).

As características foliares que permitem separar as três espécies estudadas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Caracteres foliares que permitem separar as espécies de *Smilax* estudadas.

Caracteres / espécies	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. campestris</i>	<i>S. cissoides</i>
Número de nervuras principais salientes	3	3	5
Paredes das células epidérmicas. Vista frontal face adaxial	Retas	Sinuosas	Retas
Paredes das células epidérmicas. Vista frontal face abaxial	Retas	Sinuosas	Onduladas
Tipos de estômatos	Paracítico	Anomocítico	Anomocítico
Padrão de deposição cuticular na face adaxial	Protuberâncias crostosas	Papilosa	Grânulos diminutos
Padrão de deposição cuticular na face abaxial	Papilosa	Papilosa	Grânulos diminutos
Camadas de células em forma de “M”	3	2	2

Morfo-anatomia do caule não espessado

O caule apresenta várias estruturas espinescentes na região do entrenó, sendo raras na região nodal.

O caule na região do terceiro entrenó, na região aérea próxima ao solo e na porção subterrânea, nas três espécies estudadas, apresenta cutícula espessa, epiderme

uniestratificada com células quadrangulares e estômatos, hipoderme uniestratificada com células lignificadas (Figura 7 A-B). Podem ser encontrados idioblastos contendo ráfides na região cortical. Apenas o caule de *S. cissooides* na porção aérea próxima ao solo apresenta colênquima (Figura 7 C). Há feixes periféricos na região intermediária e subterrânea do caule não espessado.

No caule de *S. brasiliensis* observou-se a presença de grãos de amido em todas as regiões amostradas no caule (terceiro entrenó, região intermediária, e região subterrânea) ao redor dos feixes no cilindro vascular. Em *S. campestris* apenas foi observada a presença de amido na região intermediária e região subterrânea do cilindro vascular (ao redor dos feixes) e em *S. cissooides* não foram encontrados grãos de amido em nenhuma área caulinar analisada.

O cilindro vascular é um atactostelo com feixes colaterais em todas as espécies estudadas, porém ocorre variação no grau de lignificação das células dependendo da porção analisada. Nas três espécies, o caule na região do terceiro entrenó e próximo ao solo apresenta um anel esclerenquimático contínuo (Figura 8 A-B, D-E, G-H), enquanto na porção subterrânea esse anel é ausente (Figura 8 C, F). Em todas as espécies, no caule próximo ao solo e na porção subterrânea há o espessamento parietal e lignificação das células do parênquima vascular que envolve os feixes na região central do cilindro vascular (Figura 8 B-C, E-F, H-I). Na região do terceiro entrenó, não há espessamento e lignificação dessas células (Figura 8 A,D,G). Em *Smilax brasiliensis* a bainha dos feixes vasculares apresenta um número maior de camadas de células com espessamentos parietais mais pronunciados em todas as regiões caulinares analisadas (Figura 8 A-C), enquanto em *S. campestris* e *S. cissooides* a bainha é mais pronunciada apenas na porção subterrânea (Figura 8 F, I).

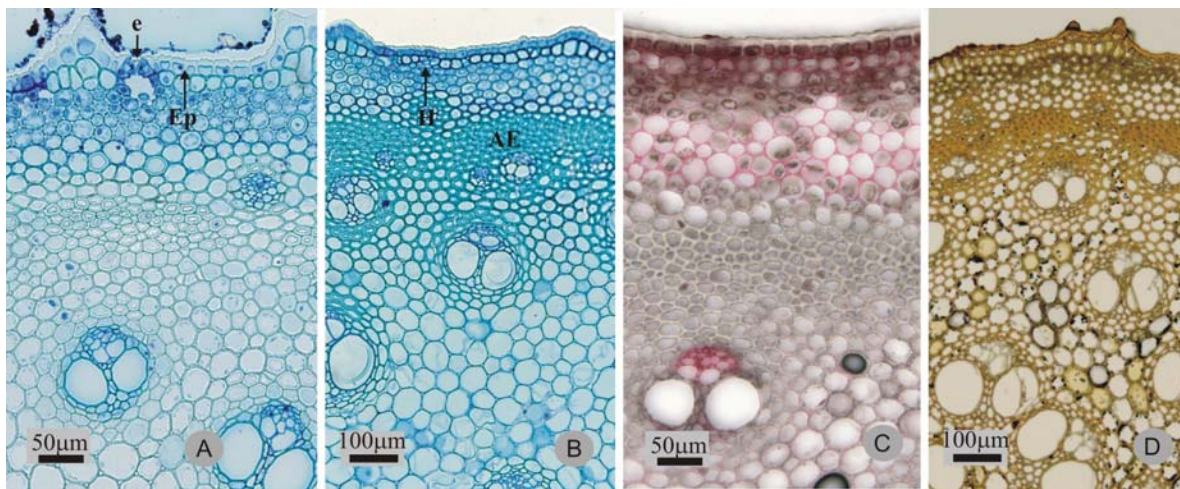


Figura 7. Secções transversais do caule aéreo na região intermediária. A. *S. campestris*. Observar a presença de estômatos acima do nível das demais células epidérmicas. B-C. *S. cissooides*. Detalhe da hipoderme (B) e presença de colênquima evidenciado pela coloração com vermelho de rutênio (C). D. *S. campestris*. Observar a presença de amido na região do cilindro vascular evidenciada pela reação com lugol. AE = anel esclerenquimático; e = estômato; Ep = epiderme; H = hipoderme.

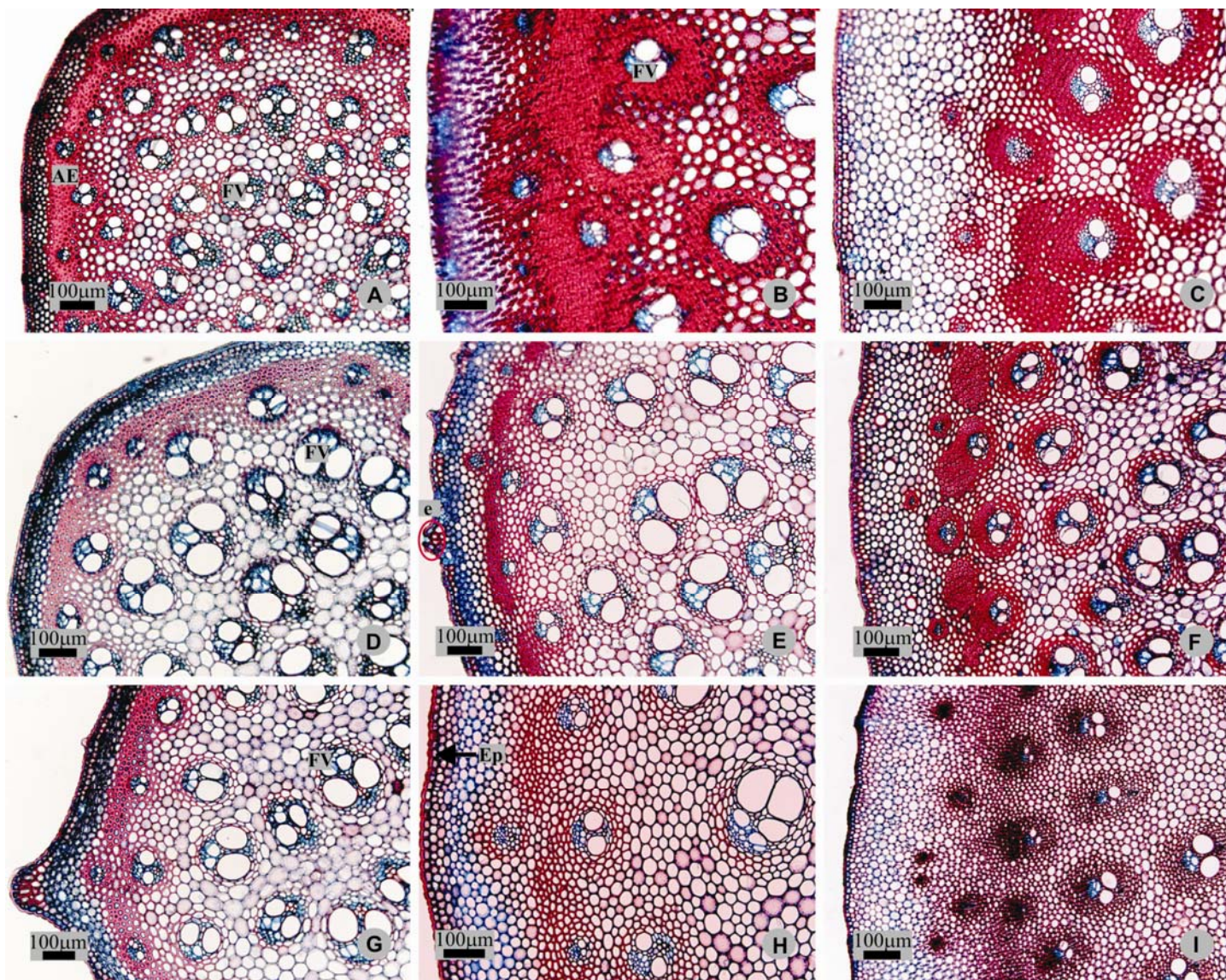


Figura 8. Secções transversais do caule aéreo na região do terceiro entrenó (A, D, G), na região do caule próximo ao solo (B, E, H) e na porção subterrânea (C, F, I) de *Smilax brasiliensis* (A-C), *S. campestris* (D-F) e *S. cissoides* (G-I). AE = anel esclerenquimático; e = estômato; Ep = epiderme; FV = feixe vascular.

4-) DISCUSSÃO

Em relação à morfologia foliar, o número de nervuras principais salientes pode ser um caráter útil na separação ou no agrupamento de espécies de *Smilax*, pois *S. cissoides* pôde ser distinta das demais aqui analisadas por apresentar cinco nervuras principais salientes, mas seria agrupada com *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* estudadas por Guimarães (2009).

Ainda a respeito da morfologia foliar, Guaglianone e Gattuso (1991) evidenciam a diversidade de formatos foliares encontrados para *S. campestris* quando coletada em diferentes ambientes. Segundo as autoras, o formato da folha variou de ovado, ovado-lanceolado, elíptico, oblongo e, às vezes, cordado e houve alta variação de comprimento e largura. Embora houvesse certa variação de formato e tamanho nas folhas das três espécies estudadas, as características aqui descritas refletem o padrão encontrado nas áreas de coleta.

Dentre as características estruturais foliares analisadas, a epiderme em vista frontal se mostrou de grande importância para a separação das três espécies, pois as paredes das células na face abaxial podiam ser retas (*S. brasiliensis*), onduladas (*S. cissoides*) ou sinuosas (*S. campestris*). Em *S. polyantha*, Martins & Appezzato-da-Glória (2006) demonstraram que as células da epiderme da face abaxial em vista frontal possuem paredes retas e as da face adaxial são sinuosas. Segundo Guimarães (2009) as paredes das células em vista frontal de *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* podem variar de retas a curvadas.

A cutícula também se mostra diferente entre as espécies, sendo que em *S. brasiliensis* a cutícula apresenta-se em cristais de cera formando protuberâncias crostosas, em *S. campestris* a cutícula é do tipo papilosa e em *S. cissoides* em formato de grânulos diminutos. Para *S. polyantha*, Martins & Appezzato-da-Glória (2006) descrevem a ornamentação cuticular de ambas as faces como escamiforme. Guimarães (2009), baseada em Guaglianone e Gattuso (1991), observou a cutícula do tipo “rugosa-microtuberculada” na superfície foliar de *S. quinquenervia*, porém esse tipo refere-se ao padrão papiloso

descrito por Metcalfe e Chalk (1979), aqui adotado para *S. campestris*. Guimarães (2009) observou cutícula estriada na superfície foliar de *S. subsessiliflora*.

A ocorrência dos estômatos pode variar entre as espécies de *Smilax* podendo também ser um caráter útil na diagnose. Guaglianone e Gattuso (1991) classificam como anfiestomáticas as folhas de *S. fluminensis* e *S. assumptionis* e hipoestomáticas as folhas de *S. cognata*, *S. pilcomayensis*, e *S. campestris* (como aqui observado). No presente estudo as folhas de *S. brasiliensis* e *S. cissoides* foram classificadas como anfihipoestomática.

Yates & Duncan (1970), ao estudarem a anatomia foliar de *S. auriculata*, *S. bonanox*, *S. glauca*, *S. laurifolia*, *S. rotundifolia*, *S. smallii*, *S. tamnoides* e *S. walteri*, descrevem o mesofilo como dorsiventral. Gattuso (1995) também usa a classificação de dorsiventral para o tipo de mesofilo de *S. campestris*. Em *Smilax polyantha* (Martins & Appezzato-da-Glória 2006), adotou-se mesofilo tendendo a dorsiventral, pois na folha adulta as células do parênquima paliçádico são lobadas assemelhando-se àquelas do parênquima lacunoso e diferindo do parênquima paliçádico típico cujas células são alongadas e dispostas em fileiras. No presente estudo as três espécies de *Smilax* apresentaram o mesmo tipo de mesofilo de *Smilax polyantha*. Gattuso (1995) utiliza a nomenclatura de dorsiventral para *S. campestris*. Guimarães (2009) também descreve o mesofilo de *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* como dorsiventral. Guaglianone e Gattuso (1991) diferenciam as espécies *S. fluminensis* e *S. pilcomayensis*, que apresentam mesofilo homogêneo, das espécies *S. cognata* e *S. assumptionis* que apresentam mesofilo heterogêneo.

Nenhuma das três espécies estudadas apresentou esclereides do tipo osteosclereides como foram encontrados em *Smilax polyantha* (Martins & Appezzato-da-Glória 2006). Os demais tipos de esclereides encontrados em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* também podem ser observados em *S. polyantha*.

O feixe vascular do tipo colateral encontrado nas três espécies se repete em *S. spicata*, *S. fluminensis* (Marquete & Pontes 1994), *S. polyantha* (Martins & Appezzato-da-Glória 2006) e em *S. campestris* (Gattuso 1995). *S. brasiliensis* e *S. cissoides*, aqui analisadas, assim como *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* (Guimarães 2009) e *S. fluminensis*, *S. rufescens* e *S. spicata* (Marquete e Pontes 1994) apresentam o sistema vascular da nervura central integrado por feixes colaterais, sendo que cada feixe é

acompanhado de uma bainha esclerenquimática. No entanto, no caso da espécie estudada *S. campestris* observou-se uma bainha única em torno dos feixes vasculares da nervura central da mesma maneira que Guaglianone e Gattuso (1991) analisando *S. cognata* e *S. campestris*.

As emergências espiniformes presentes nas folhas e no entrenó do caule aéreo observadas nas três espécies não podem ser classificadas como acúleos já que não se tratam de anexos epidérmicos e possuem células parenquimáticas em seu interior. Também não se tratam de espinhos já que não existe vascularização na projeção. Segundo Guimarães (2009), há emergências espiniformes tanto na região do nó como do entrenó dos ramos caulinares aéreos, e tais emergências são vascularizadas em *S. quinquenervia* e não vascularizadas em *S. subsessiliflora*.

Nas espécies estudadas por Yates & Duncan (1970), Marquete & Pontes (1994) e Martins & Appezzato-da-Glória (2006), o bordo foliar contém células esclerificadas, da mesma forma que foi encontrado em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides*.

Com respeito ao caule, segundo Guimarães (2009) foi detectado colênquima na região cortical do caule de *S. quinquenervia* na região do terceiro entrenó, e no presente estudo detectou-se a presença desse tipo de tecido no córtex da região intermediária do ramo caulinar de *S. cissoides*.

Caponetti & Quimby (1956) e Van Fleet (1942) afirmam que a endoderme no caule não pode ser diferenciada nas porções mais jovens do caule, e só se torna espessada e diferenciada nas porções próximas ao solo. No presente estudo, não foi possível diferenciar morfológicamente a endoderme nem na porção mais jovem, nem próximo ao solo nem na porção subterrânea do caule.

Foram observados feixes periféricos na região cortical das três espécies estudadas na região intermediária e subterrânea do ramo caulinar. Guimarães (2009) trata tais feixes como feixes vasculares corticais, e são observados tanto para *S. quinquenervia* quanto para *S. subsessiliflora* (ocorrência mais rara) nas porções do ramo caulinar aéreo. Guaglianone e Gattuso (1991) analisando *S. fluminensis*, *S. pilcomayensis*, *S. cognata*, *S. assumptionis* e *S. campestris* também observam séries (uma ou duas) de feixes vasculares periféricos externamente ao anel esclerenquimático do caule aéreo das espécies estudadas.

Nas três espécies de *Smilax* aqui estudadas e nas espécies analisadas por Caponetti & Quimby (1956) e Ervin & Evert (1967), o caule aéreo possui a porção mais externa do cilindro vascular na forma de um anel esclerificado e na porção interna os feixes possuem uma bainha individual de esclerênquima e estão dispersos no parênquima. No entanto, como já observado em *S. polyantha* (Martins & Appezzato-da-Glória 2006), o grau de lignificação das células que circundam os feixes vasculares no cilindro vascular varia de acordo com a região do caule analisada. No que se refere à região do terceiro entrenó, em *Smilax polyantha* essa região não se encontra lignificada (Martins & Appezzato-da-Glória 2006), enquanto, nas três espécies estudadas, essa região e também a região do caule próxima ao solo apresentam um anel esclerificado envolvendo todo o cilindro vascular.

Pelo exposto, a morfo-anatomia foliar: número de nervuras principais salientes, epiderme em vista frontal, ocorrência de estômatos e de emergências vascularizadas ou não, tipo de mesofilo e arranjo dos feixes colaterais na nervura central; e caulinar: ocorrência de feixes periféricos, anel esclerenquimático e de emergências vascularizadas ou não, associadas às outras características vegetativas, poderá auxiliar na diagnose de espécies de *Smilax* e no controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de fitoterápicos atendendo a recomendação da Resolução RDC n° 48, da Anvisa.

5-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreata, R. H. P. (1997) Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Pesquisas–Botânica, 47: 7-244.
- Ash, A., Ellis, B., Hickey, L.J., Johnson, K., Wilf, P. & Wing, S. (1999) Manual of leaf Architecture - morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms by Leaf Architecture Working Group. Smithsonian Institution, Washington.
- Berlyn G.P., Miksche J.P. (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press, Ames.

- Brasil. (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. In: D.O.U. – Diário Oficial da União. Março de 2004.
- Bukatsch, F. (1972) Bermerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos, 61: 255.
- Burger, L.M., Richter, H.G. (1991) Anatomia da Madeira. Nobel, São Paulo.
- Caponetti, J.D., Quimby, M.W. (1956) The comparative anatomy of certain species of *Smilax*. Journal of the American Pharmaceutical Association, 45:691-696.
- Demo, A.; Petrakis, C.; Kefalas, P. & Boskou, D. (1998) Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. Food Research International, 31: 351-354.
- Dop, P., Gautié, A. (1928) Manuel de technique botanique. Lamarre, Paris.
- Ervin, E.L., Evert, R.F. (1967) Aspects of sieve element ontogeny and structure in *Smilax rotundifolia*. Botanical Gazette, 128: 138-144.
- Gattuso, S.J. (1995) Exomorfología y anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). Acta Farmacéutica Bonaerense, 14: 181-190.
- Guaglianone, E. R., Gattuso, S. (1991) Estudios taxonômicos sobre el genero *Smilax* (Smilacaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 27: 105-129.
- Guimarães, A. R. (2009). Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax quinquenervia* Vell. e *S. subsessiliflora* Duham. (Smilacaceae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional. 70p.
- Jensen, W. A. (1962) Botanical histochemistry: principle and practice. San Francisco, W. H. Freeman.
- Jiang, J. & Xu, Q. (2003). Immunomodulatory activity of aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. Journal of Ethnopharmacology, 85: 53-59.

- Johansen, D.A. (1940) Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. (2009) Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético. Artmed, Porto Alegre.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*, 27: 137-138.
- Mandarim-de-Lacerda, A.F., Andreata, R.H.P., Peres-Neto, P.R. (1992) Ensaio metodológico de avaliação biométrica em folhas adultas de *Smilax rufescens* (Smilacaceae). *Pesquisas – Botânica*, 43: 199-221.
- Mandarim-de-Lacerda, A.F., Andreata, R.H.P. (1994/1995) Estudo comparado entre folhas adultas de *Smilax* L. (Smilacaceae - Liliopsida) do sul do Brasil. *Pesquisas – Botânica*, 45: 77-114.
- Marquete, O., Pontes, R.G. (1994) Estudo anatômico foliar comparativo de *Smilax spicata* Vell., *Smilax rufescens* Griseb. e *Smilax fluminensis* Steudel. *Revista Brasileira de Biologia*, 54: 413-426.
- Martins, A.R., Appezzato-da-Glória, B. (2006) Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 555-567.
- Metcalf, C.R., Chalk, L. (1979) *Anatomy of the Dicotyledons*. Editora Clarendon Press, Oxford.
- Palhares, D., Silveira, C.E.S., Zaidan, L.B.P., Pereira, L.A.R. (2009) Leaf anatomy of *Smilax goyazana* (Smilacaceae). *Acta Botanica Hungarica*, 51: 115-127.
- Sakai, W.S. (1973) Simple Method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology*, 48: 247-248.
- Strasburger, E. (1913) *Handbook of practical botany*. (Transl. W. Hillhouse). George Allen & Company Ltda., London.
- Van Fleet, D.S. (1942) The development and distribution of the endodermis and an associated oxidase system in monocotyledonous plants. *American Journal of Botany*, 29: 1-15.

Yates, I.E., Duncan, W.H. (1970) Comparative studies of *Smilax*, section *Smilax*, of the southeastern United States. *Rhodora*, 72: 289-312.

Capítulo 4

Germinação de sementes e morfologia das plântulas de espécies de Smilax L. (Smilacaceae)

Germinação de sementes e morfologia das plântulas de espécies de *Smilax* L. (Smilacaceae)

Resumo: As espécies do gênero *Smilax*, conhecidas como “salsaparrilha”, são amplamente distribuídas no Brasil e utilizadas na medicina popular por apresentarem propriedades anti-reumáticas atribuídas ao chá de suas raízes e rizóforo. O objetivo de nosso estudo foi fornecer informações sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de *Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. campestris* Grisebach, *S. cissoides* Martius ex Grisebach e *S. polyantha* Grisebach. Para tanto, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado utilizando-se dois tratamentos (temperaturas: 30°C e 20-30°C) na presença e ausência de luz. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições. Para cada repetição foi empregada uma caixa de germinação de medidas 11 cm de lado por 3 cm de altura, com tampa, onde foram adicionados 292g de areia esterilizada, contendo 45mL de água (60% do valor retido) e 25 sementes. Utilizou-se análise de variância baseado em teste de aleatorização (distância Euclidiana, 10000 iterações) para testar os valores obtidos nas taxas de germinação para cada espécie. A ausência ou presença de luz, segundo as análises estatísticas, apenas foi um fator significativo para a espécie *S. brasiliensis*, que apresentou taxa de germinação de 55% na temperatura 20-30°C associada ao escuro. *S. cissoides* apresentou bons resultados de germinação (66 e 78 %) independente do tratamento utilizado. Para *S. polyantha* também não foram encontradas diferenças significativas entre as temperaturas e regimes de luz testados, porém a taxa de germinação foi baixa (19 a 24%). Para *S. campestris* houve diferença estatística entre as taxas de germinação entre os tratamentos de temperatura (68-71% para 30°C e 76-82% para 20-30°C), mas não entre claro e escuro. Com respeito ao desenvolvimento das plântulas das espécies estudadas, as folhas completamente expandidas em plantas de um ano apresentavam características distintas entre as espécies estudadas. Em *S. brasiliensis*, as folhas apresentavam formato oval, consistência coriácea, três nervuras principais salientes e estruturas espinescentes apenas na nervura principal central na face abaxial. Em *S. campestris* as folhas apresentavam formato oblongo, consistência coriácea e estruturas espinescentes ao longo da margem e da nervura central. Em *S. cissoides*, as folhas apresentavam formato oval-elíptico, consistência membranácea, três nervuras principais salientes com estruturas espinescentes na face abaxial. Em *S. polyantha*, as folhas apresentam formato oval-elíptico, consistência coriácea, três nervuras principais salientes, sendo que as nervuras secundárias eram translúcidas ao serem examinadas contra a luz e ausência de estruturas espinescentes.

