Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Morfoanatomia, perfil químico e propagação de *Smilax fluminensis* Steud.
(Smilacaceae)

Anielca Nascimento Soares

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

Piracicaba
2010

Anielca Nascimento Soares
Licenciada em Ciências Biológicas

Morfoanatomia, perfil químico e propagação de *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacaceae)

Orientador:
Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Soares, Anielca Nascimento
Morfoanatomia, perfil químico e propagação de *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacaceae) /
Anielca Nascimento Soares. - - Piracicaba, 2010.
75 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Brotação 2. Estacas (Plantas) 3. Germinação de sementes 4. Plantas medicinais 5
Salsaparrilha I. Título

CDD 633.88
S676m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

Aos meus pais Mauro e Lazineha e a minha irmã Aline, por todo apoio e amor a mim dedicado, por ser fonte única do meu viver, razão da minha existência e da minha alegria. A vocês dedico com todo o meu amor.

Ofereço

*A todos os meus familiares,
aos meus irmãos de
comunidade, e aos meus
amigos que me apoiaram
para a realização desse
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, A Deus pelo seu imenso amor para comigo, por ser verdadeiramente o meu pastor e meu eterno consolador, que em todas as horas me permite experimentar as graças do seu amor. Agradeço a cada minuto por ter me guiado e me abençoado em todas as fases desse trabalho e por tudo que Ele providencia em minha vida.

Em especial, agradeço à Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória, pela porta aberta, pela confiança, que mesmo sem me conhecer abriu com tanto carinho seu laboratório me auxiliando na realização desse sonho. Agradeço pela sua preocupação em me transmitir com tanta dedicação o seu vasto conhecimento, agradeço pela sua segura e valiosa orientação e mais ainda pela sua amizade sendo pra mim um exemplo de docente e pesquisadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

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).

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

À Dra. Aline Redondo Martins por todo apoio e pelas valiosas contribuições na realização desse trabalho.

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. Regina Helena Potsch Andreato 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 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 Luis de Queiroz” ESALQ/USP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por todo suporte técnico para realização desse trabalho.

À Maria Solizete Granziol Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e por sua dedicação aos alunos.

À Maria das Graças Ongarelli, técnica do laboratório, por todo apoio e por sua amizade.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas pelo apoio nas coletas. Em especial agradeço à Vanderlei Aparecido Alves de Miranda (Vandi), pela agradável convivência e por sua inesquecível amizade.

Aos colegas do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, se tornaram verdadeiros amigos, agradeço pelos estudos em grupo e todo incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal: Magda, Aline Bombo, Juliana Mayer, Marta, Tuane, Aline Martins, João Paulo, João Marcelo, Adriana, Graziela, Makeli, Renata, Juliana Fernando, Bianca, Rebeca, pela amizade, companheirismo, por dividir tantos bons momentos de alegrias e pelo ombro amigo nas dificuldades.

As minhas amigas Ana Cristina Rabelo e a Roberta Zutin por todo carinho, amizade e por dividirem comigo um lar.

A todos os meus familiares e por meus queridos amigos, que com tanto carinho me acompanharam e me apoiaram durante toda essa jornada, por dividirem comigo alegrias, tristezas, vitórias e conquistas, que fizeram dos momentos difíceis suportáveis e dos bons momentos inesquecíveis.

Ao meu namorado e amigo Fernando Bassi por todo apoio, companheirismo, paciência, pela imensa dedicação e pelo carinho a mim concedido.

À minha irmã Aline pelo incrível carinho e apoio durante essa jornada, por executar tão bem o seu papel de irmã e de melhor amiga, por ser meu porto seguro, que mesmo a distância me consolava, sendo a minha fiel conselheira e minha eterna companheira.

Aos meus pais que de maneira inigualável me apoiaram na realização desse sonho mesmo quando ele parecia distante, por serem meus melhores amigos e mestres sendo exemplo em tudo que eu almejo ser, agradeço pelo imenso amor, por serem a razão da minha alegria e do meu viver, agradeço pela honra que me deram de ser filha de vocês.

"Amarás o Senhor teu Deus com
todo teu coração, com toda a tua
alma com todas as tuas forças".

Dt 6, 4-9.

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Morfoanatomia vegetal.....	25
3.2 Etapa química.....	26
3.3 Germinação de sementes.....	27
3.4 Enraizamento de estacas.....	28
3.5 Capacidade de rebrotamento no campo.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Morfoanatomia foliar	31