1-) INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Smilax*, conhecidas como “salsaparrilha”, são utilizadas na medicina popular por apresentarem propriedades anti-reumáticas atribuídas ao chá de suas raízes e rizóforos. Tais espécies são amplamente distribuídas no Brasil e sua exploração comercial é realizada a partir do extrativismo das espécies nativas (Andreato 1997). Não há registro na literatura de estudos que direcionem informações de germinação para o uso sustentável dessas espécies nem mesmo foram encontrados dados de quantas plantas são retiradas da natureza nem o local de onde tais plantas são coletadas.

Estudos de germinação de sementes são importantes para solucionar problemas taxonômicos e filogenéticos, para auxiliar no entendimento da morfologia através da ontogenia, para reconhecer espécies no campo (Andreato & Pereira 1990, Oliveira 2001).

Os autores que já realizaram estudos com germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas do gênero *Smilax* foram Holm (1890), Andreato (1980), Pogge & Bearce (1989), Andreato & Pereira (1990), Andreato & Menezes (1999), Rosa & Ferreira (1999), D’Antuono & Lovato (2003) e Santos et al. (2003). Nesses estudos foram testados diferentes tratamentos e as respostas foram muito divergentes para as espécies analisadas em relação a regime de luz, quebra de dormência e porcentagem de germinação.

Considerando a importância de estudos de propagação e comportamento germinativo de espécies medicinais nativas, o objetivo desse estudo foi fornecer informações sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de *Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. campestris* Grisebach, *S. cissoides* Martius ex Grisebach e *S. polyantha* Grisebach.

2-) MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos frutos

Os frutos maduros foram coletados aleatoriamente buscando-se um maior número possível de indivíduos dentro da população e garantindo dessa forma a variabilidade genética dentro de cada espécie.

Foram utilizados lotes de sementes de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* obtidos segundo as informações da Tabela 1.

Tabela 1. Local e data de coleta das sementes de *Smilax*.

Espécies	Local de coleta	Data de coleta das sementes
<i>S. brasiliensis</i>	Itapagipe - MG	Abril de 2007
<i>S. campestris</i>	Caçapava do Sul – RS	Maio de 2007
<i>S. cissoides</i>	Feira de Santana-BA	Junho e Julho de 2007
<i>S. polyantha</i>	Pratânia-SP e Mogi-Guaçu-SP	Abril e Maio de 2006

Experimento de germinação

O experimento foi instalado em 27 de novembro de 2007 e desinstalado em 26 de junho de 2008. As sementes que não germinaram no final do experimento foram submetidas ao teste do Tetrazólio (Regras para Análise de Sementes, Brasil, 1992) para verificação da viabilidade das mesmas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado utilizando-se dois tratamentos (temperaturas: 30°C e 20-30°C) na presença (fotoperíodo de 8 horas de luz) e ausência total de luz. As temperaturas foram selecionadas a partir de experimentos descritos no capítulo 1 dessa Tese. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições. Para cada repetição foi empregada uma caixa de germinação de medidas 11 cm de lado por 3 cm de altura, com tampa, no qual foram adicionados 292g de areia esterilizada, contendo

45mL de água (60% do valor retido) e 25 sementes. Utilizou-se análise de variância baseada em teste de aleatorização (distância Euclidiana, 10.000 iterações) para testar os valores obtidos nas taxas de germinação para cada espécie.

Para *S. polyantha* foram utilizados dois lotes de sementes (provenientes de Pratânia-SP e Mogi-Guaçu-SP) cada um com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes para esta espécie.

No final do experimento foi calculado o IVG (Índice de Velocidade de Germinação) segundo Maguire (1962), que calcula o número médio de plântulas normais germinadas por dia ou em semanas como realizado nesse estudo.

Verificação da viabilidade de *S. polyantha* após armazenamento

Um novo experimento utilizando a mesma metodologia descrita acima foi realizado com *S. polyantha* visando testar o armazenamento das sementes após três anos de acondicionamento em sacos de papel mantidos em sala a temperatura média 25°C. Para tanto foram utilizados dois lotes de sementes (provenientes de Pratânia-SP e Mogi-Guaçu-SP) cada um com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes.

Análise da morfologia das plântulas

Dez indivíduos germinados de cada espécie foram analisados e fotografados em câmera digital nos seguintes estágios: plântulas recém-germinadas, plântulas com o primeiro eófilo expandido, plantas jovens com cinco eófilos e plantas com um ano de idade. Os parâmetros observados foram: o número de catafilos hialinos formados no eixo primário (termo adotado por Andreatta & Pereira 1990), as características da bainha cotiledonar, o número e o formato das folhas juvenis, a ramificação caulinar aérea, a formação do caule subterrâneo e a distinção entre a raiz primária e as raízes adventícias e o estabelecimento dessas últimas.

3-) RESULTADOS

O experimento de germinação de sementes foi acompanhado semanalmente desde a instalação do experimento em dezembro de 2007 até junho de 2008, totalizando 30 semanas. A germinação foi constatada a partir da emissão da parte aérea, pois as sementes foram germinadas em caixas contendo areia.

Para a espécie *S. brasiliensis* (Tabela 2 e Figura 1) houve diferença significativa entre as temperaturas testadas e para ausência e presença de luminosidade. Houve interação entre o fator temperatura e luminosidade, ou seja, o tratamento 20-30°C no escuro diferiu significativamente de todos os outros tratamentos e apresentou a maior porcentagem de germinação (55%).

Para *S. campestris* houve diferença significativa entre os tratamentos de temperatura, 68 e 71% de germinação para 30°C e 82 e 76% de germinação para 20-30°C, mas não entre as condições de claro e escuro (Tabela 2 e Figura 1).

Tabela 2. Porcentagem média de sementes germinadas de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*, sob duas condições de luminosidade e duas temperaturas, no período de dezembro 2007 a junho de 2008, utilizando-se análise de variância baseado em teste de aleatorização (distância Euclidiana, 10000 iterações) e IVG (Índice de Velocidade de Germinação).

Espécies	Claro				Escuro			
	30°C	IVG	20-30°C	IVG	30°C	IVG	20-30°C	IVG
<i>S. brasiliensis</i>	8	0,23	16	0,4	3	0,09	55	1,57
<i>S. campestris</i>	68	3,5	82	2,47	71	4,22	76	2,45
<i>S. cissoides</i>	75	1,86	78	1,8	71	2,11	66	1,63
<i>S. polyantha</i>	22	0,55	24	0,5	21	0,52	19	0,48

S. cissoides apresentou bons resultados de germinação com porcentagens entre 66 e 78% independente do tratamento utilizado, enquanto *S. polyantha* apresentou valores entre 19 e 24% (Tabela 2 e Figura 1). Em ambas espécies não houve diferença significativa entre os tratamentos de temperatura e nem entre as condições de claro e escuro.

O início da germinação de *S. campestris* foi observado a partir da terceira semana de experimento (Anexo I) e o IVG (Índice de Velocidade de Germinação) para esta espécie foi o mais alto (2,45 a 4,22). *S. cissoides* iniciou o período de germinação na quarta semana do experimento e seu IVG variou entre 1,63 a 1,86. Já as espécies *S. brasiliensis* e *S. polyantha* iniciaram a germinação na quinta semana do experimento e obtiveram os menores valores de IVG que ficaram por volta de 0,5 para *S. polyantha* e variaram entre 0,09 a 1,57 para *S. brasiliensis*.

Os dados referentes à viabilidade das sementes encontram-se na Tabela 3. Foram consideradas sementes viáveis aquelas que apresentaram coloração rósea (Figuras 2A-B) após a imersão em solução de Tetrazólio (BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992) e sementes inviáveis atacadas por fungos aquelas cujo embrião havia sido danificado pelo fungo (Figura 2C).

Ao analisar a viabilidade das sementes de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* pelo teste de Tetrazólio foi possível verificar que aproximadamente 50% das sementes de *S. polyantha* apresentavam fungos no final do experimento (Tabela 3). Para *S. campestris* e *S. cissoides* a porcentagem de sementes com fungos foi de cerca de 20%. Para *S. brasiliensis* essa porcentagem variou de 5% para o tratamento 20-30°C (escuro) a 50% para o tratamento 20-30°C (claro).

S. campestris e *S. cissoides* apresentaram taxa de sementes viáveis no final do experimento entre 2-10% (sementes que não germinaram nem apresentaram fungos), *S. brasiliensis* entre 23-44% e *S. polyantha* entre 24-30%.

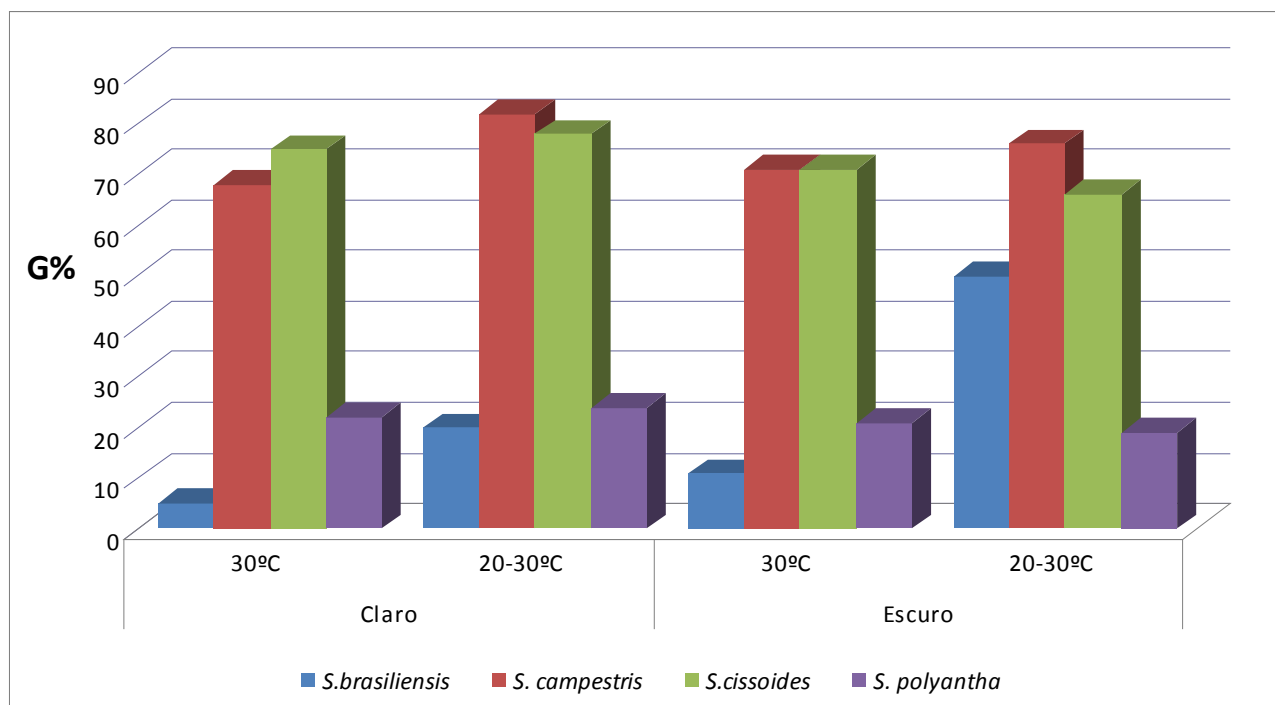


Figura 1. Porcentagem de sementes germinadas (G%) de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*, sob duas condições de luminosidade e duas temperaturas, no período de novembro 2007 a junho de 2008.

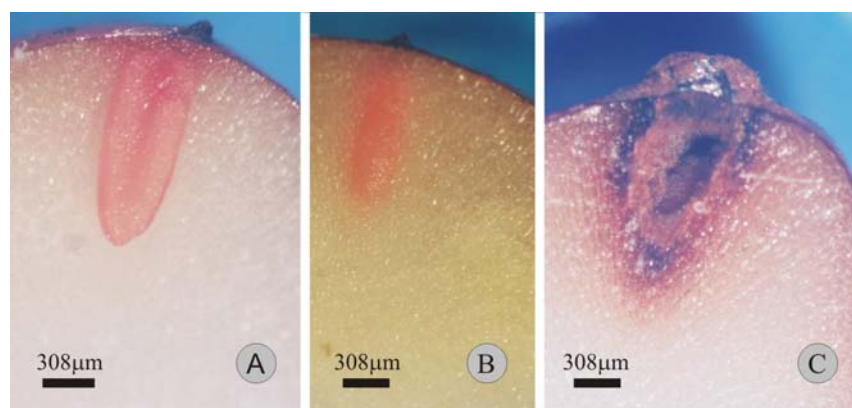


Figura 2. Sementes de *Smilax polyantha* submetidas ao Teste de Tetrazólio para verificação da viabilidade. A-B. Sementes viáveis (embrião com coloração rósea). C. Semente inviável atacada por fungos.

Tabela 3. Viabilidade de sementes verificada a partir do Teste do Tetrazólio após a desinstalação dos experimentos de germinação de sementes de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*. (V) Número de sementes viáveis não germinadas; (S/E) Número de sementes sem embrião ou com embrião que não apresenta coloração rósea após o teste; (FU) Número de sementes atacadas por fungos; (Ge) Número de sementes germinadas.

Espécies	Claro								Escuro							
	30°C				20-30°C				30°C				20-30°C			
	V	S/E	FU	Ge	V	S/E	FU	Ge	V	S/E	FU	Ge	V	S/E	FU	Ge
<i>S. brasiliensis</i>	23	29	40	8	30	0	54	16	44	26	27	3	34	11	0	55
<i>S. campestris</i>	10	1	21	68	8	0	10	82	4	4	21	71	3	0	21	76
<i>S. cissoides</i>	6	0	19	75	2	0	20	78	10	0	19	71	7	0	27	66
<i>S. polyantha</i>	57	1	98	44	56	9	87	48	60	4	94	42	49	4	109	38

Viabilidade de *S. polyantha* após armazenamento

O experimento teve duração de 60 dias. Não houve germinação das sementes nas temperaturas 30°C e 20-30°C (claro e escuro). Através do Teste de Tetrazólio verificou-se que das 400 sementes empregadas no experimento apenas nove continuavam viáveis, 175 apresentavam fungos e 216 não apresentaram embrião róseo, ou seja, não apresentavam mais viabilidade.

Análise da morfologia das plântulas

O eixo primário era constituído por três (raramente quatro) catafilos hialinos antes da formação do primeiro eofilo a qual ocorria após cerca de 15 a 30 dias a partir da germinação. A bainha cotiledonar inicialmente de cor amarelada e de consistência tenra (Figura 3 A, C) envolvia completamente o epicótilo diminuto (dados ilustrados no capítulo 1). À medida que a plântula se desenvolvia a bainha tornava-se amarronzada e paleácea. A morfologia do primeiro eofilo não diferiu entre as espécies analisadas. O formato era oval, ápice convexo, margem lisa, base arredondada, acródroma basal e três nervuras principais, consistência membranácea (Figura 3 B, D). Esse primeiro eofilo já começava a secar quando a planta apresentava a quinta folha juvenil e não era visível na planta com um ano (Figuras 3 E e 4).

As folhas completamente expandidas em plantas de um ano apresentavam características distintas entre as espécies estudadas. Em *S. brasiliensis* as folhas de maior comprimento apresentavam cerca de 8 centímetros e largura de aproximadamente 7 cm, formato oval, consistência coriácea, três nervuras principais salientes sendo a central provida de estruturas espinescentes na face abaxial (Figura 3 F-G). Em *S. campestris* as folhas de maior comprimento apresentavam cerca de 4,5 centímetros e largura de aproximadamente 2 cm, formato oblongo-elíptica, consistência coriácea e apenas a nervura principal central saliente com estruturas espinescentes na face abaxial. Também havia estruturas espinescentes ao longo da margem (Figura 3 H-I). Em *S. cissoides*, as folhas de maior comprimento apresentavam cerca de 7 centímetros e largura de aproximadamente 4 centímetros; a folha apresentava formato oval-elíptica, consistência membranácea e três nervuras principais salientes com estruturas espinescentes na face abaxial (Figura 3 J-K). Em *S. polyantha* as folhas de maior comprimento apresentavam cerca de 7 centímetros e largura de aproximadamente 4,5 cm. A folha apresentava formato oval-elíptica, consistência coriácea, três nervuras principais salientes e ausência de estruturas espinescentes. Na margem de *S. polyantha* havia uma nervura muito próxima translúcida ao ser examinada contra luz; as nervuras secundárias também eram translúcidas, característica não observada nas demais espécies (Figura 3 L-M).

A ramificação caulinar aérea iniciou-se após a formação das cinco primeiras folhas juvenis (5 meses após a germinação).

Com um ano de idade os indivíduos de *S. polyantha* e *S. cissoides* apresentavam cerca de 5 ramos aéreos, enquanto *S. campestris* e *S. brasiliensis* apresentavam cerca de 7 (Figura 4). Em *S. cissoides* e *S. campestris* o comprimento dos ramos podia alcançar valores superiores a 1 metro, enquanto em *S. polyantha* e em *S. brasiliensis* não chegavam a 0,5 metro (30 e 40 cm, respectivamente). A espessura média dos ramos foi semelhante entre todas as espécies e variou entre 1 e 2 mm (Figura 4). Todas as espécies apresentavam estruturas espinescentes no entrenó, porém com maior ocorrência nas espécies *S. campestris* e *S. cissoides* o que dificultava o manuseio das plantas na casa de vegetação.



Figura 3. A-B, H-I. *Smilax campestris*. C-D, J-K. *Smilax cissooides*. E, L-M. *Smilax polyantha*. F-G. *Smilax brasiliensis*. A,C. Plântula recém-germinada. B, D. Plântula com a presença do eofilo. E. Plântula com a presença do quarto protofilo. F-M. Folhas das plantas jovens de *Smilax* com um ano de desenvolvimento. Escala: A-E. 0,5cm cada quadrado, F, J, L. 2cm. G, H, K, M. 1 cm, I. 0,5cm.

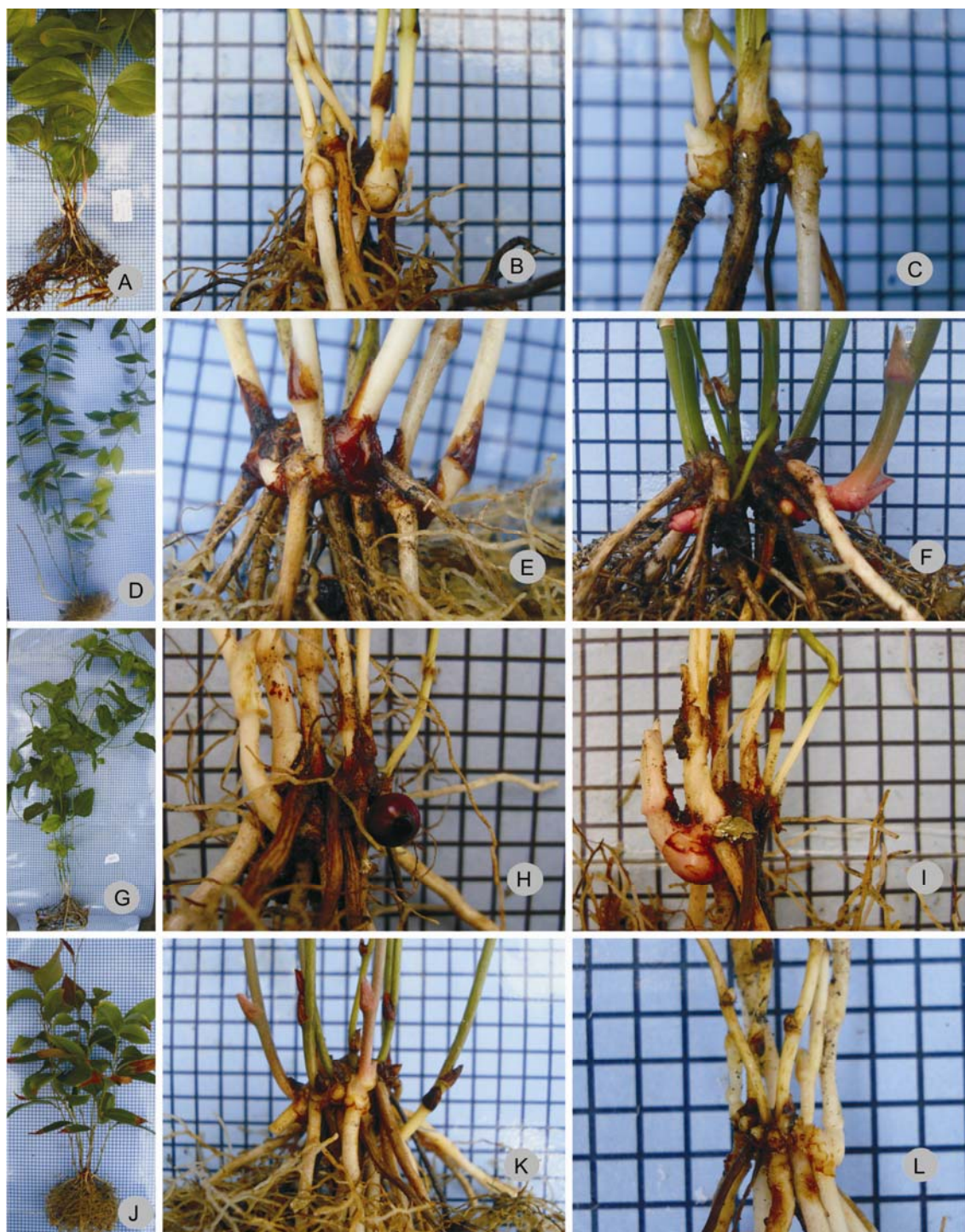


Figura 4. A-C. *Smilax brasiliensis*. D-F. *Smilax campestris*. G-I. *Smilax cissooides*. J-L. *Smilax polyantha*. A, D ,G, J. Visão geral da planta jovem com um ano. B-C, E-F, H-I, K-L. Detalhe do desenvolvimento dos novos ramos a partir das gemas axilares subterrâneas. Escala: 0,5cm cada quadrado.

É importante salientar que cada ramo aéreo emitido teve origem a partir de uma gema axilar intumescida presente na base do ramo aéreo anterior conforme detalhado no capítulo 1. Portanto, o sistema subterrâneo iniciou-se em plantas a partir do quinto eófilo sendo possível verificar nas plantas com um ano de idade os diminutos artículos das fases iniciais do rizóforo (Figura 4).

Em *S. cissoides* e em *S. brasiliensis* a raiz primária já não era distinta das raízes adventícias em estágios muito iniciais do desenvolvimento das plântulas. A raiz primária é apenas diferenciada em *S. polyantha* até o aparecimento do primeiro eófilo e para *S. campestris* a raiz primária permanece diferenciada até o aparecimento do quinto eófilo. Após um ano, todas as espécies apresentavam sistema radicular adventício muito desenvolvido composto de raízes brancas e marrons (Figuras 3 e 4).

Chave de identificação para plantas de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* com ano de desenvolvimento

Quanto ao número de nervuras principais:

- Uma nervura principal saliente
 - Formato oblongo e estruturas espinescentes na nervura principal e na margem foliar *S. campestris*
- Três nervuras principais salientes
 - Formato oval e estruturas espinescentes apenas na nervura principal central *S. brasiliensis*
 - Formato elíptico e estruturas espinescentes nas três nervuras salientes *S. cissoides*
 - Formato elíptico, estruturas espinescentes ausentes e nervuras secundárias e margem foliar translúcidas *S. polyantha*

4-) DISCUSSÃO

O intervalo para o início da germinação, bem como a porcentagem de germinação são fatores que podem estar relacionados ao tempo que as sementes demandam para a maturação do embrião, à ausência e presença de luz e à escarificação (Andreatta & Pereira 1990). Segundo Rosa & Ferreira (1999), a maior taxa de germinação e o menor período para o início de germinação foram verificados na ausência de luz. Pogge & Bearce (1989) atribuem ao aumento na intensidade de luz como fator que pode acentuar a porcentagem de germinação e reduzir o tempo para início da germinação.

Com relação aos nossos dados comparativos entre a germinação na presença ou ausência de luz observamos que este foi um fator influenciador apenas para *S. brasiliensis* segundo as análises estatísticas.

Após a realização de vários ensaios testando diferentes condições de luminosidade para a germinação de sementes de duas espécies de *Smilax*, Pogge & Bearce (1989) observaram que a espécie ocorrente em áreas abertas (*S. glauca*) requeria maior intensidade de luz para a germinação do que *S. rotundifolia* que ocorre em ambientes mais sombreados. Segundo os autores, a luz parece ser uma exigência para germinação pelo menos em *S. rotundifolia*. Tal correlação não foi observada no presente estudo, pois todas as espécies germinaram na presença e na ausência de luz.

S. cissoides apresenta bons resultados de germinação independente do tratamento utilizado. Trata-se de uma espécie muito observada em áreas antropizadas onde ocorre variação de temperatura entre dia e noite, e também variação de luz. Tal espécie parece obter sucesso nessas áreas, pois não se apresenta sensível a mudanças de temperatura e luminosidade.

Para *S. polyantha* também não há diferença entre tratamentos de temperaturas e na presença ou ausência de luz, porém a taxa de germinação é baixa. Outros fatores devem influenciar na taxa de germinação da espécie. Trata-se de uma espécie que apresenta alta taxa de rebotamento em campo, mas tal taxa de rebrote não foi reproduzida com sucesso no laboratório.

A alta porcentagem de germinação nessas temperaturas para *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. rufescens* reforçam a idéia de que a baixa taxa de germinação de *Smilax*

polyantha não está ligada apenas a variação de temperatura, de substrato ou de luz e sim a algum fator intrínseco de seu metabolismo e talvez constitui uma estratégia de adaptação da espécie ao ambiente.

As porcentagens de germinação obtidas para *Smilax campestris*, *S. cissoides* e *S. brasiliensis* encontradas neste estudo estão mais próximas dos resultados obtidos por autores como Rosa & Ferreira (1999), que verificaram taxa germinação para *Smilax campestris* de 71% em temperatura de 30°C na presença de luz e 51% em temperatura alternada 25-35° e Pogge & Bearce (1989), que obtiveram taxas de germinação entre 95% para *Smilax rotundifolia* e 82% para *S. glauca* em temperatura de 22°C.

Quanto ao início da germinação, Rosa & Ferreira (1999) verificaram germinação a partir de 30 dias do início do experimento com presença de luz e 15 dias na ausência de luz. Pogge & Bearce (1989) observaram o início da germinação a partir de dois meses para sementes de *Smilax rotundifolia* e dez meses para *S. glauca*. Segundo Andreatta (1980), o processo de germinação pode variar entre 39 e 93 dias para as sementes de *Smilax rufescens*, *S. elastica*, *S. syphylitica*, *S. quinquenervia* e *S. syringoides*. Em nosso estudo o início da germinação foi verificado após 22 dias para *S. campestris* e 29 dias para *S. cissoides* e 36 dias para *S. brasiliensis* e *S. polyantha*.

A partir do IVG (Maguire 1962) também observamos que a melhor resposta foi obtida para *S. campestris*, seguida de *S. cissoides*. Segundo tal índice, quanto maior o valor obtido maior a velocidade de germinação e maior vigor do lote.

Com respeito a testes para quebra de dormência descritos por Andreatta (1980), Pogge & Bearce (1989), D'Antuono & Lovato (2003) e Santos et al. (2003) realizamos ensaios preliminares utilizando sementes de *Smilax polyantha* (espécie que demanda mais tempo para a germinação) colhidas em 2004, quando foram conduzidas técnicas de escarificação química (ácido sulfúrico) e mecânica (lixa); choques de temperatura e embebição em ácido giberélico (GA₃), seguindo a metodologia encontrada em Santos et al. (2003). Porém a partir desse ensaio observou-se que não houve germinação de sementes em nenhum dos tratamentos utilizando-se escarificação, apenas ocorrendo germinação nas sementes testemunhas (2% de germinação). Além disso, foi observado que sementes no substrato papel filtro apresentavam mais fungos do que as em vermiculita. Tais ensaios

contribuíram para a condução de nossos experimentos uma vez que descartamos tratamentos envolvendo escarificação de sementes e selecionamos o substrato areia buscando evitar o aparecimento de fungos observado em papel filtro. Andreato (1980), Pogge & Bearce (1989) e D'Antuono & Lovato (2003) também verificaram que testes de escarificação de sementes do gênero *Smilax* não auxiliam na germinação e muitas vezes podem inviabilizar a semente.

Além da importância medicinal das espécies de *Smilax* descrita em inventários etnobotânicos e livros especializados na área, segundo Pogge & Bearce (1989), os frutos de algumas espécies norte-americanas possuem um papel muito importante como fonte de alimento para a vida selvagem e é amplamente consumido por aves e mamíferos. Portanto, o gênero merece uma especial atenção tanto para o desenvolvimento do cultivo de espécies medicinais como também para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas.

Segundo Tillich (2007), a germinação na família Smilacaceae é do tipo hipógea. Além disso, pelo fato de que seus cotilédones permanecem no interior da semente, a germinação é do tipo criptocotiledonar pela classificação de Duke (1965). Segundo o mesmo autor, catafilos hialinos que sucedem os cotilédones são comuns em espécies criptocotiledonares, assim como verificado nas espécies estudadas.

Com respeito a análise da morfologia das plântulas, segundo Andreato & Pereira (1990) a raiz principal é de difícil visualização desde o início do desenvolvimento em *Smilax elastica*, *S. quinquenervia*, *S. rufescens*, *S. syphylitica* e *S. syringoides*, uma vez que as raízes adventícias se confundem com a raiz primária. A mesma autora também observou a bainha cotiledonar membranácea para todas as espécies e as características encontradas como fatores que diferenciam as espécies estão concentradas nas folhas assim como observamos no presente estudo. Porém a autora também comenta que o primeiro eófilo pode diferenciar as plântulas, o que não foi observado para as espécies estudadas, uma vez que para as quatro espécies o eófilo não apresenta diferenças significativas.

Holm (1890) observou que o número de ramificação de *Smilax rotundifolia* e *S. glauca* poderia determinar a idade das plantas uma vez que a cada ano observou-se a formação de apenas um ramo novo para cada espécie. No presente estudo tal correlação não seria possível de ser feita uma vez que ao completarem um ano de desenvolvimento, *S.*

polyantha e *S. cissoides* apresentavam cerca de 5 ramos aéreos e *S. campestris* e *S. brasiliensis* apresentavam cerca de 7.

5-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreata, R. H. P. (1980) *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae) Ensaio para uma revisão das espécies brasileira. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 24: 179-301.
- Andreata, R. H. P. (1997) Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Pesquisas–Botânica 47: 7-244.
- Andreata, R. H. P. & Pereira, T.S. (1990) Morfologia das plântulas de algumas espécies de *Smilax* L. Pesquisas–Botânica, 41: 7-24.
- Andreata, R.H.P. & Menezes, N.L. (1999) Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 18: 39-51.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. (1992). Regras para Análise de Sementes. SNAD, DNDV, CLAV, Brasília.
- D'Antuono, L. F. & Lovato, A. (2003) Germination trials and domestication potential of three native species with edible sprouts: *Ruscus aculeatus* L., *Tamus communis* L. and *Smilax aspera* L. Acta Horticulturae, 598: 211-218.
- Duke, J.A. (1965) Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. Annals of the Missouri Botanical Garden, 52: 314-350.
- Holm, T. (1890) Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. Memoirs of the Torrey Botanical Club, 2: 57-108.
- Maguire, J.D. (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, 2: 176-177.
- Oliveira, D.M.T. (2001) Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosieae*. Revista Brasileira de Biologia, 24: 85-97.

- Pogge, F.L. & Bearce, B.C. (1989) Germinating Common and Cat Greenbrier. Tree Planters' Notes, 40: 34-37.
- Rosa, S.G.T. & Ferreira, A.G. (1999) Germination of medicinal plant: *Smilax campestris* Griseb. (salsaparrilha). Acta Horticulturae, 502: 105-111.
- Santos, M.R.A.; Paiva, R.; Gomes, G.A.C.; Paiva, P.D.O. & Paiva, L.V. (2003) Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* Grisebach. Ciência e Agrotecnologia – Lavras, 27: 319-324.
- Tillich, H.J. (2007) Seedling diversity and the homologies of seedlings organs in the order Poales (Monocotyledons). Annals of Botany, 100: 1413-1429.

Anexo I – Sementes germinadas semanalmente no período do experimento

			semanas																													
espécie	tratamento	réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S. brasiliensis	30 escuro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis	20-30 escuro	1	0	0	0	0	0	1	4	4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		2	0	0	0	0	0	0	3	4	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		3	0	0	0	0	0	0	3	4	6	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		4	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis	30 claro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		3	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis	20-30 claro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. brasiliensis		4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
espécie	tratamento	réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S. campestris	30 escuro	1	0	0	5	7	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S. campestris		2	0	0	5	7	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. campestris		3	0	0	4	6	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		4	0	0	2	1	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris	20-30 escuro	1	0	0	0	0	3	2	1	2	4	4	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		2	0	0	0	0	4	1	4	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
S. campestris		3	0	0	0	1	1	0	0	11	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
S. campestris		4	0	0	0	0	5	6	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S. campestris	30 claro	1	0	0	0	4	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		2	0	0	0	4	9	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		3	0	0	0	6	8	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		4	0	0	0	4	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris	20-30 claro	1	0	0	0	0	0	0	3	4	4	3	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		2	0	0	0	0	0	2	4	3	7	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. campestris		3	0	0	0	0	0	1	12	3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S. campestris		4	0	0	0	0	0	0	11	3	4	2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

espécie	tratamento	réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S. cissoïdes	30 escuro	1	0	0	0	2	1	2	2	3	4	1	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. cissoïdes		2	0	0	0	0	1	1	2	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. cissoïdes		3	0	0	0	1	0	1	1	4	3	1	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
S. cissoïdes		4	0	0	0	0	0	3	2	3	2	3	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. cissoïdes	20-30 escuro	1	0	0	0	0	0	0	2	2	3	3	3	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. cissoïdes		2	0	0	0	0	0	3	2	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S. cissoïdes		3	0	0	0	0	0	0	4	1	2	4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. cissoïdes		4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	2	0	3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
S. cissoïdes	30 claro	1	0	0	0	0	0	0	3	2	6	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
S. cissoïdes		2	0	0	0	0	0	0	3	1	6	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. cissoïdes		3	0	0	0	0	0	0	2	3	3	1	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. cissoïdes		4	0	0	0	0	0	0	1	1	4	3	3	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
S. cissoïdes	20-30 claro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	3	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. cissoïdes		2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3	7	3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. cissoïdes		3	0	0	0	0	0	0	0	2	4	7	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. cissoïdes		4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	6	7	1	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
espécie	tratamento	réplica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
S. polyantha PR	30 escuro	1	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. polyantha PR		4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR	20-30 escuro	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. polyantha PR		3	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S. polyantha PR		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
S. polyantha PR	30 claro	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S. polyantha PR		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
S. polyantha PR		3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		4	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR	20-30 claro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S. polyantha PR		4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

Capítulo 5

Ontogenia e estrutura da semente de Smilax polyantha (Smilacaceae) e análise comparativa da composição química do endosperma com S. rufescens

Ontogenia e estrutura da semente de *Smilax polyantha* (Smilacaceae) e análise comparativa da composição química do endosperma com *S. rufescens*

Resumo: *Smilax polyantha* é uma espécie nativa do Cerrado e conhecida na medicina popular como salsaparrilha. Apesar do uso popular, pouco se sabe sobre a propagação da espécie. O objetivo desse trabalho foi descrever a estrutura da semente de *S. polyantha*, em diferentes fases de desenvolvimento, visando esclarecer fatores estruturais que pudessem estar associados às baixas taxas de germinação obtidas em nossos estudos. Com o mesmo propósito foi comparada a composição química do endosperma da semente de *S. polyantha* e de uma espécie que verificamos ter elevada taxa de germinação, ou seja, *S. rufescens*. Sementes foram fixadas na solução FAA, incluídas em resina plástica, seccionadas a 10 µm de espessura e coradas com azul de Toluidina para as análises usuais, calcofluor para a celulose e outros corantes e reagentes para a detecção de algumas classes de compostos. Para as análises químicas do endosperma, as sementes de *S. polyantha* e *S. rufescens*, foram trituradas e após sucessivas extrações com álcool, água e hidróxido de sódio, respectivamente, foram obtidos os açúcares solúveis, hemiceluloses e manoses, analisados em HPLC. Os óvulos são ortótropos, bitegmentados, com funículo curto, feixe vascular único do tipo colateral terminando na calaza, e hipóstase formada por células calazais e nucelares. A semente possui envoltório não multiplicativo, sendo a micrópila bem delimitada mesmo após o seu amadurecimento. Nas fases de semente jovem o endosperma apresenta núcleos livres e, a hipóstase, compostos fenólicos; o tegumento externo é formado por 6-10 camadas de células, com muitos idioblastos com ráfides e compostos fenólicos e o interno por duas camadas. Na semente madura o endosperma celularizado apresenta células de paredes espessadas, o embrião é pequeno, a testa apresenta células grandes, com muitas ráfides e compostos fenólicos e, o tégmen, é formado por duas camadas de células alongadas no sentido periclinal, recobertas por cutícula e com conteúdo vermelho-alaranjado correspondente à coloração verificada na semente madura. Na fase de dispersão, a testa se separa do tégmen, ficando esta presa à semente somente pela região calazal, sendo, portanto o envoltório protetor do embrião formado apenas pelo tégmen. Os testes histoquímicos demonstraram a presença de lipídeos, proteínas e polissacarídeos no conteúdo celular da semente madura das espécies analisadas. As análises químicas mostraram maior porcentagem de hemicelulose em *S. polyantha* assim como também maior proporção de manose e glucose, em comparação com *S. rufescens*.

1-) INTRODUÇÃO

A família Smilacaceae é agrupada dentro da Ordem Liliales dentro do grupo das monocotiledôneas, e possui apenas o gênero *Smilax* com 310 espécies que se distribuem nas regiões temperadas e tropicais (Judd et al. 2009). As plantas são dióicas, lianas ou trepadeiras herbáceas, com inflorescências que podem ser cimas umbeliformes, frutos do tipo baga, globosos, de coloração do epicarpo maduro variando, dependendo da espécie, de amarelado, alaranjado, avermelhado, vinoso, arroxeado, azulado ou preto (Andreata 1997). A mesma autora descreveu 31 espécies como sendo válidas e encontradas no Brasil, sendo que 14 destas são endêmicas.

Smilax polyantha e *S. brasiliensis* são espécies nativas do Cerrado e *S. rufescens* é uma espécie de restinga, todas conhecidas na medicina popular como salsaparrilha (Andreata 1997). Apesar do uso popular, temos alguns estudos sobre a propagação da espécie entre eles, Holm (1890), Andreata (1980), Pogge & Bearce (1989), Andreata & Pereira (1990), Andreata & Menezes (1999), Rosa & Ferreira (1999), D'Antuono & Lovato (2003) e Santos et al. (2003) mas apenas Andreata (1995) e Palhares et al. (2009) descrevem a semente madura e sua composição.

Pogge & Bearce (1989), Andreata (1980), D'Antuono & Lovato (2003) e Santos et al. (2003) relatam testes para quebra de dormência realizados para reduzir o tempo do início da germinação. Porém apenas Santos et al. (2003) observou algum resultado para a quebra de dormência com a utilização de escarificação química associada à utilização de ácido giberélico. Os demais autores verificaram que testes de escarificação de sementes do gênero *Smilax* não auxiliam na germinação e, muitas vezes, podem inviabilizar a semente. Tais autores ainda citam que a dificuldade de germinação no gênero pode estar associada com características morfológicas da semente.

Segundo Ferreira & Borghetti (2004), a dormência pode ser fisiológica, quando ligada a inibidores químicos; morfológica, quando ligada à imaturidade do embrião ou morfofisiológica quando o embrião é imaturo e ainda há ação de inibidores químicos. Baskin & Baskin (2001) agruparam algumas lianas ocorrentes em florestas de clima temperado nas três categorias descritas acima para categorias de dormência e classificaram *S. glauca* e *S. rotundifolia* como sementes com dormência morfofisiológica baseados nos estudos de Pogge & Bearce (1989).

O objetivo desse trabalho foi descrever a estrutura da semente de *S. polyantha*, em diferentes fases de desenvolvimento, visando esclarecer fatores estruturais que pudessem estar

associados às baixas taxas de germinação obtidas em nossos estudos (Capítulo 4). Com o mesmo propósito foi comparada composição química do endosperma da semente de *S. polyantha* e de uma espécie que verificamos ter elevada taxa de germinação, ou seja, *S. rufescens*.

2-) MATERIAL E MÉTODOS

A) Material botânico

O material reprodutivo utilizado no estudo ontogenético de *Smilax polyantha* Grisebach foi coletado em diferentes estágios de desenvolvimento durante os meses setembro e maio de 2006, na cidade de Pratânia - SP. As sementes de *S. rufescens* foram coletadas na Ilha do Cardoso - Cananéia-SP em maio de 2007.

As espécies foram identificadas pela especialista Profa. Dra. Regina Helena Potsch Andreatta e as exsicatas registradas e incorporadas ao acervo do Herbário (ESA) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

B) Estudos anatômicos

As análises anatômicas foram realizadas em diferentes estágios de desenvolvimento desde a flor após a antese até a semente madura em *S. polyantha*. Para *S. rufescens* foram analisadas apenas sementes completamente desenvolvidas. Para as análises histoquímicas comparativas do endosperma foram utilizadas sementes antes e após o início da germinação.

As amostras foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940), desidratadas em série etílica, incluídas em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin) e os blocos obtidos foram seccionados a 8-10 µm de espessura. Para as análises histológicas usuais, o material foi corado com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico pH 4,5 (Sakai 1973) e para a visualização da celulose com calcofluor White M2R (Hughes & McCully 1975). Após a coloração as lâminas foram montadas em resina sintética “Entellan”.

Os testes histoquímicos foram realizados utilizando-se lâminas preparadas com cortes do material em historesina. A presença de substâncias lipídicas foi visualizada pelo emprego de Sudan IV (Jensen 1962). A presença de amido foi verificada pelo cloreto de zinco iodado (Strasburger 1913); a presença de compostos fenólicos pelo emprego de cloreto férrico (Johansen 1940), proteínas foram detectadas com Aniline Blue-Black (Fisher 1968), polissacarídeos com a reação com ácido periódico de Schiff (PAS) (MacManus 1948), ligninas com floroglucina

(Johansen 1940), pectinas, polissacarídeos e mucilagem ácida com vermelho de rutênio (Johansen 1940), mucilagem básica com azul de metileno (Langeron 1949), proteínas com xylidine Ponceau (O'Brien and McCully 1981).

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Leica DM LB equipado com câmera de vídeo Leica DC 300F. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas. As imagens digitais das lâminas coradas com calcoflour white foi realizada no mesmo microscópio utilizando-se a lâmpada de mercúrio HBO 50 W e filtro N2.1 (BP 515-560).

C) Análise química do endosperma

As sementes de *S. polyantha* e de *S. rufescens* foram secas a 60 °C e depois moídas. Ao pó resultante foi adicionado álcool 80% a 80°C, por 30 minutos para extração de açúcares solúveis. Após centrifugação e separação do sobrenadante, seguiu-se a extração com água destilada aquecida a 80 °C, com agitação contínua durante 3 horas. Após a extração em água quente, o material foi filtrado em náilon tipo pele de ovo e ao filtrado foram adicionados 3 volumes de etanol para precipitação de hemiceluloses. Ao material restante seguiu-se a extração com solução de NaOH com boroidreto 4M aquecida a 80 °C, com agitação contínua durante 5 horas. Os sobrenadantes foram neutralizados, dializados e liofilizados.

As frações obtidas foram analisadas por HPLC/PAD (cromatografia líquida de alta resolução com detecção por pulso amperométrico) para análise de monossacarídeos após uma hidrólise com ácido sulfúrico do polissacarídeo. Os oligossacarídeos foram analisados em cromatografia de camada delgada após digestão do polímero com uma endo-enzima (β -mananase).

3-) RESULTADOS

A) Estudos anatômicos

Os óvulos de *S. polyantha* são ortótropos, bitegmentados, com funículo curto, feixe vascular único do tipo colateral terminando na calaza, e hipóstase formada por células calazais e nucelares (Figura 1).

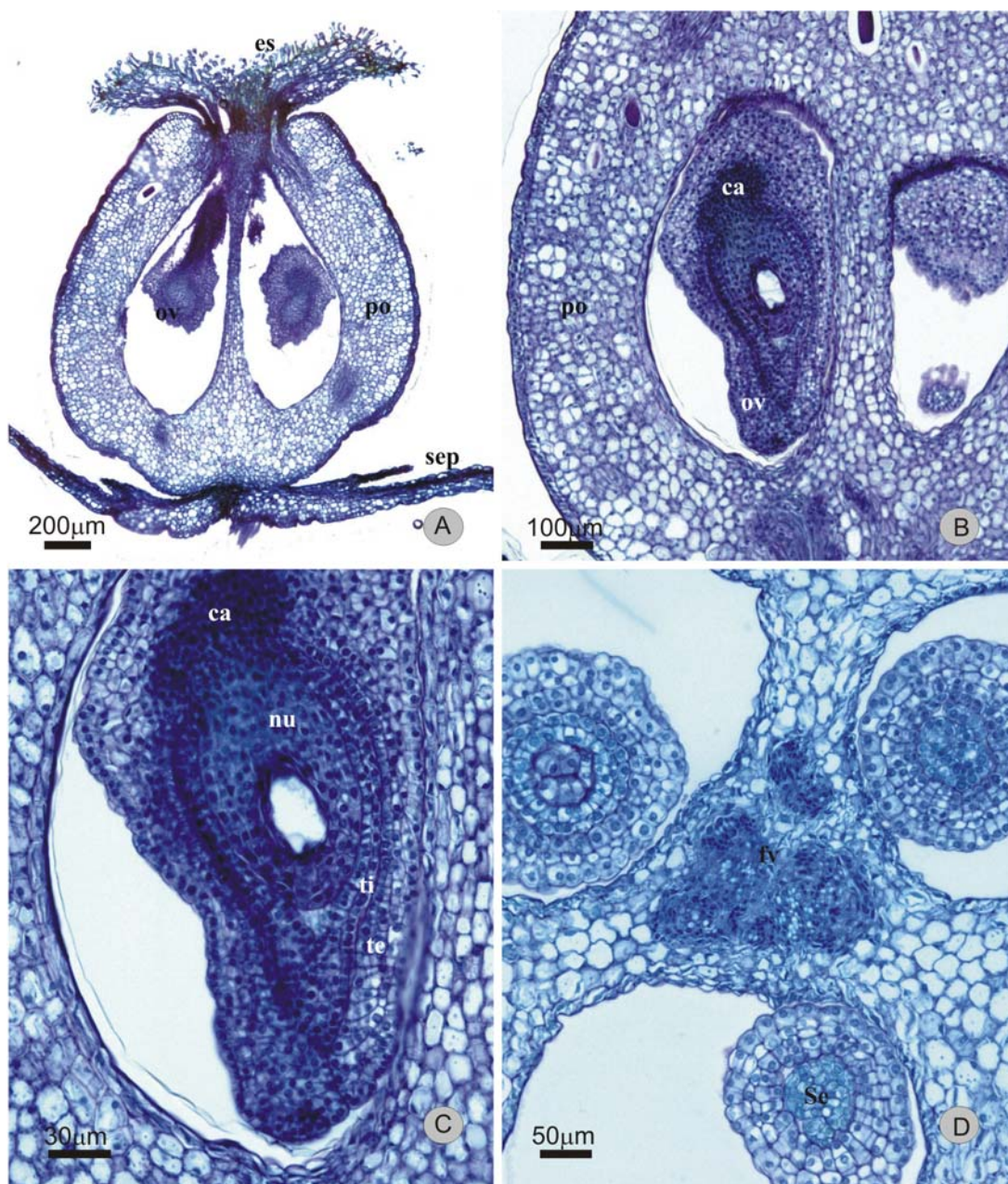


Figura 1. A-C. Secções longitudinais da flor de *Smilax polyantha*. D. Secção transversal do fruto jovem de *S. polyantha*. Detalhe das sementes em desenvolvimento. **ca:** calaza; **es:** estigma; **fv:** feixes ventrais; **nu:** nucelo; **ov:** óvulo; **po:** parede do ovário; **se:** semente; **sep:** sépala; **te:** tegumento externo; **ti:** tegumento interno.

A semente possui envoltório não multiplicativo, sendo a micrópila bem delimitada mesmo após o seu amadurecimento. Nas fases de semente jovem, a hipóstase apresenta células com conteúdo fenólico e o endosperma apresenta núcleos livres. O tegumento externo é formado por 6-10 camadas de células, com muitos idioblastos com ráfides e compostos fenólicos e o interno por duas camadas (Figura 2A). Na semente madura o endosperma celularizado apresenta células de paredes espessadas e, o embrião é pequeno. A testa apresenta células grandes, com

muitas ráfides e compostos fenólicos. O tégmen é formado por duas camadas de células alongadas no sentido periclinal, recobertas por cutícula e com conteúdo vermelho-alaranjado correspondente à coloração verificada na semente madura. Na fase de dispersão, a testa se separa do tégmen, ficando esta presa à semente somente pela região calazal, sendo, portanto o envoltório protetor do embrião formado apenas pelo tégmen (Figura 2).

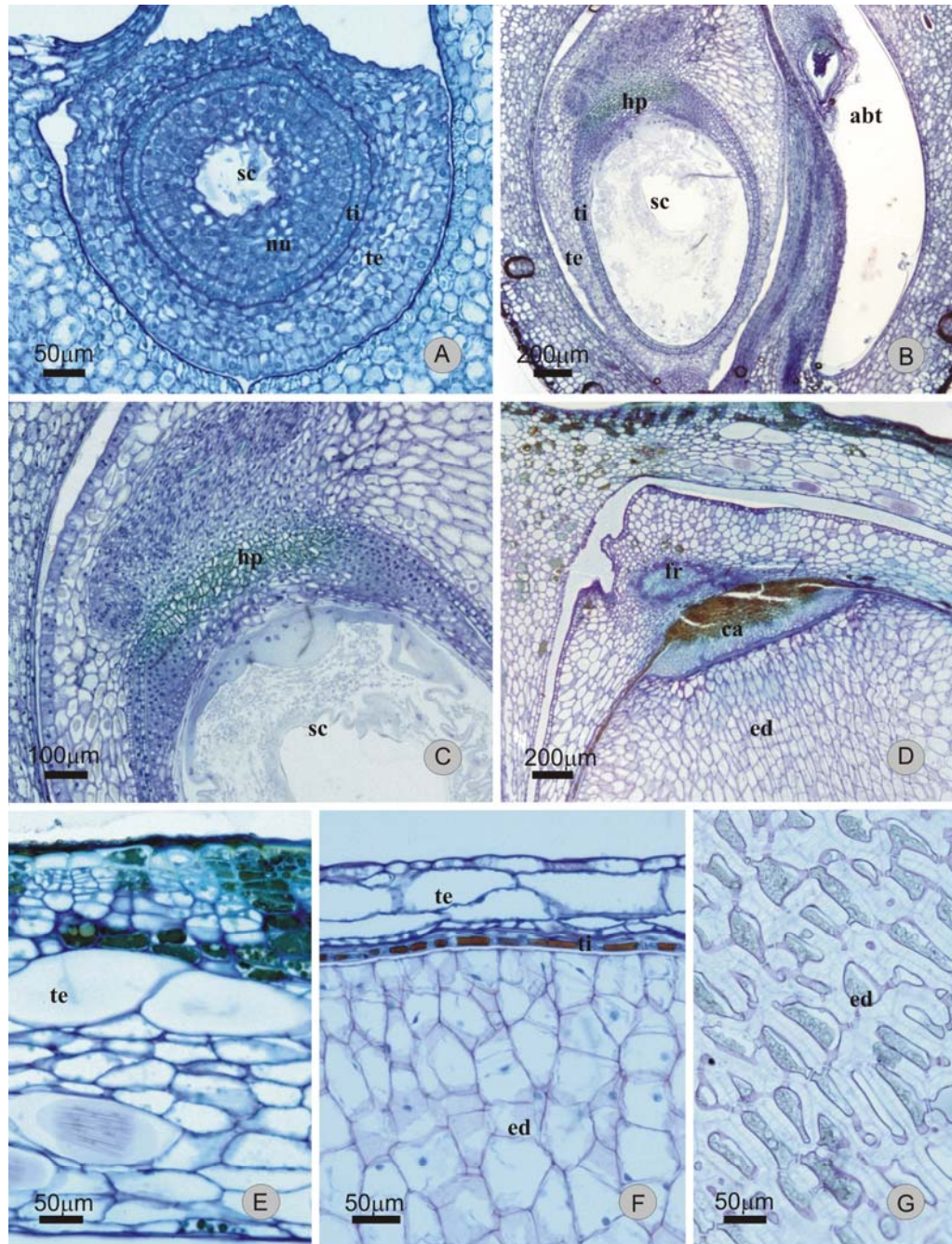


Figura 2. A. Seção transversal da semente em desenvolvimento no fruto de *Smilax polyantha*. B-E. Seções longitudinais do fruto jovem de *S. polyantha* mostrando diferentes estágios de desenvolvimento da semente. F. Tegmentos externo e interno e endosperma G. Endosperma da semente madura. **abt**: óvulo abortado; **ca**: calaza; **ed**: endosperma; **fr**: feixe rafeal; **hp**: hipóstase; **nu**: nucelo; **sc**: saco embrionário; **te**: tegmento externo; **ti**: tegmento interno.

O embrião nas duas espécies é linear e pequeno, posicionado próximo ao tegumento e junto à micrópila a qual é oposta ao hilo. O cotilédone haustorial é terminal e a plúmula é deslocada lateralmente (Figura 3 A). Em alguns planos de corte é possível visualizar o pólo radicular (Figura 3 B).

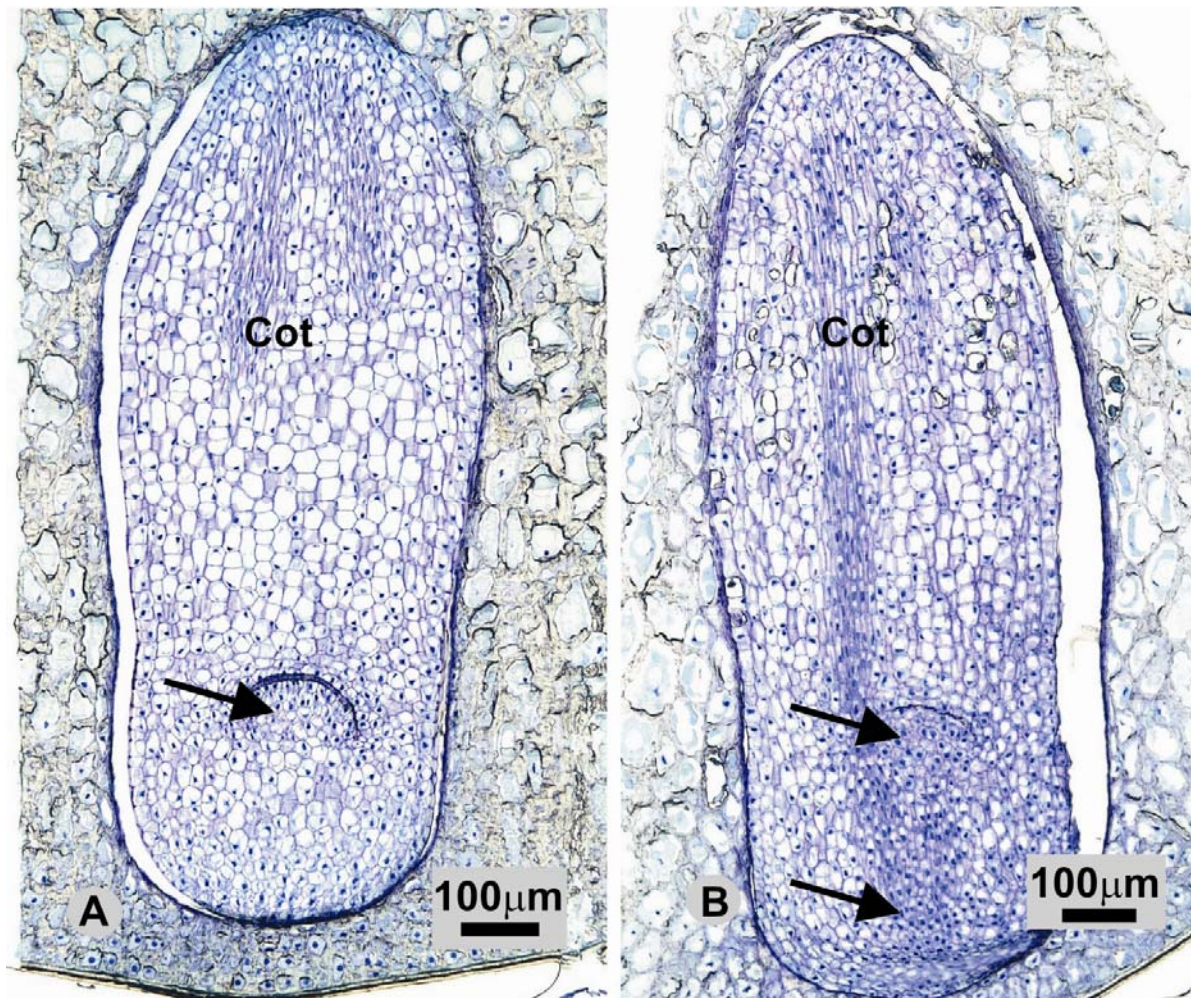


Figura 3. A-B. Secção longitudinal do embrião de *Smilax polyantha* (A) e *Smilax rufescens*. Setas = Meristemas apicais, Cot = cotilédone

Os testes histoquímicos realizados no endosperma (Tabela 1) revelaram que o conteúdo celular apresenta substâncias de natureza proteica (Figura 4 A-B), lipídica (Figura 4 C-D) e polissacarídica (Figura 5 E-F), sendo que a parede secundária espessada apresenta fraca reação ao calcofluor (Figura 4 E-F) e não apresenta lignina, mas reage positivamente para polissacarídeos totais (Figura 5 E-F).

Tabela 1. Corantes e reagentes empregados nas sementes de *S. polyantha* e de *S. rufescens* antes da germinação. O símbolo (+) indica reação positiva e o símbolo (-) indica reação negativa. O endosperma foi analisado quanto ao conteúdo celular e parede.

Corantes e reagentes	Conteúdo celular	Parede celular
Aniline Blue-Black (Proteínas)	(+)	(-)
Azul de metileno (mucilagem básica)	(+)	(+)
Cloreto férrico (compostos fenólicos)	(-)	(+) somente algumas células próximas ao hilo
Cloreto de zinco iodado (amido)	(+)	(-)
Floroglucina (lignina)	(-)	(-)
Reação com ácido periódico de Schiff (PAS) (polissacarídeos)	(+)	(+)
Sudan IV (lipídeos)	(+)	(-)
Vermelho de rutênio (pectinas e mucilagem ácida)	(+) lamela média	(+)

Antes da germinação da semente não há grãos de amido no endosperma, porém logo após a germinação observamos a presença de grãos de amido no cotilédone (Figura 5 A-D) e as paredes das células do endosperma antes espessadas e exibindo reação positiva com PAS (Figura 5 E-F) são degradadas (Figura 5 G-J). As proteínas encontradas no conteúdo celular parecem não ser degradadas no processo de germinação (comparar as figuras 4 A e B).

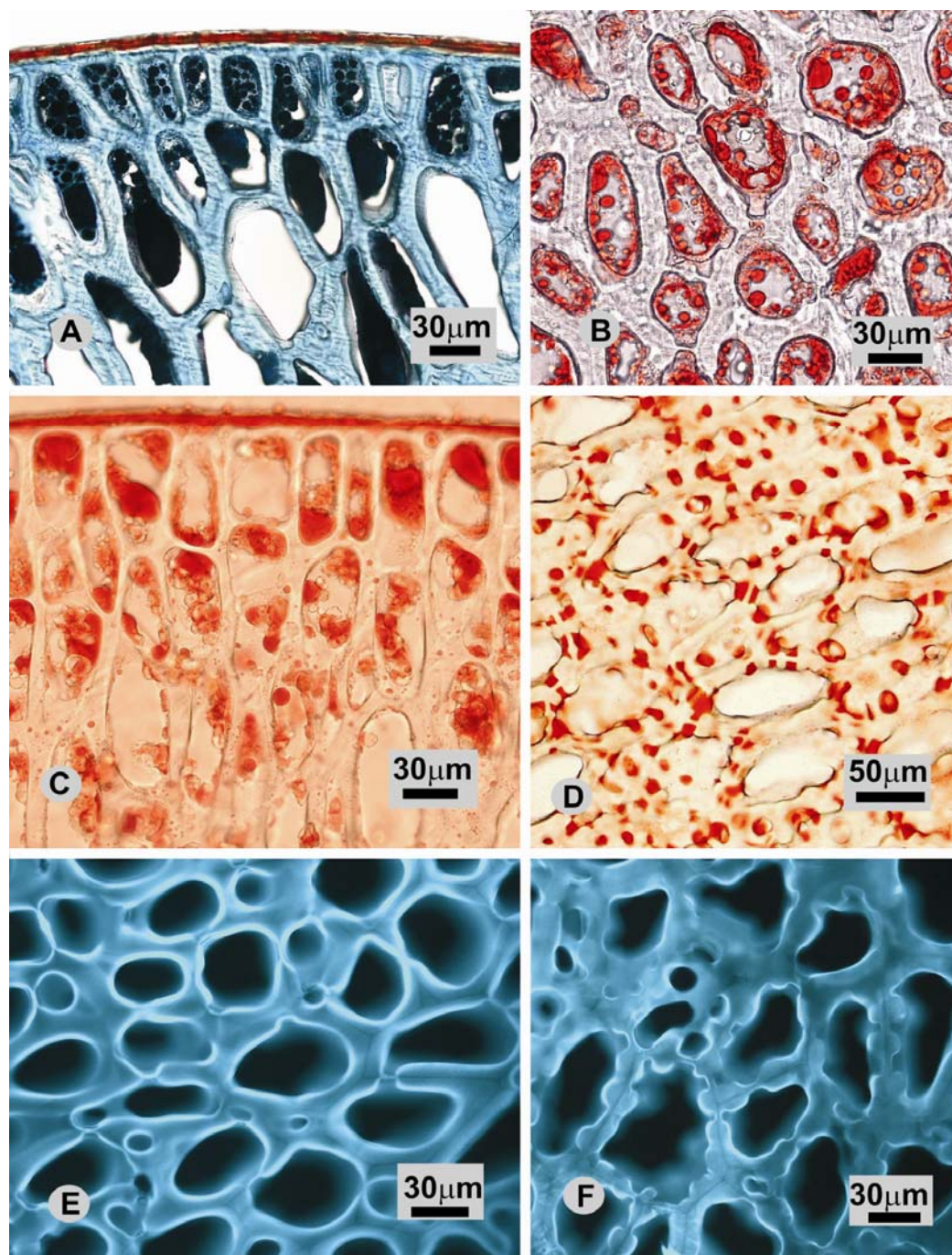


Figura 4. A-F. Secção longitudinal do endosperma da semente. A-C, E. *Smilax polyantha*. D, F. *Smilax rufescens*. A. Proteínas totais evidenciadas pelo Aniline Blue Black antes da germinação. B. Proteínas detectadas pelo Xylidine Ponceau após a germinação. C-D. Detecção de lipídeos através da reação positiva para Sudan IV. Os lipídeos acumulam-se junto das pontoações em *Smilax rufescens*. E-F. Celulose evidenciada pelo calcofluor white na parede das células do endosperma. Observar que há mais pontoações em *Smilax rufescens*.

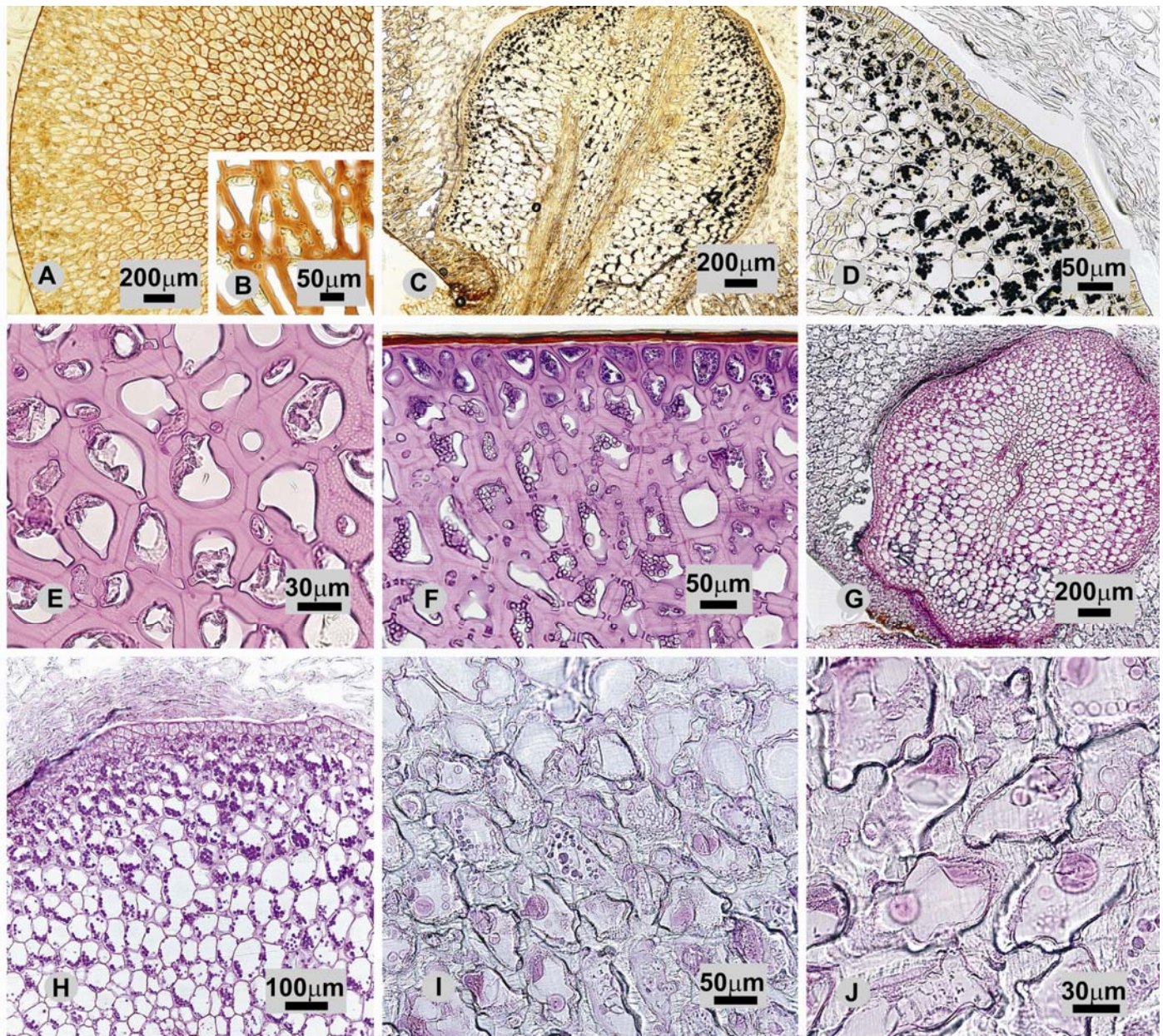


Figura 5. A-J. Secção longitudinal do endosperma da semente. A-E, G-J. *Smilax polyantha*. F. *Smilax rufescens*. A-B. Cortes após a reação com cloreto de zinco iodado mostrando ausência de grãos de amido na semente não germinada. C-D. Acúmulo de grãos de amido (pontos escuros) nas células do cotilédone da semente recém germinada. E-F. Paredes secundárias espessadas e conteúdo celular após reação positiva com PAS. G-J. Semente recém germinada com a degradação das paredes celulares evidenciada pela reação negativa ao PAS. I-J. Detalhe das paredes degradadas do endosperma.

B) Análise química do endosperma

Para a extração a partir de NaOH obtivemos 46,26% de hemicelulose/peso total no endosperma das sementes de *S. polyantha* enquanto em *S. rufescens* resultou em rendimento de 35,54%. (Tabela 2). A proporção de glucose e manose também difere entre a semente das duas espécies sendo maior a quantidade de manose em *Smilax polyantha* (Tabelas 3 e 4) .

Tabela 2. Rendimentos obtidos após extração das sementes de *Smilax* com NaOH 4M.

Amostra	Total extraído em NaOH 4M	% de hemicelulose/peso total
<i>Smilax polyantha</i>	0,4626	46,26
<i>Smilax rufescens</i>	0,3554	35,54

Tabela 3. Análise por cromatografia de alta performance com detecção por pulso amperométrico (HPLC/PAD) dos monossacarídeos provenientes da digestão dos polissacarídeos de parede celular de *Smilax polyantha* e *Smilax rufescens* com ácido sulfúrico 72 % . Os dados são as % da área dos picos dos cromatogramas.

Monossacarídeos	<i>Smilax polyantha</i>	<i>Smilax rufescens</i>
Fucose	0,0	0,0
Arabinose	0,0	0,0
Ramnose	0,0	0,0
Galactose	1,9	2,0
Glucose	67,3	75,5
Manose	30,7	22,5

Tabela 4. Razão entre manose e glucose do endosperma de *Smilax polyantha* e *Smilax rufescens*.

Razão MAN/GLC	
<i>Smilax polyantha</i>	<i>Smilax rufescens</i>
4,3	3,4

4-) DISCUSSÃO

Andreato (1995) analisando a anatomia da semente de *S. quinquenervia* também observou o tegumento externo da semente formado por uma camada hialina e elástica que se degenera quando a semente é retirada do interior do fruto maduro e o tegumento interno formado por células de coloração avermelhadas formando a testa.

A semente de *Dioscorea*, gênero de plantas que já foi classificado como muito próximo de *Smilax*, apresenta características similares às descritas no presente estudo, ou seja, o embrião localiza-se perto da borda da semente, o endosperma ocupa quase o todo espaço do interior da semente, o cotilédone é haustorial e se desenvolve em direção ao centro do endosperma durante a germinação (Lawton & Lawton 1967).

De acordo com Palhares et al. (2009), o embrião de *S. goyazana* é encontrado disperso na natureza ainda imaturo, ou seja, na fase de torpedo. No entanto, nas espécies aqui estudadas o embrião apresenta o único cotilédone expandido e o eixo embrionário com os pólos caulinar e radicular diferenciados como observado por Andreato & Menezes (1999) em *Smilax quinquenervia*.

Os polissacarídeos de reserva de parede celular ocorrem principalmente em sementes e podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas em mananos, xiloglucanos e galactanos (Buckeridge et al. 2000). Palhares et al. (2009) encontraram alta porcentagem de xilose e glucose e também arabinose e galactose na análise química das sementes de *S. goyazana*. No presente estudo não foi detectada xilose, arabinose e galactose nas sementes de *S. polyantha* e *S. rufescens*, e sim manose em grande quantidade. Além disso, observamos que a degradação da parede do endosperma coincide com o acúmulo de amido no cotilédone. Segundo Buckeridge et al. (2000), paralelamente à degradação de galactomanano no endosperma, o amido é produzido transitoriamente nos cotilédones (Buckeridge e Dietrich 1996). Dirk et al. (1999) propuseram que a degradação de reservas de parede celular e a síntese de amido poderiam estar bioquimicamente relacionadas. Horner & Arnott (1966) comentam que as sementes de *Yucca* não contêm amido e que os carboidratos possivelmente estão armazenados nas paredes espessadas das células do endosperma. Segundo os autores, as sementes de *Yucca* ainda não germinadas apresentam proteínas e lipídeos no interior das células do endosperma como observado nas espécies de

Smilax aqui estudadas. No entanto, não verificamos a mobilização das proteínas durante a germinação como descreveram os autores.

Para Ferreira e Borghetti (2004), a dormência pode ser resultado de impermeabilidade de envoltórios (física), inibição química (fisiológica), em resposta a imaturidade do embrião (morfológica) ou morfofisiológica quando o embrião é imaturo e ainda há ação de inibidores químicos. No caso das sementes de *S. polyantha* e *S. rufescens* não verificamos dificuldade de embebição da semente (dados não publicados), nem diferenças entre os embriões analisados, porém encontramos diferenças na composição química das paredes celulares do endosperma das sementes. Segundo Buckeridge et al. (2000), cada um dos polissacarídeos de reserva de parede celular apresenta funções secundárias tais como o controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes e o controle da expansão celular dos cotilédones. Sendo assim, é provável que a demora na germinação das sementes em *S. polyantha* esteja associada à parede do endosperma da semente. Tais dados estão de acordo com os descritos por Baskin e Baskin (2001) que agruparam *S. glauca* e *S. rotundifolia* na categoria de dormência morfofisiológica baseados nos estudos de Pogge & Bearce (1989).

5-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreata, R. H. P. (1980) *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae) Ensaio para uma revisão das espécies brasileira. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 24: 179-301.
- Andreata, R.H.P. (1995). Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Andreata, R. H. P. (1997) Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Pesquisas–Botânica 47: 7-244.
- Andreata, R. H. P, & Pereira, T.S. (1990) Morfologia das plântulas de algumas espécies de *Smilax* L. Pesquisas–Botânica, 41: 7-24.
- Andreata, R.H.P. & Menezes, N.L. (1999) Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 18: 39-51.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. (2001) Seeds. Academic Press, San Diego, CA.

- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C. (1996) Mobilization of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science*, 117: 33-43.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A., Santos, H.P. E Lima, D.U. (2000) Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Braz. J. Plant Physiol.* 12:137-162.
- D'Antuono, L. F. & Lovato, A. (2003) Germination trials and domestication potential of three native species with edible sprouts: *Ruscus aculeatus* L., *Tamus communis* L. and *Smilax aspera* L. *Acta Horticulturae*, 598: 211-218.
- Dirk, L.M.A., Van Der Krol, A.R., VreugdenhiL, D., Hilhorst, H.W.M., Bewley, J.D. (1999) Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37:41-50.
- Ferreira, A.G., Borghetti, F. (2004) Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre.
- Fisher, D.B. (1968) Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16: 92-96.
- Holm, T. (1890) Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 2: 57-108.
- Horner, H.T., Arnott, H.J. (1966) A histochemical and ultrastructural study of *Yucca* seed proteins. *American Journal of Botany*, 52: 1027-1038.
- Hughes, J., McCully, M.E. (1975). The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology*, 50: 319-329.
- Jensen, W. A. (1962) Botanical histochemistry: principle and practice. San Francisco, W. H. Freeman.
- Johansen, D.A. (1940) Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. (2009) Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético. Artmed, Porto Alegre.
- Langeron, M. (1949) Précis de microscopie. Masson & Cie Ed, Paris.
- Lawton, J.R.S, Lawton, F.L.S.J.R. (1967) The morphology of the dormant embryo and young seedling of five species of *Dioscorea* from Nigeria. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 178: 153-159.

- McManus, J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 23: 99-108.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. (1981) The study of plant structure principles and select methods. Termarcaphi Pty, Melbourne.
- Palhares, D., Tiné, M.A., Vinha, D., Silveira, C.E.S., Zaidan, L.B.P. (2009) Studies on the seeds of *Smilax goyazana* A.DC (Smilacaceae). *Phyton*, 49: 117-130.
- Pogge, F.L. & Bearce, B.C. (1989) Germinating Common and Cat Greenbrier. *Tree Planters' Notes*, 40: 34-37.
- Rosa, S.G.T. & Ferreira, A.G. (1999) Germination of medicinal plant: *Smilax campestris* Griseb. (salsaparrilha). *Acta Horticulturae*, 502: 105-111.
- Sakai, W.S. (1973) Simple Method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology*, 48: 247-248.
- Santos, M.R.A.; Paiva, R.; Gomes, G.A.C.; Paiva, P.D.O. & Paiva, L.V. (2003) Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* Grisebach. *Ciência e Agrotecnologia – Lavras*, 27: 319-324.
- Strasburger, E. (1913) Handbook of practical botany. (Transl. W. Hillhouse). George Allen & Company Ltda., London.

Capítulo 6

**Análise granulométrica e microscópica
comparada de drogas pulverizadas e
originadas de espécies de salsaparrilha
(*Smilax* L.)**

Análise granulométrica e microscópica comparada de drogas pulverizadas e originadas de espécies de salsaparrilha (*Smilax* L.)

Resumo: A produção de drogas vegetais e medicamentos a base de plantas vem seguindo trajetória ascendente de produção e qualidade. No entanto, é necessário considerar que o controle de qualidade prevê obrigatoriamente o estudo botânico, farmacognóstico e fitoquímico das plantas. A microscopia da droga íntegra ou pulverizada é uma ferramenta importante na identificação da espécie a ser empregada e que muitas vezes pode solucionar problemas de ordem imediata. As espécies do gênero *Smilax* L. são popularmente conhecidas como salsaparrilha ou japecanga, encontradas em todo território brasileiro e utilizadas na medicina popular como depurativo, fortificante e anti-reumático, sendo identificadas apenas pelo nome popular em sua comercialização. O objetivo do presente trabalho foi estudar a granulometria e investigar marcadores anatômicos em amostras de salsaparrilha cominuídas. Para tanto, folhas, caules, raízes e rizóforos de *Smilax brasiliensis*, *S. cissoides* e *S. polyantha* foram conduzidos à secagem em estufa de fluxo de ar a 40°C por 72 horas. Após esta etapa, procedeu-se a pulverização em moinho de facas com prosseguimento em moinho de bolas. Posteriormente executou-se uma uniformização em tamis com malha de abertura igual a 210µm. A análise microscópica dos pós-obtidos, teve início com uma clarificação com hipoclorito de sódio a 2%, seguida de lavagem e imersão em tampão fosfato pH 6,8 e coloração com azul de toluidina pH 6,8 para contraste das partículas. Foram observados nos fragmentos de folha das três espécies estômatos paracíticos, células sinuosas do mesofilo, esclereides fibriformes e células do parênquima vascular lignificadas contendo monocristais em seu interior. No caule das três espécies observou-se a ocorrência de células do parênquima vascular altamente lignificadas e alongadas longitudinalmente, idioblastos contendo substâncias fenólicas, aglomerados de células do parênquima cortical de formato retangular, fibras, grãos de amido, sendo marcante para *Smilax brasiliensis* a presença braquiesclereides. Na raiz e no rizóforo das três espécies foram encontrados esclereides fibriformes, braquiesclereides, fibras, elementos de vaso escalariformes e pontoados, células do córtex interno das raízes com alto grau de espessamento e a coloração amarela-pardacenta de algumas partes, células corticais retangulares com as paredes delgadas, presença de muitos grãos de amido e aglomerados celulares contendo células endodérmicas. Para a análise da granulometria e determinação de densidade foi estudada apenas a espécie *Smilax polyantha*. Determinou-se a densidade aparente de cada amostra: ramos (0,608 g/mL⁻¹); rizóforo (0,634 g/mL⁻¹); raiz (0,558 g/mL⁻¹); o diâmetro médio de partículas (ramos: 256 µm, rizóforo: 277 µm e raiz: 174 µm) e a densidade característica da fração da droga selecionada na tamisação (fração que continha partículas iguais ou menores do que a partícula de diâmetro médio): ramos (0,653 g/mL⁻¹); rizóforo (0,662 g/mL⁻¹); raiz (0,596 g/mL⁻¹).

1-) INTRODUÇÃO

A família Smilacaceae é composta por lianas ou trepadeiras herbáceas, raramente subarbustos ou arbustos. As plantas são dióicas e podem apresentar rizóforos e seus caules e ramos aéreos são, em geral, aculeados. Possuem folhas simples, alternas, com bainhas bilabiadas; pecíolos providos ou não de um par de gavinhas; lâminas coriáceas a membranáceas e venação primária acródroma. As inflorescências podem ser cimas umbeliformes (Andreata 2000).

Segundo Judd et al. (2009), a família Smilacaceae possui apenas um gênero (*Smilax*) com 310 espécies que se distribuem nas regiões temperadas e tropicais.

As espécies do gênero *Smilax* L. são conhecidas no mundo todo por suas propriedades medicinais, entre elas, as atividades anti-reumática, antiinflamatória e antioxidante, atribuídas às suas raízes e rizóforos (Jiang & Xu 2003). No Brasil o gênero é popularmente conhecido como salsaparrilha ou japecanga, encontrado em áreas de Cerrado, floresta ou Restinga, distribuídas por todo território brasileiro. Apesar da intensa utilização da planta no país, sua utilização na medicina popular não se preocupa com a identificação das espécies e sua comercialização é realizada apenas pelo nome popular (Lorenzi 2002).

A identificação botânica das espécies comercializadas é de fundamental importância uma vez que a correta identificação e a caracterização morfoanatômica das plantas são fundamentais para o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na elaboração de fitoterápicos, garantindo desta forma, a confiabilidade dos mesmos (Ming 1994). De acordo com Ferreira *et al.* (1998), a indústria farmacêutica nacional de fitoterápicos necessita investir na pesquisa, especialmente no controle de qualidade para atingir os padrões mundiais.

O objetivo deste trabalho foi eleger marcadores anatômicos para a padronização da análise microscópica da droga vegetal pulverizada de três espécies de salsaparrilha: *Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. cissoides* Martius ex Grisebach e *S. polyantha* Grisebach.

2-) MATERIAL E MÉTODOS

Análise de granulometria

Os indivíduos de *Smilax polyantha* Grisebach foram coletados em Pratânia-SP (dezembro, 2005), separados em ramos (folhas e caule aéreo), raízes e rizóforos e conduzidos à secagem em estufa de fluxo de ar a 40°C por 72 horas. Após esta etapa, procedeu-se a pulverização das drogas em moinho de facas.

Em seguida a densidade aparente dos pós obtidos foi determinada segundo os procedimentos e cálculos indicados por Martins & Sacramento (2004), utilizando-se cápsulas gelatinosas duras de tamanho 0, que possuem um volume conhecido de 0,688mL (Figura 1 A-D). Quatro grupos de vinte e cinco cápsulas foram preenchidos com as drogas pulverizadas originadas de ramos, rizóforo e de raízes, porém antes desta ação, determinavam-se as massas das cápsulas vazias referentes a cada grupo. Após o preenchimento, a massa de cada grupo foi determinada, e a densidade aparente foi calculada dividindo-se os valores de massa por exatamente 17,20mL (25 x 0,688mL) obtendo-se assim os valores de densidade aparente denominada D1 (referente às drogas pulverizadas apenas em moinho de facas)

Procedeu-se o estudo da granulometria conduzindo quantidades exatas de 50,000g do pó, obtidas por amostragem e quarteamento em quadruplicatas, à passagem por tamises, sequencial e verticalmente dispostos contendo as seguintes aberturas de malhas: 840µm, 420µm, 210µm, 177µm, 125µm, 74µm e coletor (Figura 1E), por 30 minutos, empregando uma base vibratória com reostato regulado para o nível 10 de intensidade (Figura 1F). A massa de cada fração retida nos tamises foi determinada em balança semi-analítica.

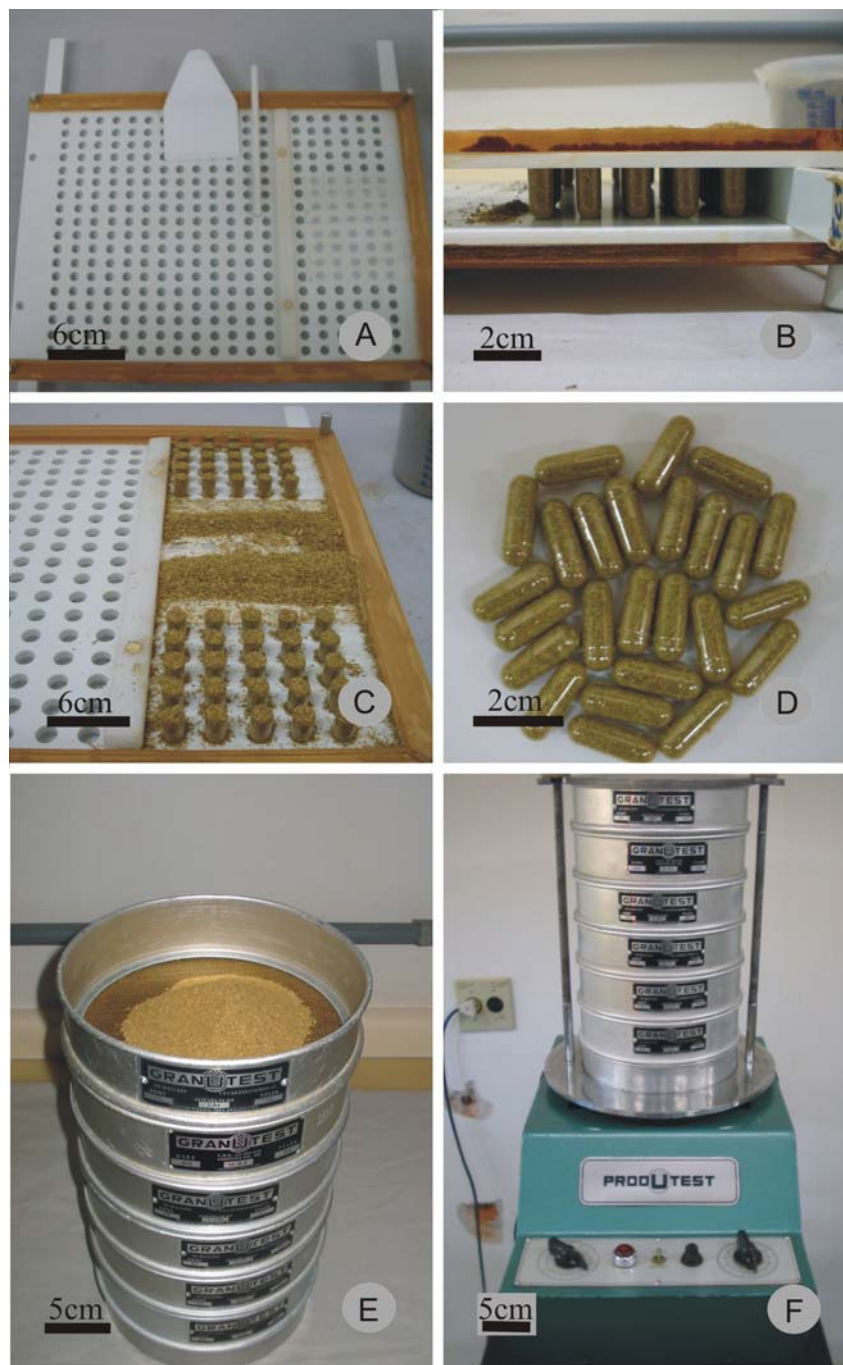


Figura 1. A. Encapsulador e seus utensílios utilizados no método de determinação da densidade aparente das drogas pulverizadas. B-D. Processo de preenchimento de cápsulas com a droga vegetal pulverizada (*Smilax polyantha* Grisebach) para o posterior cálculo da densidade do pó. E. Tamises empilhados criando a sequência de tamanhos de malha utilizados no estudo granulométrico. F. Conjunto base vibratória e tamises.

Em seguida, calculou-se o diâmetro médio de partículas através do cruzamento de duas curvas obtidas num estudo de regressão linear: a curva de retenção expressa como a frequência relativa acumulada das massas retidas em cada um dos tamises; e a curva de passagem, que retrata a quantidade de droga pulverizada que atravessou a malha do tamis anterior, considerando toda a quantidade de pó que foi depositada no primeiro tamis da sequência (Alberton et al., 2001; Martins & Sacramento, 2004).

De posse dos valores referentes ao diâmetro médio das partículas para o pó de cada órgão de *S. polyantha*, executou-se uma trituração subsequente em moinho de bolas para aquelas frações que continham partículas de diâmetro médio maior do que o verificado, padronizando-as, utilizando um tamis cuja malha possuía aberturas equivalentes ou próximas inferiores ao diâmetro médio das partículas (diâmetros iguais ou menores do que o diâmetro médio determinado).

Realizou-se em seguida a determinação da densidade do pó padronizado, considerando-se quatro grupos de vinte e cinco cápsulas com quantidades suficientes do pó padronizado. Os valores de densidade assim obtidos foram denominados de D2.

Análise microscópica da droga pulverizada

Foram analisados folhas, caules, raízes e rizóforos de *Smilax brasiliensis*, *S. cissoides* e *Smilax polyantha* coletados nos municípios de Itapagipe-MG, Feira de Santana-BA e Pratânia-SP, respectivamente, secados em estufa de fluxo de ar a 40°C durante 72 horas. Após esta etapa, procedeu-se a pulverização em moinho de facas e de bolas nesta sequência para posterior uniformização das partículas do pó em tamis com malha de abertura de 210µm. Para a análise microscópica utilizou-se uma quantidade suficiente do pó de cada órgão acondicionada em um funil contendo papel de filtro. A cada funil foram acrescentadas quantidades de hipoclorito de sódio comercial (máx 2% de cloro ativo) suficientes até a completa clarificação do material. Procederam-se sucessivas lavagens do pó clarificado com água destilada e, posteriormente, com tampão fosfato pH 6,8, para a remoção do excesso de clarificante (Martins & Sacramento, 2004). Após as lavagens com o tampão, procedeu-se a coloração com azul de toluidina pH 6,8 para contraste das partículas (Feder & O'Brien, 1968). Os pós corados foram retirados do papel filtro com a ajuda de

uma espátula e colocados sobre lâminas de vidro contendo uma gota de solução de glicerina-água a 50%.

A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Leica DM LB equipado com câmera de vídeo Leica DC 300F. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas.

3-) RESULTADOS

Análise de granulometria

Com base no estudo de regressão linear efetuado para as curvas de passagem e retenção estimou-se o diâmetro médio das partículas podendo o processo de moagem ser avaliado. Considerou-se como tamanho do diâmetro médio das partículas o valor correspondente ao cruzamento das curvas de retenção e passagem, equivalendo a 50% de passagem e/ou retenção.

O diâmetro médio das partículas estimado pelo estudo de regressão linear atingiu 256µm para o pó originado dos ramos de *Smilax polyantha* (Figura 2), 277µm para os rizóforos (Figura 3) e 174µm para as raízes (Figura 4).

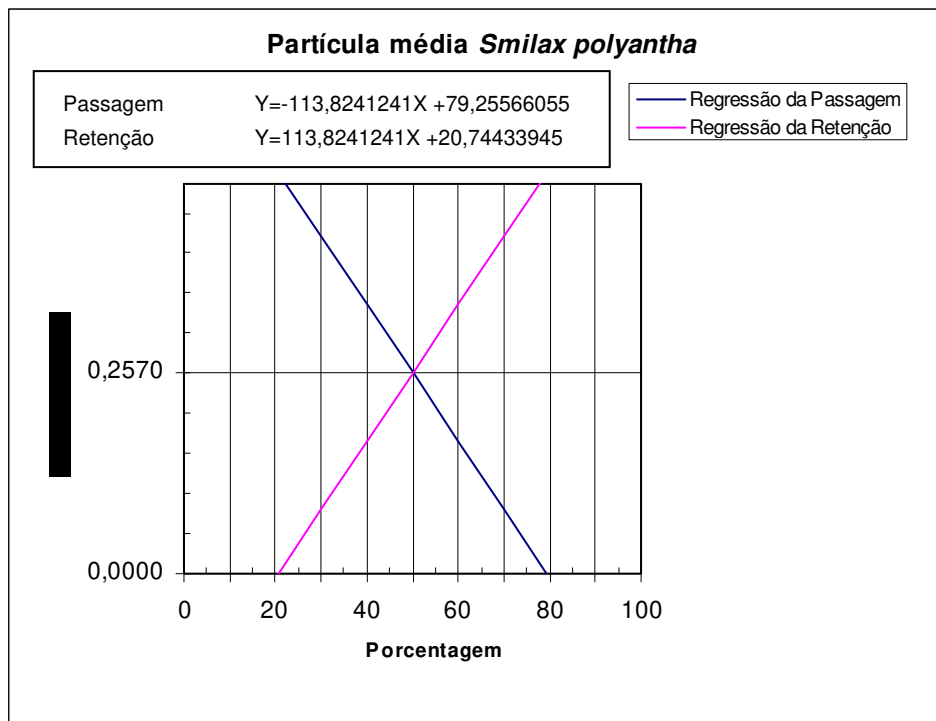


Figura 2. Partícula média referente ao pó originado a partir dos ramos (folhas e caules aéreos) de *S. polyantha* Grisebach.

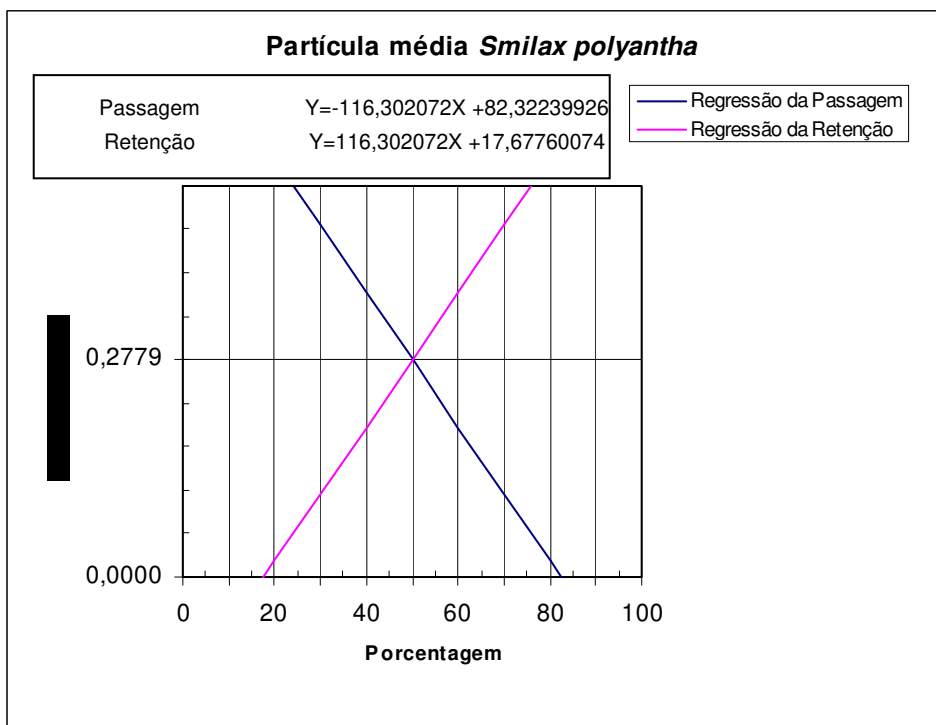


Figura 3. Partícula média referente ao pó originado a partir dos rizóforos de *Smilax polyantha* Grisebach.

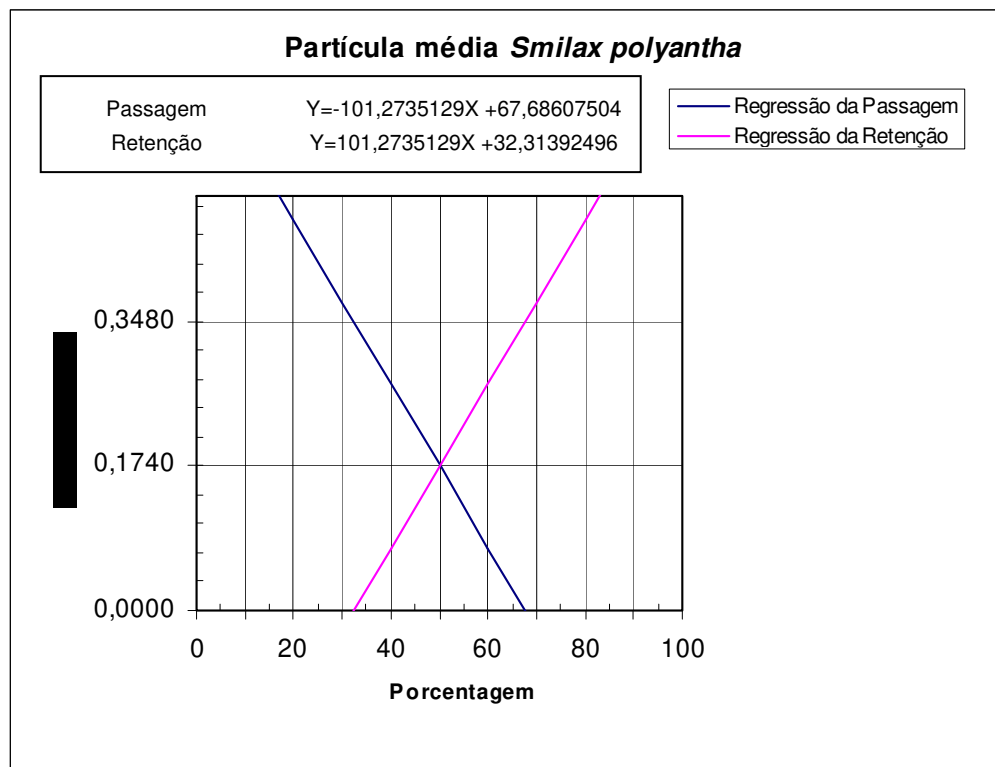


Figura 4. Partícula média referente ao pó originado a partir das raízes de *Smilax polyantha* Grisebach.

Os valores médios de densidade do pó para as drogas vegetais obtidas em moinho de facas (D1), e padronizadas (D2) constam na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das densidades aparentes (g.mL^{-1}) verificadas para os pós obtidos do moinho de facas (D1) e padronizados (D2) provenientes de órgãos de *Smilax polyantha* Grisebach. Média de quatro repetições.

Pulverização/Padronização	Ramos	Rizóforo	Raízes
Moinho de facas (D1)	0,608 $\pm$ 0,006	0,634 $\pm$ 0,004	0,558 $\pm$ 0,009
Moinho de facas + padronização* (D2)	0,653 $\pm$ 0,003	0,662 $\pm$ 0,009	0,596 $\pm$ 0,009

* em função do diâmetro médio de partículas

Análise microscópica da droga pulverizada

A análise da microscopia dos pós obtidos de *S. polyantha* forneceu marcadores microscópicos que podem ser usados para comparação de amostras e exclusão de contaminantes e adulterantes vegetais. Foram observados na folha: células epidérmicas, estômatos paracíticos, células sinuosas do mesofilo e esclereides fibriformes (Figura 5 A-E). Na raiz (Figura 5 F-I) e no rizóforo (Figura 5 J-N) foram observados: esclereides fibriformes, fibras e fragmentos dos elementos de vaso com espessamento das paredes do tipo escalariforme e pontoado (Figura 5 H).

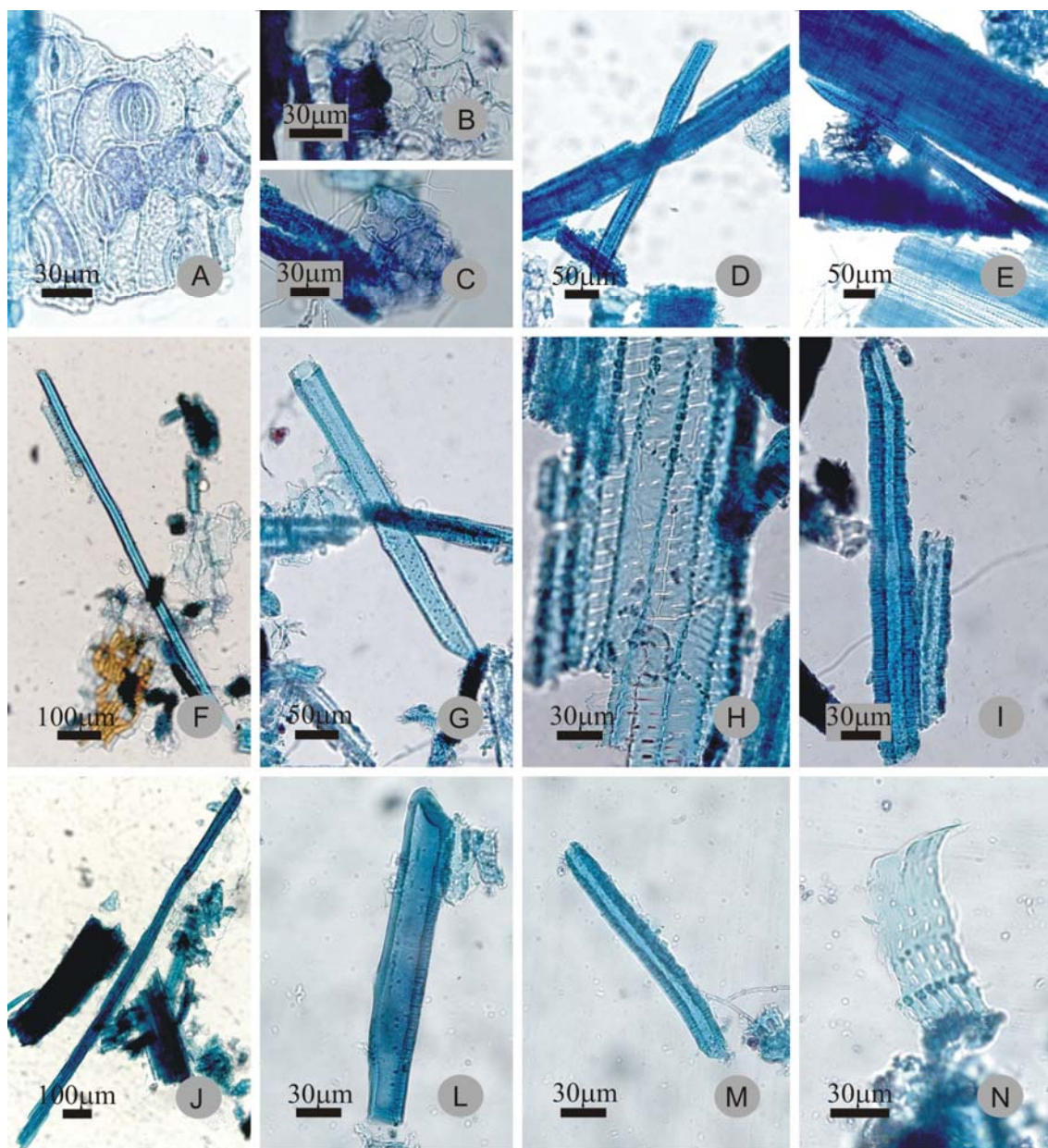


Figura 5. A-N. Caracteres anatômicos verificados na análise do pó de *Smilax polyantha* Grisebach. A-E. Partículas encontradas na análise do pó de ramos (folhas e caule). A. Estômatos paracíticos. B-C. Células do mesofilo com contorno sinuoso. D-E. Esclereídes. F-I. Partículas encontradas na análise do pó de raízes. F. Fibra. G,I. Esclereídes. H. Elementos de vaso. J-N. Partículas encontradas no pó de rizóforos. J. Fibra. L-M. Esclereídes. N. Fragmento de elemento de vaso.

Nos fragmentos de folha (Figura 6 A-E) de *S. brasiliensis* e *S. cissoides* foram observados estômatos paracíticos, células sinuosas do mesofilo, esclereides fibriformes, paredes dos elementos de vaso com espessamento do tipo escalariforme e células do parênquima vascular lignificadas contendo monocristais em seu interior.

No caule (Figura 6 F-I) de *Smilax brasiliensis* e *S. cissoides* observou-se a presença de células do parênquima vascular altamente lignificadas e alongadas longitudinalmente, idioblastos contendo substâncias fenólicas, paredes dos elementos de vaso com espessamento do tipo escalariforme, aglomerados de células corticais de formato retangular, fibras, grãos de amido, sendo marcante para *Smilax brasiliensis* a presença braquiesclereides (Figura 6 F).

Na raiz e no rizóforo de *Smilax brasiliensis* e *S. cissoides* foram encontrados esclereides fibriformes, braquiesclereides, fibras, paredes dos elementos de vaso com espessamento do tipo escalariforme, células do córtex interno das raízes com alto grau de espessamento e a coloração amarela-pardacenta (anterior à coloração com azul de toluidina) de algumas partes, células corticais retangulares com as paredes delgadas e presença de muitos grãos de amido (Figura 6 J-Q).

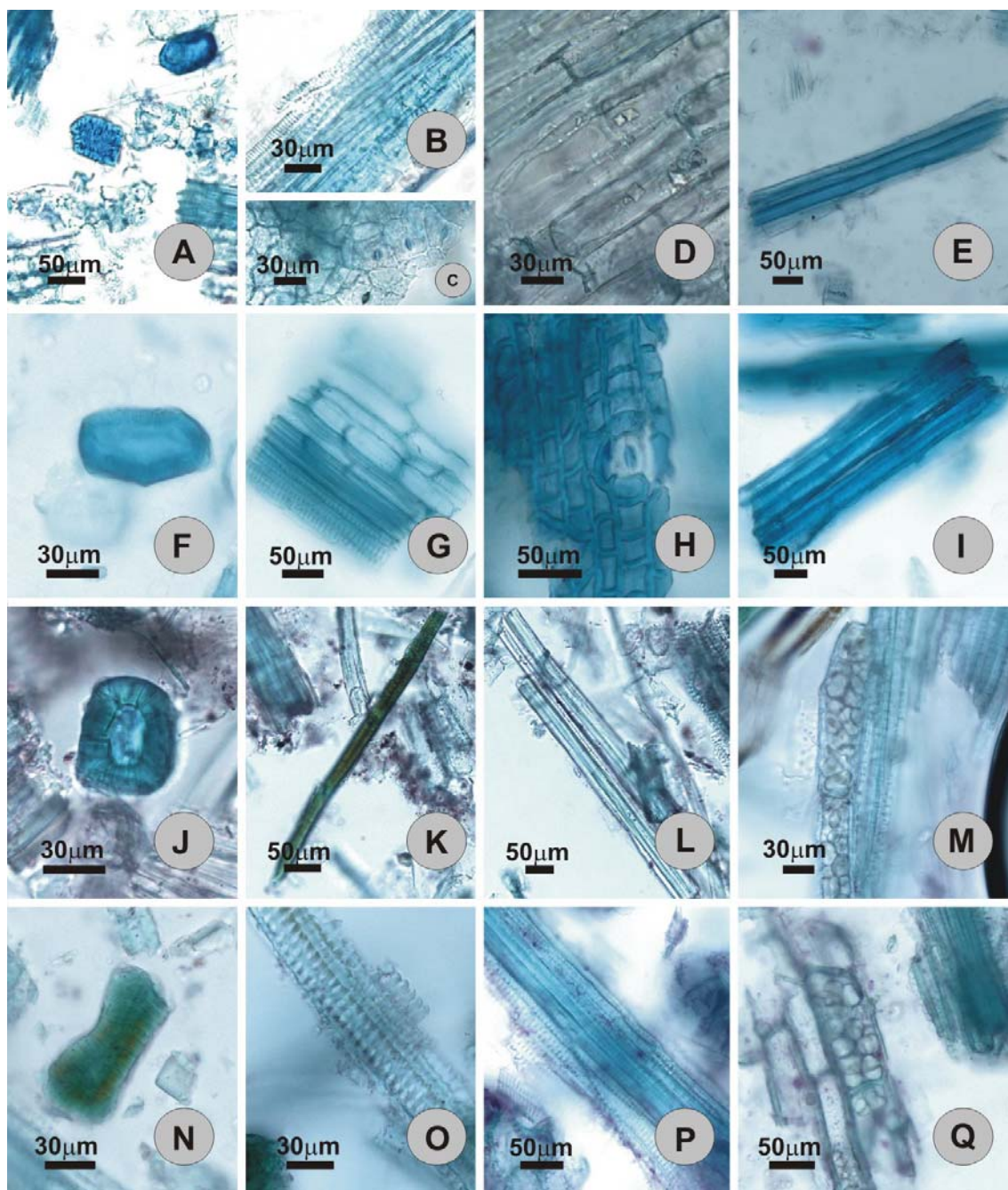


Figura 6. A-Q. Caracteres anatômicos verificados na análise microscópica das drogas de salsaparrilha pulverizadas. A-D, F-H, J-L, N-O. *Smilax brasiliensis* Sprengel. E, I, M, P-Q. *S. cissooides* Martius ex Grisebach. A-E. Folha. F-I. Caule. J-M. Raiz. N-Q. Rizóforo. A, F, J, N. Braquiesclereides. B, O. Paredes dos elementos de vaso com espessamento do tipo escalariforme. C, H. Estômatos. D. Monocristais. E, I, K, L, P. Esclereídes fibriformes. G. Aglomerados de células corticais de formato retangular. M, Q. Células contendo grãos de amido.

4-) DISCUSSÃO

Os valores de D1 indicam as diferenças de constituição tecidual entre os órgãos de *S. polyantha* que originaram as drogas vegetais pulverizadas. Com base nestes valores, sugere-se uma proporção maior de esclerificação dos tecidos do rizóforo e dos ramos, uma vez que os valores de D1 respectivos foram maiores do que o valor obtido para a raiz, para a qual se sugere uma proporção maior de células parenquimáticas, mesmo em estágio avançado de desenvolvimento. Os valores de D2 foram maiores quando comparados aos de D1 indicando que o processamento em moinho de bolas contribuiu para continuar o processo de cominuição (redução no tamanho das partículas) das respectivas drogas, pois partículas menores podem ser mais facilmente acomodadas num mesmo volume.

Considerando-se as drogas pulverizadas originadas das raízes e rizóforos das três espécies: *Smilax brasiliensis*, *S. cissoides* e *S. polyantha*, não ofereceram possibilidades seguras de distinção morfoanatômica. Sendo assim, para uma autenticidade destas drogas, com menor grau de incerteza, inclusa numa análise de controle de qualidade primário, torna-se necessário que as amostras pulverizadas sejam acompanhadas das respectivas folhas para uma análise conjunta. A fragmentação das folhas de *S. brasiliensis* fornece partículas de tamanho uniforme ainda com caracteres anatômicos. Em *S. cissoides*, os fragmentos são menores e menos uniformes, talvez pelo fato de as folhas serem membranáceas e não oferecerem resistência maior à pulverização. Vale a pena salientar que nas folhas e no caule de *S. brasiliensis* existe uma predominância de braquiesclereídes. Tais esclereídes não foram observados em *S. polyantha*.

Os demais marcadores anatômicos foliares descritos no presente estudo, ou seja, estômatos paracíticos, células sinuosas do mesofilo, esclereídes, monocristais e grãos de amido também foram relatados por Gattuso (1995) para folhas de *Smilax campestris*.

Segundo Jackson & Snowdon (1990), pode-se encontrar em amostras de *Smilax ornata* e *S. regelii* caracteres diagnósticos tais como grãos de amido compostos e grãos isolados poliédricos e pequenos; cristais aciculares de oxalato de cálcio; células dos elementos de vaso com paredes espessadas do tipo escalariforme e reticulado; células fibrosas alongadas com paredes espessadas. Todos esses caracteres estão de acordo com as observações deste trabalho.

As técnicas de microscopia ópticas aqui empregadas ofereceram subsídios técnicos para uma análise eficiente de fragmentos microscópicos dos ramos, raízes e rizóforos de salsaparrilha. Porém entre as três espécies analisadas caracteres não puderam ser eleitos como marcadores intra-específicos. Talvez, tais caracteres pudessem auxiliar em casos de contaminação da droga com outros gêneros de plantas, tais como *Herreria*, classicamente mencionada em casos de falsificação da salsaparrilha (Cunha 1937, Stellfeld, 1940).

5-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberton, J.R.; Ribeiro, A.; Sacramento, L.V.S.; Franco, S.L.; Lima, M.A.P. (2001) Caracterização farmacognóstica de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Revista Brasileira de Farmacognosia, 11: 37-50.

Andreato, R. H. P. (2000) Smilacaceae In Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil). Instituto de Botânica, São Paulo, v. 7.

Cunha, N.S. (1937) Curiosa falsificação de salsaparrilha. Revista da Associação Brasileira de Farmácia, 18: 399-352.

FARMACOPÉIA Brasileira. (1988) Atheneu, São Paulo.

Feder, N. & O'Brien, T.P. (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. American Journal of Botany, 55:123-142.

Ferreira, S.H.; Barata, L.E.S., Salles, S.L.M., Queiróz, S.R.R., Heluy Neto, N.E., Corazza, R. & Farias, R.C. (1998) Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.

Gattuso, S.J. (1995) Exomorfología y Anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). Acta Farmacéutica Bonaerense, 14:181-190.

Jackson, B.P., Snowdon, D.W. (1990) Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston.

- Jiang, J. & Xu, Q. (2003). Immunomodulatory activity of aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 53-59.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. (2009) *Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético*. Artmed, Porto Alegre.
- Lorenzi, H. (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Martins, A.B. & Sacramento, L.V.S. (2004) Caracterização de carqueja (*Baccharis trimera*): Estudos morfo-anatômicos da planta e físico da droga triturada. *In VI Workshop de Plantas Medicinais*, Unesp, Botucatu.
- Ming, L.C. (1994) Estudos e pesquisas de plantas medicinais na agronomia. *Horticultura Brasileira*, 12: 3-9.
- Stellfeld, C. (1940) Sarçaparilha e Jupicanga. *Tribuna Farmacêutica*, 8: 193-202.

Capítulo 7

Estabelecimento dos perfis cromatográficos de espécies de *Smilax* por HPLC-UV-PDA

Estabelecimento dos perfis cromatográficos de espécies de *Smilax* por HPLC-UV-PDA

Resumo: A análise do perfil cromatográfico por HPLC-UV-PDA (High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-array Detector) de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* Grisebach tem como objetivo verificar se as substâncias encontradas em seu extrato são similares às descritas na literatura e avaliar dessa maneira sua possível atividade farmacológica. Para isso, alíquotas dos extratos metanólicos (EMeOH) dos ramos, raízes e rizóforo foram individualmente analisadas por HPLC-UV-PDA com monitoramento entre 254 e 360 nm. A identificação dos picos foi realizada a partir da análise dos respectivos espectros de ultravioleta e co-injeção de padrões comerciais. A partir destas análises foram identificados nos extratos EMeOH de raiz, rizóforo e folhas os picos correspondentes às substâncias: ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido *trans*-cinâmico. Tais dados estão de acordo com os estudos encontrados na literatura já realizados com outras espécies de *Smilax*. A presença de substâncias como ácidos fenólicos e flavonóides pode estar relacionada à atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-reumática e como hepatoprotetor, como demonstram os ensaios farmacológicos encontrados na literatura realizados com extratos das espécies *S. aspera*, *S. bockii* e *S. glabra*. Nos estudos realizados não foi detectada atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa a partir dos ensaios farmacológicos realizados com extrato metanólico das raízes de *S. polyantha*.

1-) INTRODUÇÃO

O gênero *Smilax* consta da Farmacopéia Brasileira de 1929 com as espécies *Smilax papiracea*, *S. syphilitica*, *S. officinalis* e *S. medica*, denominadas como salsaparrilha, sendo descritas de acordo com o modo como as raízes são amarradas em feixes.

Em 1997, Andreatta fez a revisão do gênero *Smilax* no Brasil, descrevendo 31 espécies como válidas, sendo 14 exclusivamente brasileiras. Das 31 espécies, 10 são denominadas salsaparrilhas, sendo que sete destas possuem propriedades medicinais.

Stellfeld (1938) atribui à salsaparrilha a propriedade de aumentar o teor de colessterina no sangue, sendo que esta tem papel importante nos processos de imunização, como na ação anti-hemolítica, sugerindo que esta planta seria promissora no tratamento via oral de úlceras de origem sífilítica, escrofulosa ou tuberculosa.

Estudos mais recentes atribuem à *Smilax aspera* propriedades analgésicas (Monteiro & Andreatta, 1997), além de antioxidantes devido à presença de um componente fenólico denominado tocoferol (Demo *et al.*, 1998). Para *Smilax goyazana* A. DC. são atribuídas propriedades depurativas, anti-reumáticas, diuréticas e para problemas hepáticos (Almeida *et al.*, 1998) (Tabela 1).

A propriedade anti-reumática foi comprovada pelo estudo de Jiang & Xu (2003), que demonstrou a atividade do extrato aquoso do ‘rizoma’ (aqui referido como rizóforo) de *Smilax glabra* Roxb. atuando como agente terapêutico em doenças imuno-inflamatórias, como é o caso da artrite reumática em ratos (Tabela 1).

O objetivo do presente trabalho foi analisar o perfil químico de *Smilax brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* Grisebach, ainda não descritos na literatura, visando verificar se as substâncias encontradas em seu extrato são similares às encontradas na literatura e avaliar dessa maneira sua possível atividade farmacológica.

Tabela 1. Panorama químico-farmacológico de espécies de *Smilax* já estudadas.

Espécie	Substâncias identificadas	Atividade farmacológica	Referências
<i>Smilax aspera</i> (frutos)	-antocianinas	ND	Longo & Vasapollo, 2006
<i>Smilax aspera</i> (folhas)	-flavonóides -tocoferol	Antioxidante	Demo et al., 1998
<i>Smilax bockii</i> (raiz)	-flavonóides ácidos fenólicos	Antiinflamatória	Xu et al., 2005
<i>Smilax bockii</i> (rizóforo)	-flavonóides, -ácidos fenólicos glicosilados, -cromonas.	ND	Guo et al., 2004
<i>Smilax bracteata</i> (rizóforo)	-flavonóides -estilbeno -fenilpropanóides glicosilados	ND	Li et al., 2002
<i>Smilax china</i> (caule)	-fenilpropanóides glicosilados	Citotóxica para células tumorais	Kuo et al., 2005
<i>Smilax china</i> (raiz)	ND	Antioxidante	Lee et al., 2001
<i>Smilax china</i> (rizóforo)	-saponinas	ND	Shu et al., 2004
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	-polipeptídeos	Hemaglutinante	Ng & Yu, 2001
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	- polipeptídeos	Hemaglutinante, Antiviral	Ooi et al., 2004
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	-flavonóides -cromonas -ácidos fenólicos -estilbenos	Hepatoprotetor	Chen et al., 1999
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	ND	Atividade anti-reumática	Jiang & Xu, 2003
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	ND	Antiinflamatória, doenças imunoinflamatórias	Jiang et al., 1997
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	ND	Hepatoprotetora	Xu et al., 2000
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	-flavonóides	-	Du et al., 2005
<i>Smilax glabra</i> (rizóforo)	-fenilpropanóides glicosilados	ND	Chen et al., 2000
<i>Smilax glycyphylla</i> (folhas e ramos)	-chalconas	Antioxidante	Cox et al., 2005
<i>Smilax medica</i> (raiz)	-saponinas	Antifúngica	Sautour et al., 2005
<i>Smilax menispermoides</i> (rizóforo)	-saponinas	ND	Ju & Jia, 1992
<i>Smilax officinalis</i> (rizóforo)	-saponinas	ND	Bernardo et al., 1996
<i>Smilax ornata</i>	ND	Lepra	Rollier, 1959
<i>Smilax spinosa</i> (raiz)	-antocianinas -flavonóides -taninos condensados -saponinas	Atividade anti-oxidante, Antimicrobiana	Navarro et al., 2003

ND: não determinado

2-) MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

As quatro espécies de *Smilax* foram coletadas em diferentes biomas brasileiros de acordo com a Tabela 2. Para os estudos de perfil químico, foram coletados aproximadamente 3 indivíduos de cada espécie e os órgãos vegetativos (ramos aéreos, rizóforo e raízes) foram separados, secos em estufa de ar circulante a 40°C por cinco dias e pulverizados em moinho de facas.

Tabela 2. Espécies de *Smilax* estudadas e respectivos locais de coleta.

Espécies	Local de coleta	Número de Tombo	Data de coleta
<i>Smilax brasiliensis</i> Sprengel	Itapagipe – MG S 19°32'39,6'' W 49°26'36,2''	ESA107635	Abril/2007
<i>Smilax campestris</i> Grisebach	Porto Alegre - RS S 30°03'34.2'' W51°07'31.8''	ESA107658	Janeiro/2007
<i>Smilax cissoides</i> Martius ex Grisebach	Feira de Santana – BA S 12°12'07'' W 38°57'57.4''	ESA107659	Julho/2006
<i>Smilax polyantha</i> Grisebach	Fazenda Palmeira da Serra em Pratânia – SP S 22°48'49.3'' W48°44'33.2''	ESA107649	Dezembro/2005

Preparação dos extratos

Para *Smilax polyantha*, os pós resultantes dos ramos, raízes e rizóforo, padronizados no tamanho médio das partículas, foram submetidos aos processos de extração a frio por maceração em CHCl₃ a fim de remover pigmentos apolares. Posteriormente, seguiu-se a percolação da torta (pó resultante da maceração) em MeOH. Após cada extração, os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro pregueado, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (em temperatura inferior a 40°C), transferidos para vidros tarados e deixados em capela até completa eliminação dos solventes, obtendo-se os extratos ECHCl₃ e EMeOH de cada parte da planta (Figura 1).

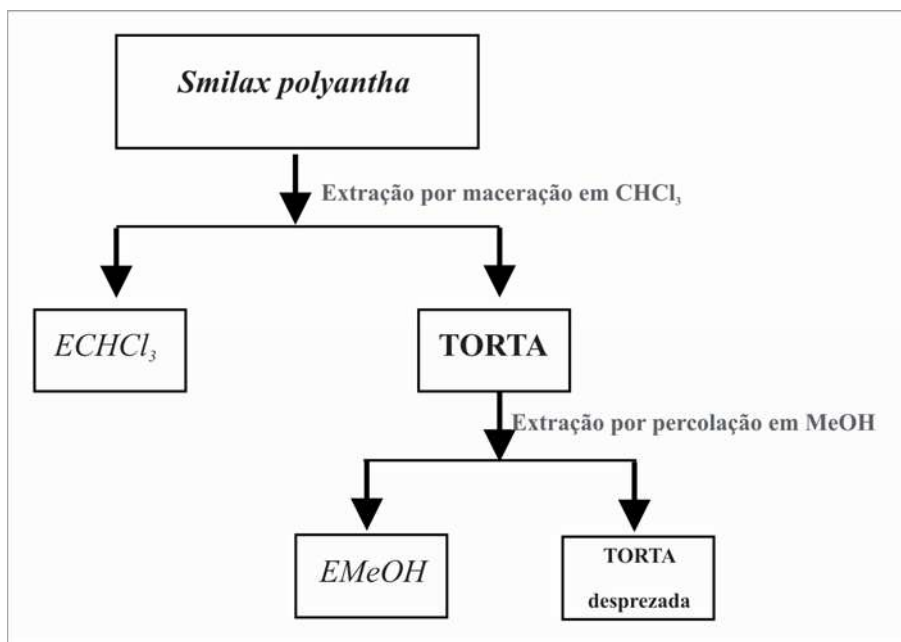


Figura 1. Procedimento geral empregado na preparação dos extratos dos ramos, raízes e rizóforo de *S. polyantha*.

Para as demais espécies, os pós resultantes dos ramos, raízes e rizóforo foram submetidos à extração a frio por maceração em metanol (5g pó/200 mL de solvente, 2 horas de banho ultrassônico). Os extratos obtidos foram filtrados em papel-filtro pregueado, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (em temperatura inferior a 40°C), transferidos para vidros tarados e deixados em capela até completa eliminação dos solventes, obtendo-se os extratos metanólicos de cada parte da planta.

Tentativa de purificação do extrato metanólico de *Smilax polyantha*

Uma vez que havia maior disponibilidade de material vegetal coletado de *S. polyantha*, o extrato metanólico (EMeOH) desta foi escolhido para ser purificado, na tentativa de caracterizá-lo quimicamente.

Inicialmente o EMeOH foi submetido a uma triagem cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). Uma alíquota (10 mg) de todos os EMeOH foi dissolvida em 5 mL de MeOH e analisada por CCDC (sílica gel) utilizando

como fases móveis as fases orgânicas das misturas de CHCl₃/MeOH/H₂O 43:37:20 v/v, CHCl₃/MeOH/*n*-Prop/H₂O 5:6:1:4 v/v e BAW 4:1:5. Após eluição, as placas cromatográficas foram visualizadas sob luz UV de 254 nm e, em seguida, reveladas com reveladores gerais e específicos: cloreto férrico a 3% (compostos fenólicos), anisaldeído/H₂SO₄ (flavonóides, saponinas, terpenóides, esteróides e catequinas), NP/PEG (flavonóides) e iodo platinado (alcalóides) (Wagner et al., 1984). Também realizou-se o teste de agitação aquosa para a detecção de saponinas e precipitação com proteínas para taninos (Matos, 1997).

Em seguida, realizou-se a purificação por cromatografia em coluna. Uma alíquota de 2 g deste extrato foi solubilizada em metanol, centrifugada e o sobrenadante foi fracionado por Cromatografia de Permeação em Gel (Sephadex LH-20), utilizando-se metanol como eluente. Os tubos coletados (2 mL cada) foram analisados por CCDC (sílica gel, CHCl₃/MeOH/*n*-Prop/H₂O 5:6:1:4 v/v) e reunidos conforme similaridade de R_f's e colorações diante dos reveladores empregados. As frações resultantes foram purificadas por técnicas de cromatografia em coluna convencionais (HPLC, MPLC), utilizando diferentes fases estacionárias (sílica fase normal e fase reversa, polivinilpirrolidona) e sistemas eluentes.

Determinação dos perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das espécies de *Smilax* por HPLC-UV-PDA

Devido à complexidade do extrato em estudo, evidenciado pelos resultados obtidos com as tentativas de purificação por cromatografia em coluna e análise por CCDC, optamos por determinar o perfil cromatográfico do EMeOH de raízes, ramos e rizóforo das espécies de *Smilax* através de HPLC-UV-PDA pois este tipo de acoplamento (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Diodos) serve como ferramenta auxiliar na caracterização de matrizes vegetais.

A etapa inicial neste tipo de análise consiste em otimizar o sistema de eluição a fim de se obter uma adequada separação e visualização dos compostos presentes nos extratos de raízes, rizóforos e folhas das espécies estudadas. Para isso, foi eleita *Smilax polyantha*, dado o reconhecimento prévio de algumas das classes de constituintes nela presentes.

Sendo assim uma alíquota de 30 mg de cada extrato (ramos, raízes e rizóforos) foi individualmente dissolvida em 1 mL de MeOH/H₂O 8:2 v/v, filtrada em filtro Millex de 0,45 μ m e em filtro de 0,22 μ m. As soluções foram submetidas ao fracionamento em cartucho Sep-Pak RP18 (Supelco, com 100 mg de adsorvente), eluído com uma mistura de MeOH/H₂O 8:2 v/v. Os eluatos finais foram investigados sob diferentes condições de análise, variando-se a fase móvel, o fluxo e comprimento de onda (200 a 400 nm). Após otimização da condição de eluição, foram realizados experimentos de co-injeção dos eluatos obtidos da SPE (solid phase extraction - extração em fase sólida) com padrões comerciais (Tabela 3) a 1 mg/mL - na proporção de 4:1 - e comparação dos tempos de retenção e espectros de ultra-violeta dos picos presentes com os dos padrões utilizados.

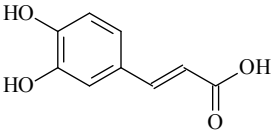
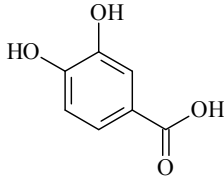
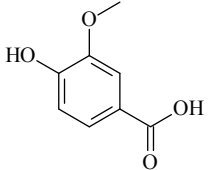
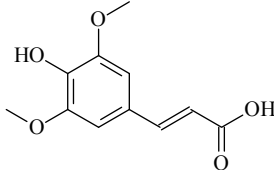
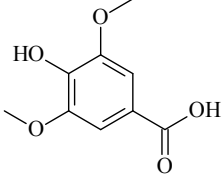
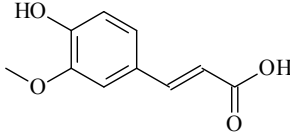
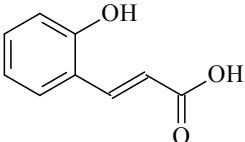
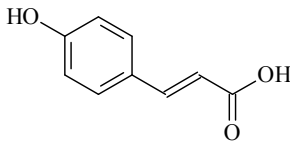
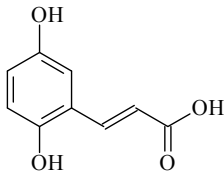
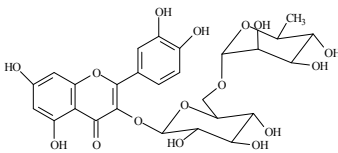
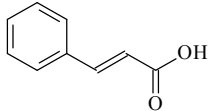
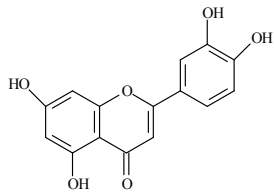
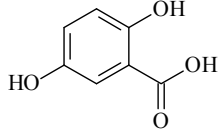
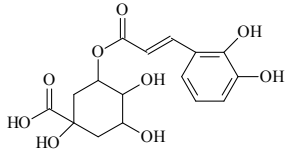
Por fim, o mesmo procedimento foi realizado com as demais espécies a fim de se obter um panorama geral dos perfis químicos e estabelecer possíveis correlações existentes entre elas.

Testes farmacológicos para atividade antiinflamatória

Com a finalidade de avaliar possível atividade anti-edematogênica desses extratos e frações enriquecidas utilizamos o método de indução de edema de pata em ratos Wistar pela carragenina (Levy 1969; Henriques et al. 1987). Os animais (n=7) foram divididos em grupos: controle positivo (salina), controle negativo (Piroxicam 30 mg/Kg) e a substância teste (extratos metanólico de raízes de *S. polyantha* nas concentrações 250 e 500 mg/Kg). Os tratamentos (substância teste e grupo controle) foram administrados via oral 1 hora antes da indução do edema pela injeção subcutânea de 100 μ l/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 μ l/ pata de salina estéril na pata esquerda. Fez-se a medição de ambas as patas. O resultado foi dado pela diferença de volume deslocado entre as patas carragenina e salina em ml em plestismômetro Ugo Basile.

Os testes farmacológicos foram realizados no Laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP com o auxílio da equipe da Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima.

Tabela 3. Padrões utilizados na caracterização dos perfis cromatográficos.

Substância	Estrutura	Substância	Estrutura
Ácido cafeico		Ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (protocatecúico)	
Ácido vanílico		Ácido sinápico	
Ácido siringico		Ácido ferúlico	
Ácido <i>o</i> -cumárico		Ácido <i>p</i> -cumárico	
Ácido homogentísico		Rutina	
Ácido <i>trans</i> -cinâmico		Luteolina	
Ácido 2,5-dihidroxibenzóico		Ácido clorogênico	

3-) RESULTADOS

Rendimento dos extratos preparados

Os rendimentos dos extratos metanólicos após a evaporação dos solventes estão apresentados na Tabela 4. O rendimento encontrado para ramos aéreos varia entre 3,6% (*S. polyantha*) e 11,18% (*S. cissoides*), para rizóforo varia entre 6,39% (*S. polyantha*) e 8,54% (*S. campestris*), para raiz entre 5,23% (*S. polyantha*) e 11,12% (*S. campestris*). Para todas as espécies investigadas, as raízes apresentaram os maiores rendimentos de extração, seguidas dos rizóforos e folhas.

Tentativa de purificação do extrato metanólico de *Smilax polyantha*

As análises cromatográficas (CCDC) dos extratos metanólicos de raiz, rizóforo e ramos de *S. polyantha* evidenciaram a presença de manchas com colorações típicas de compostos fenólicos, flavonóides e saponinas, diante dos reveladores utilizados (Tabela 5). A presença desta última classe foi confirmada pela formação de espuma persistente após agitação.

Tabela 4. Quantidades de extratos obtidos a partir dos ramos aéreos, do rizóforo e das raízes das espécies de *Smilax*.

Espécie	Parte utilizada	Massa obtida (g)	Rendimento do EMeOH (%)
<i>Smilax brasiliensis</i>	Ramos aéreos	0,195	3,9
	Rizóforo	0,427	8,54
	Raíz	0,537	10,74
<i>Smilax campestris</i>	Ramos aéreos	0,347	6,94
	Rizóforo	0,346	6,92
	Raíz	0,556	11,12
<i>Smilax cissoides</i>	Ramos aéreos	0,559	11,18
	Rizóforo	0,355	7,1
	Raíz	0,550	11
<i>Smilax polyantha</i>	Ramos aéreos	25,9	3,63
	Rizóforo	18,02	6,39
	Raíz	25,03	5,23

Tabela 5. Triagem fitoquímica dos extratos de *Smilax polyantha* Grisebach.

Classe de compostos	EMeOH		
	Raiz	Rizóforo	Ramos
Terpenos	-	-	-
Flavonóides	+	+	+
Compostos fenólicos	+	+	+
Saponinas	+	+	+
Taninos	+	+	+

Os sinais (+) e (-) indicam presença ou ausência da classe de compostos.

A análise das frações provenientes do fracionamento por Sephadex do extrato metanólico de *S. polyantha* demonstrou (de acordo com os resultados obtidos por CCCD) que estas eram constituídas por uma mistura complexa de compostos fenólicos, flavonóides e saponinas. Apesar das sucessivas tentativas de purificação, não foi alcançado o isolamento dos constituintes ali presentes.

Estabelecimento da comparação entre os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos das demais espécies de *Smilax* por HPLC-UV-PDA

As análises feitas por HPLC-UV-PDA permitiu a identificação dos picos 4 (ácido clorogênico, Tr 15,1 min), 11 (ácido cafeico, Tr 17,6 min), 25 (rutina, Tr 22,5 min), 30 (ácido *p*-cumárico, Tr 23,8 min), 34 (ácido ferúlico, Tr 25,8 min) e 66 (ácido *trans*-cinâmico) nos extratos de raiz, rizóforo e folhas (Figuras 2-3 e Tabela 6). Os demais picos ainda não foram identificados.

Com estas análises também observamos que as espécies estudadas apresentam-se quimicamente semelhantes. Verificou-se que os ácidos clorogênico, *p*-cumárico e ferulico (correspondentes aos picos 4, 30, 34 respectivamente), são comuns no metabolismo secundário de todas as espécies estudadas.

Embora as classes de substâncias sejam semelhantes entre as espécies, alguns picos que aparecem na Figura 2 e Tabela 3 são particulares para algumas espécies e estes dados podem referendar peculiaridade taxonômica destas plantas através do seu metabolismo secundário. Sendo assim os picos 9, 14 e 59 só estão presentes nos extratos metanólicos de *S. cissoides* e os picos 5, 23, 27 e 43 só estão presentes em *S. polyantha*.

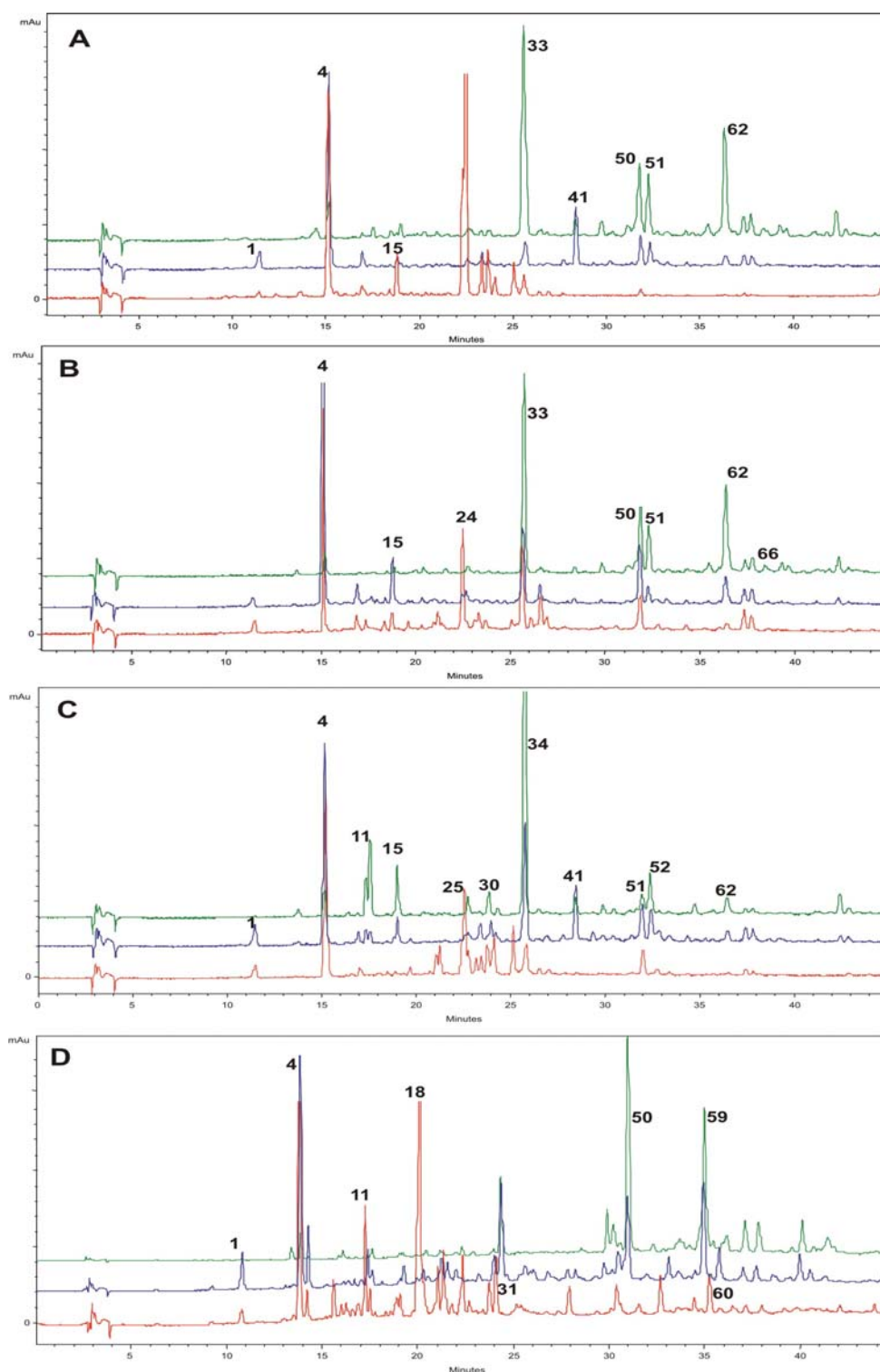


Figura 2. Perfil cromatográfico dos extratos MeOH de *S. brasiliensis* (A), *S. campestris* (B), *S. cissooides* (C) e *S. polyantha* (D) (RP18 250 x 4,6 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 5 % de B em A em 15 min, 20 % de B em A em 45 min, 40 % de B em A em 48 min e 100% de B até 60 min; vazão 1,0 ml/min, λ 330nm. (verde) raiz, (azul) rizóforo, (vermelho) folhas.

Tabela 6. Tempos de retenção relacionados a cada um dos picos dos espectros observados nos cromatogramas das espécies *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* da Figura 2. (Ra) raiz, (Ri) rizóforo, (Fo) folhas.

Pico	Tr	<i>Smilax brasiliensis</i>			<i>Smilax campestris</i>			<i>Smilax cissoides</i>			<i>Smilax polyantha</i>			Pico	Tr	<i>Smilax brasiliensis</i>			<i>Smilax campestris</i>			<i>Smilax. cissoides</i>			<i>Smilax polyantha</i>		
		Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo			Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo	Ra	Ri	Fo
1	11,4		x	x		x	x		x	x		x	x	38	27,0						x		x				
2	13,6	x	x	x	x			x						39	27,8		x					x				x	
3	14,4	x										x		40	28,0											x	
4	15,1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	41	28,3	x	x		x	x		x	x				
5	15,3										x	x	x	42	28,5												
6	16,1													43	28,8											x	x
7	16,6													44	29,0												
8	16,9	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x	45	29,3		x					x					
9	17,1									x				46	29,7	x			x	x	x	x	x				x
10	17,3	x				x		x	x			x	x	47	30,2	x	x					x	x		x	x	x
11	17,6	x				x		x	x			x	x	48	30,4						x				x	x	
12	18,0			x						x		x	x	49	31,2	x			x			x	x				
13	18,4	x	x	x	x	x	x		x	x		x	x	50	31,8	x	x	x	x	x	x				x	x	x
14	18,6								x					51	32,0	x			x			x	x	x			
15	18,8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	52	32,2		x			x		x	x		x		
16	19,0	x										x	x	53	32,5	x	x	x	x	x	x					x	x
17	19,7						x		x	x				54	32,8							x	x	x		x	x
18	20,4				x	x	x				x	x	x	55	33,2	x	x		x	x		x	x	x		x	
19	20,9	x	x							x				56	33,5												
20	21,0						x			x				57	34,3	x	x		x	x	x		x				x
21	21,2						x			x				58	34,5	x									x	x	
22	21,5				x						x	x	x	59	34,7							x					
23	21,7										x	x		60	35,4	x			x				x				x
24	22,3			x		x	x							61	35,6											x	
25	22,5		x	x	x	x	x			x				62	36,2	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x
26	22,8							x	x	x		x	x	63	36,6											x	
27	23,0											x	x	64	37,3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
28	23,2	x	x	x			x			x				65	37,7	x	x		x	x	x	x	x	x		x	
29	23,5	x	x	x			x		x	x		x	x	66	38,2	x			x						x	x	x
30	23,8	x	x	x			x	x	x	x	x			67	39,1	x			x						x	x	x
31	24,1			x					x	x			x	68	39,6	x			x						x		x
32	25,1			x						x				69	40,2										x		x
33	25,5	x	x	x	x	x	x					x		70	41,7	x			x							x	
34	25,8							x	x	x		x	x	71	42,2	x			x	x		x			x	x	x
35	26,2						x					x		72	42,4							x				x	x
36	26,5	x	x	x	x	x	x			x		x		73	42,7	x			x	x		x	x		x	x	
37	26,8	x	x	x			x																				

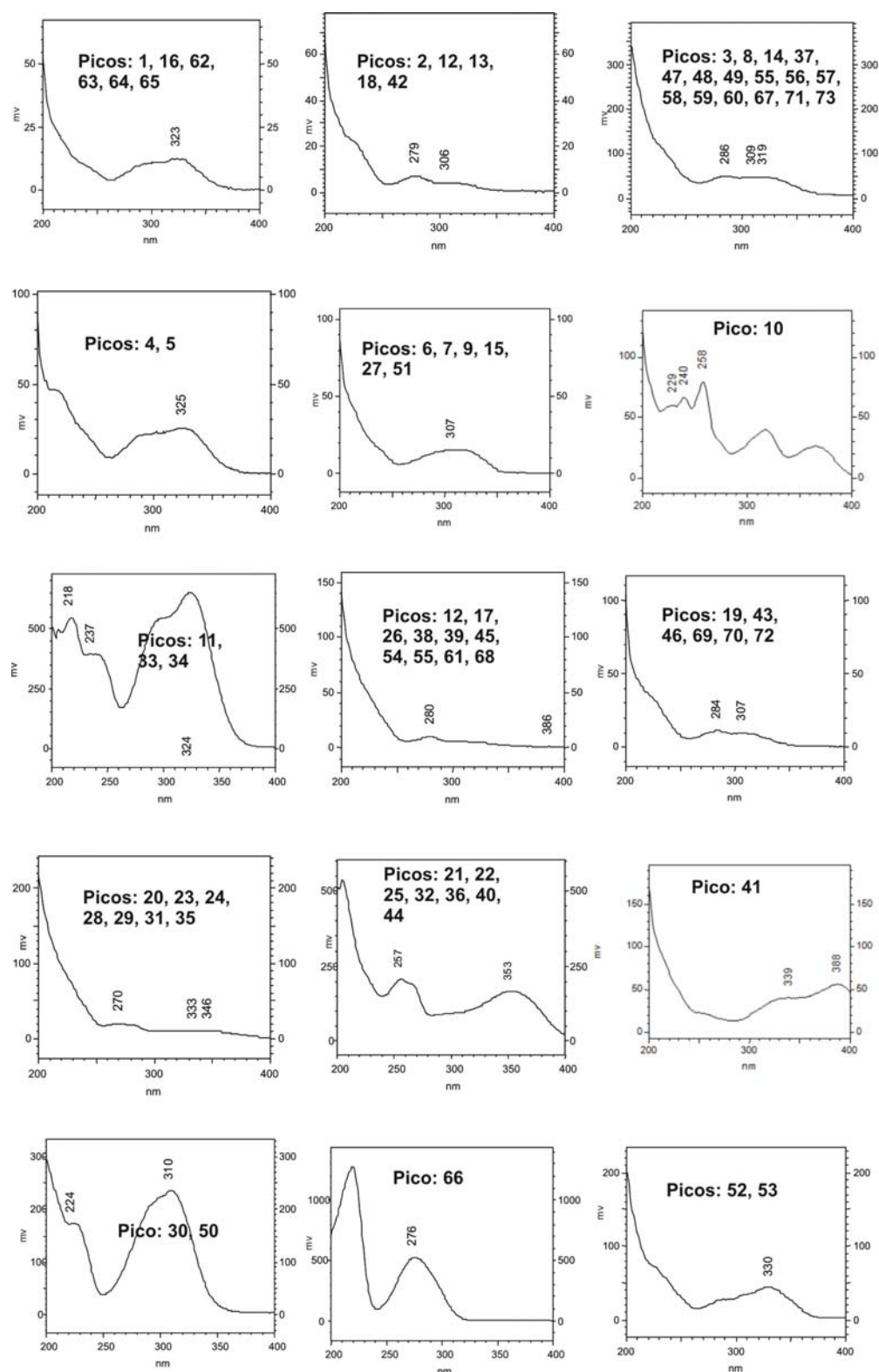


Figura 3. Espectros representativos na região do ultravioleta referentes aos picos indicados nos cromatogramas dos extratos MeOH de *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha*.

Testes farmacológicos para atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das raízes de *S. polyantha* (250 e 500 mg/kg) foi avaliada durante 4 horas após a indução da lesão com carragenina (Figura 4). Porém, os extratos administrados das duas doses selecionadas (250 e 500 mg/kg) não promoveram significativa ação antiedematogênica através da administração oral do extrato (Tabela 7) quando comparados aos animais tratados com a droga padrão piroxicam (30 mg/Kg).

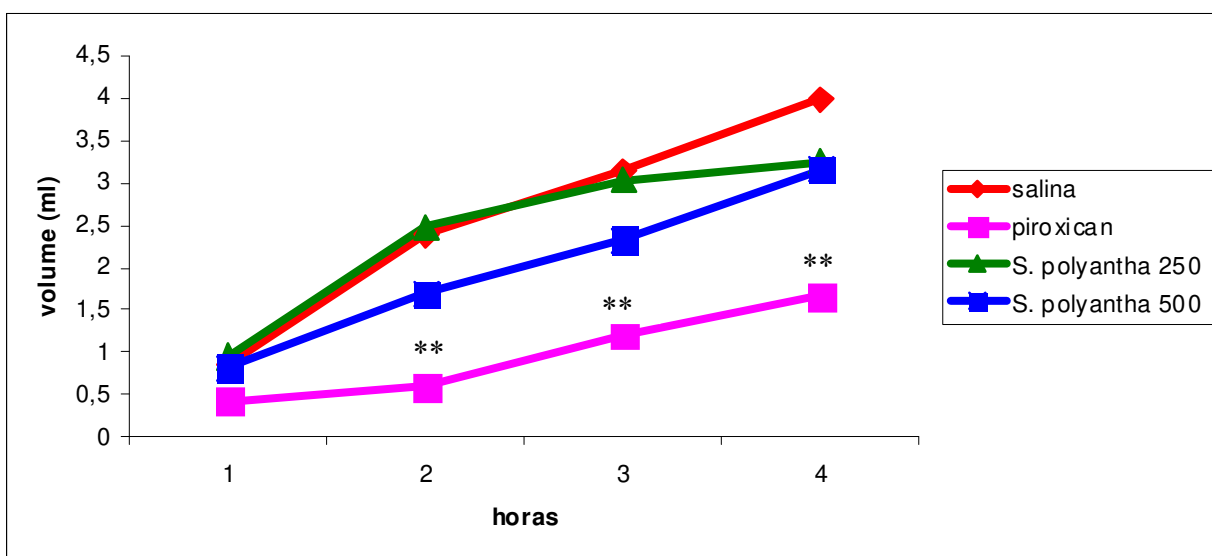


Figura 4. Evolução temporal do volume da pata (ml) de ratos submetidos à indução da inflamação com carragenina durante 4 horas de observação e tratados com extrato metanólico de raízes de *S. polyantha* (dose de 250 e 500 mg/kg), solução salina (controle negativo) ou piroxicam (controle positivo). *diferença estatística.

Tabela 7. Efeito do extrato metanólico das raízes de *S. polyantha* sobre a indução da lesão com carragenina nas patas de ratos Wistar.

Tratamento	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Salina (p.o.)	0.8614 ± 0.3307	2.389 ± 0.9680	3.140 ± 0.6328	3.979 ± 0.7458
Piroxicam 30mg/kg (p.o)	0.4257 ± 0.3486	0.5943 ± 0.2821**	1.214 ± 0.8042**	1.670 ± 0.7948**
<i>S. polyantha</i> 250 mg/kg (p.o)	0.9514 ± 0.4018	2.484 ± 0.5165	3.030 ± 0.5415	3.253 ± 0.5284
<i>S. polyantha</i> 500 mg/ kg (p.o)	0.8233 ± 0.2404	1.698 ± 0.3147	2.328 ± 0.3774	3.157 ± 0.4672

ANOVA $F_{(3;23)} = 3.291$ para 1ª hora. $F_{(3;23)} = 14.913$ para 2ª hora. $F_{(3;23)} = 14.411$ para a 3ª hora. $F_{(3;23)} = 14.411$ para 4ª hora. Teste Dunnett ** $p < 0,01$. Os resultados foram expressos como média em mililitros ± desvio padrão (n=6-7).

4-) DISCUSSÃO

A análise por HPLC dos diferentes extratos de *Smilax* revelou a presença de 73 compostos, conforme apresentado na Tabela 6, embora somente os ácidos clorogênico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e o *trans*-cinâmico e do flavonóide rutina foram identificados corroborando com os dados dos estudos já realizados com outras espécies de *Smilax*, que demonstraram a presença de ácidos fenólicos nas raízes e rizóforo de *Smilax bockii* (Xu et al., 2005; Guo et al., 2004) e no rizóforo de *S. glabra* (Ooi et al., 2004; Du et al., 2005) e de flavonóides em folhas de *S. aspera* (Demo et al., 1998).

Segundo Li et al. (2002), os ácidos fenólicos estão envolvidos em processos de lignificação dos tecidos vegetais. Outros autores como Taiz & Zeiger (2004), relacionam tais compostos com a função de proteção do organismo vegetal contra patógenos.

Segundo Carvalho et al. (2001), tais compostos fenólicos pertencem a uma classe de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem ao menos um anel aromático no qual, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Diversos compostos fenólicos são utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica como flavorizantes (aldeído cinâmico e vanilina) e corantes de alimentos e

bebidas, como antioxidantes (ácido clorogênico, ácido cafeico), e ainda possuem atividade antibacteriana e antiviral (ésteres do ácido cafeico).

Para o gênero *Smilax*, em particular, a presença de substâncias como ácidos fenólicos e flavonóides pode estar relacionada a atividade antioxidante, antiinflamatória, anti-reumática e como hepatoprotetor, como demonstram os ensaios farmacológicos realizados com extratos das espécies *S. aspera*, *S. bockii* e *S. glabra* (Jiang et al., 1997; Demo et al., 1998; Chen et al., 1999; Jiang & Xu, 2003 e Xu et al., 2005).

Os resultados observados nas análises químicas, ou seja, a identificação de compostos de classes de ácidos fenólicos reforça e corresponde com análises anatômicas realizadas para esse grupo de plantas, uma vez que em idioblastos presentes nos tecidos das folhas, raízes e rizóforos foi detectada a presença de derivados de ácidos fenólicos através de reagentes específicos como cloreto férrico (Martins & Appezzato-da-Glória, 2006).

Observou-se que não ocorrem diferenças entre as classes de compostos observadas nos extratos analisados, porém, ocorrem diferenças qualitativas entre o perfil químico das raízes e rizóforo entre as espécies investigadas como observado na Tabela 6. O mesmo também ocorre entre as folhas das espécies estudadas. Nessas, além dos ácidos acima mencionados, são observados flavonóides.

Diante destas semelhanças, somente a partir do perfil químico não é possível propor a identificação das espécies do gênero *Smilax*, porém talvez seja possível associar outros caracteres tais como características anatômicas para compor grupos de espécies semelhantes. Além disso, não podemos esquecer que podem ocorrer diferenças na produção de metabólicos secundários decorrentes da pressão ambiental a que as espécies estão submetidas o que pode comprometer análises isoladas.

Apesar dos estudos que já comprovam as atividades antiinflamatórias para os extratos de raízes e rizóforo do gênero *Smilax* (Jiang et al., 1997; Xu et al., 2005) e propriedades analgésicas (Monteiro & Andreato 1997), em nossos estudos com os extratos de raiz de *S. polyantha* nas concentrações de 250 e 500mg/kg não detectamos atividade antiedematogênica significativa através da administração oral do extrato. Embora a atividade anti-inflamatória não tenha sido detectada para o presente experimento, devemos considerar que alguns extratos embora não apresentem atividade no edema de pata pela via oral, às vezes podem apresentar atividade antiedematogênica pela via intraperitoneal ou

mesmo uma resposta antiinflamatória por outros modelos experimentais. Portanto, ainda seriam indicadas outras avaliações com este extrato (modelo de formalina e dosagem de citocinas *in vitro*) para finalmente descartar uma ação anti-inflamatória deste extrato.

5-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, S.P., Proença, C.E.B., Sano, S.M. & Ribeiro, J.F. (1998) Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa – CPAC, Planaltina.

Andreato, R.H.P. (1997) Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Pesquisas–Botânica, 47: 7-244.

Bernardo, R.R.; Pinto, A.V. & Parente, J. P. (1996) Steroidal saponins from *Smilax Officinalis*. Phytochemistry, 43: 465-469.

Carvalho, J. C. T; Gosmann, G. & Schenkel, E. P. (2001) Compostos fenólicos simples e heterosídicos. *In* Farmacognosia: da planta ao medicamento (C.M.O. Simões; E. P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P.Melo; L.A. Mentz & P.R. Petrovick, eds.) Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p. 443-460.

Chen, T.; Li, J. & Xu, Q. (2000) Phenylpropanoid glycosides from *Smilax glabra*. Phytochemistry, 53: 1051-1055.

Chen, T.; Li, J.; Cao, J.; Xu, Q.; Komatsu, K. & Namba, T. (1999) A new flavonone isolated from rhizome *Smilacis Glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. *Planta medica*, 65: 56-59.

Cox, S.D.; Jayasinghe, K.C. & Markham, J.L. (2005) Antioxidant activity in Australian native sarsaparrilha (*Smilax glyciphylla*). *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 162-168.

Demo, A.; Petrakis, C.; Kefalas, P. & Boskou, D. (1998) Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. *Food Research International*, 31: 351-354.

Du, Q.; Li, L. & Jerz, G. (2005) Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1077: 98-101.

FARMACOPÉIA (PHARMACOPÉIA) DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. (1929)

Redigida por SILVA, R.A.D. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional.

Guo, M.; Koike, K.; Li, W.; Guo, D. & Nikaido, T.(2004) Maltol glucosides from the tuber of *Smilax bockii*. *Phytochemistry*, 65: 481-484.

Henriques M.G.; Silva P.M.; Martins, M.A.; Flores, C.A.; Cunha, F.Q.; Assrey- Filho J.; Cordeiro, R.S. (1987) Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 20: 243-249.

Jiang, J. & Xu, Q. (2003). Immunomodulatory activity of aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 53-59.

Jiang, J.; Wu, F.; Lu, J.; Lu, Z. & Xu,Q. (1997) Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from rhizoma *Smilacis glabrae*. *Pharmacological Research*, 36: 309-314.

Ju, y. & Jia, Z. (1992) Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax menispermoides*. *Phytochemistry*, 31: 1349-1351.

Kuo, Y.H.; Hsu, Y.W.; Liaw, C.C.; Lee, J.K.; Huang, H.C. & Kuo, L.M.Y. (2005) Cytotoxic phenylpropanoid glycosides from the stems of *Smilax china*. *Journal of Natural Products*, 68: 1475-1478.

Lee, S.E.; Ju, E.M. & Kim, J.H. (2001) Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental and Molecular Medicine*, 33: 263-268.

Levy, L. (1969) Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sciences*, 8: 601-606.

Li, S.L.; Fuchino, H.; Kawahara, N.; Sekita, S. & Satake, M. (2002). New phenolic constituents from *Smilax bracteata*. *Journal of Natural Products*, 65:262-266.

Longo, L. & Vasapollo, G. (2006) Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry*, 94: 226-231.

- Martins, A.R., Appezzato-da-Glória, B. (2006) Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 555-567.
- Matos, J. F. A. (1997) Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: EUFC.
- Monteiro, M.H.D.A. & Andreata, R.H.P. (1997) A pharmacological and botanical study of *Smilax quinquenervia* Vellozo from Brazil. Uso Y manejo de recursos Vegetales. *In*. Memorias del Segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica Económica, 383-395.
- Navarro, M.C.; Montilla, M.P.; Ca, M.M.; Galisteo, M.; Cáceres, A.; Morales, C. & Berger, I. (2003) Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research*, 17: 325-329.
- Ng, T.B. & Yu, Y.L. (2001) Isolation of novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33: 269-277.
- Ooi, L.S.M., Sun, S.S.M., Wang, H., and Ooi, V.E.C. (2004) New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of salsaparrilha *Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6091-6095.
- Rollier, R. (1959) Treatment of lepromatous leprosy by a combination of DDs and sarsaparrilha (*Smilax ornata*). *International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases*, 27: 328-340.
- Sautour, M.; Miyamoto, T. & Lacaille-Dubois, M.A. (2005) Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity. *Journal of Natural Products*, 68: 1489-1493.
- Shu, X.S.; Gao, Z.H. & Yang, X.L. (2004) Supercritical fluid extraction of sapogenins from tubers of *Smilax china*. *Fitoterapia*, 75: 656-661.
- Stellfeld, C. (1938) A salsaparilha do Paraná e a ausência do parênquima cortical. *Tribuna Farmacêutica*, 6: 5-7.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed.
- Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainsky, E. (1984) *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer.

Xu, J.; Li, X.; Zhang, P.; Li, Z. & Wang, Y. (2005) Antiinflammatory constituents from the roots of *Smilax bockii* Warb. Archives of Pharmacal Research, 28: 395-399.

Xu, Q.; Cao, J.; Wu, F.; Chen, T. & Jiang, J. (2000) Aqueous extract from rhizoma *Smilacis Glabrae* alleviates immunological liver damage by selectively facilitating the dysfunction of liver-infiltrating lymphocytes. Pharm Pharmacol Commun, 6: 41-47.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a resolução da Anvisa (RDC nº. 48, 16/03/2004), um fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, e é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e padrão de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos. Ainda segundo tal regulamentação todo fitoterápico deve apresentar nomenclatura botânica oficial completa (gênero, espécie, variedade, autor do binômio, família); seu princípio ativo deve ser quimicamente caracterizado (substâncias ou classes químicas), assim como sua ação farmacológica deve ser conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico.

Seguindo tal recomendação, o presente trabalho buscou caracterizar de maneira abrangente algumas espécies de *Smilax*, ainda não estudadas do ponto de vista de anatomia, germinação e química, as quais são atribuídas propriedades medicinais de uso popular, visando associar características botânicas, químicas, farmacológicas e possibilidades de cultivo e desenvolvimento que permitam que esse medicamento, que é comercializado nas farmácias brasileiras sem nenhum controle de qualidade ou eficácia, tenha base científica suficiente para despertar na indústria interesse e assim possa realmente tornar-se um fitoterápico.

Diante de tal proposta as espécies que se destacaram durante o estudo e que poderiam interessar para indústria foram *S. campestris* e *S. cissoides*, que apresentaram melhor resposta ao desenvolvimento e germinação de sementes, o que se mostrou ser um fator fundamental para condução de experimentos mais aprofundados, uma vez que as análises químicas e farmacológicas dependem de uma grande quantidade de matéria prima vegetal. Ainda em relação às análises químicas e anatômicas apresentadas, as quatro espécies analisadas são muito similares e, portanto, o fator de seleção deve ser a resposta na germinação de sementes. Novos ensaios farmacológicos deveriam ser realizados com as demais espécies, uma vez que realizamos apenas um ensaio preliminar com *S. polyantha*, e os dados da literatura reforçam a eficácia desse gênero no tratamento de doenças inflamatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M. & RIBEIRO, J.F. 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Embrapa – CPAC, Planaltina.
- ANDREATA, R.H.P. 1995. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANDREATA, R. H. P. 1997. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae). Pesquisas–Botânica 47: 7-244.
- ANDREATA, R. H. P. 2000. Smilacaceae *In* Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil). Instituto de Botânica, São Paulo, v. 7.
- ANDREATA, R. H. P. & MENEZES, N.L. 1999. Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 18: 39-51.
- ARBER, A. 1920. Tendrils of *Smilax*. Botanical Gazette 69: 438-442.
- BARRADAS, M.M. & FIGUEIREDO, R.C.L. 1974. Contribuição ao estudo da nervação foliar de plantas dos cerrados – Liliaceae, subfamília Smilacoideae. Hoehnea 4: 1-11.
- BRASIL. 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. In: D.O.U. – Diário Oficial da União. Março de 2004.
- CAPONETTI, J.D. & QUIMBY, M.W. 1956. The comparative anatomy of certain species of *Smilax*. Journal of the American Pharmaceutical Association 45:691-696.
- CUNHA, N. S. 1937 a. Curiosa falsificação de salsaparrilha. Revista da Associação Brasileira de Farmácia 18: 399-352.
- CUNHA, N. S. 1937 b. Da salsaparrilha a japacanga. Tribuna Farmacêutica 5: 145-150.
- DAVIS, W.T. 1891. Variations in rootstock of *Smilax glauca* dependent upon environment. Bulletin of the Torrey Botanical Club 18: 118-119.
- DEMO, A., PETRAKIS, C., KEFALAS, P. & BOSKOU, D. 1998. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. Food Research International 31: 351-354.
- ERVIN, E.L. & EVERT, R.F. 1967. Aspects of sieve element ontogeny and structure in *Smilax rotundifolia*. Botanical Gazette 128: 138-144.

- FARMACOPÉIA (PHARMACOPÉIA) DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 1929. Redigida por SILVA, R.A.D. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional.
- FERREIRA, S. H., BARATA, L.E.S., SALLES, S. L. M., QUEIRÓZ, S.R.R., HELUY NETO, N. E., CORAZZA, R. & FARIAS, R.C. 1998. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências.
- GATTUSO, S.J. 1995. Exomorfología y anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). Acta Farmacéutica Bonaerense, 14: 181-190.
- GLORIA, V.S.; MOURA, A.M.F. & FIGUEIREDO, C.O. 2004. Laboratório Simões. Melhores estudos de casos de sucesso da pequena empresa – Sebrae, 14p.
- GUIMARÃES, A. R. 2009. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax quinquenervia* Vell. e *S. subsessiliflora* Duham. (Smilacaceae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional. 70p.
- HOLM, T. 1890. Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. Memoirs of the Torrey Botanical Club 2: 57-108.
- JIANG, J. & XU, Q. 2003. Immunomodulatory activity of aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. Journal of Ethnopharmacology 85: 53-59.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. 2009. Sistemática Vegetal - Um Enfoque Filogenético. Artmed, Porto Alegre.
- LORENZI, H. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, Instituto Plantarum
- MANDARIM-DE-LACERDA, A.F., ANDREATA, R.H.P. & PERES-NETO, P.R. 1992. Ensaio metodológico de avaliação biométrica em folhas adultas de *Smilax rufescens* (Smilacaceae). Pesquisas – Botânica 43: 199-221.
- MANDARIM-DE-LACERDA, A.F. & ANDREATA, R.H.P. 1994/1995. Estudo comparado entre folhas adultas de *Smilax* L. (Smilacaceae - Liliopsida) do sul do Brasil. Pesquisas – Botânica 45: 77-114.
- MARQUETE, O. & PONTES, R.G. 1994. Estudo anatômico foliar comparativo de *Smilax spicata* Vell., *Smilax rufescens* Griseb. e *Smilax fluminensis* Steudel. Revista Brasileira de Biologia 54: 413-426.

- MARTIN, B.F. & TUCKER, S. C. 1985. Developmental studies in *Smilax* (Liliaceae) I. Organography and the shoot apex. *American Journal of Botany* 72: 66-74.
- MARTINS, A.R. & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. 2006. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Grisebach (Smilacaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 29: 555-567.
- MEDEIROS, M.F.T.; SENNA-VALLE, L. & ANDREATA, R.H.P. 2007. Histórico e o uso da “salsaparrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. *Revista Brasileira de Biociências*, 5:27-29.
- MING, L.C. 1994. Estudos e pesquisas de plantas medicinais na agronomia. *Horticultura Brasileira* 12: 3-9.
- MONTEIRO, M.H.D.A. & ANDREATA, R.H.P. 1997. A pharmacological and botanical study of *Smilax quinquenervia* Velloso from Brazil. *Memorias del Segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica* 383-395.
- OLIVEIRA, F., SILVA, J. B. & ROCHA, A. B. 1973. Contribuição para o reconhecimento do rizoma de *Smilax japecanga* Grisebach. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara* 7: 7-18.
- PALHARES, D. & SILVEIRA, C.E.S. 2005. Estudo anatômico do rizoma de *Smilax goyazana* A. DC. (Smilacaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8: 52-62.
- PALHARES, D., SILVEIRA, C.E.S., ZAIDAN, L.B.P., PEREIRA, L.A.R. 2009. Leaf anatomy of *Smilax goyazana* (Smilacaceae). *Acta Botanica Hungarica*, 51: 115-127.
- SPEESE, B.M. 1939. Mitosis in leaves of *Smilax*. *American Journal of Botany* 26: 852-855.
- STELLFELD, C. 1938. A salsaparilha do Paraná e a ausência do parênquima cortical. *Tribuna Farmacêutica* 6: 5-7.
- STELLFELD, C. 1940. Sarçaparrilha e Jupicanga. *Tribuna Farmacêutica* 8: 193-202.
- VANDERCOLME, E. 1947. História botânica e terapêutica das salsaparrilhas. *Revista da flora medicinal* 7-11:316-524.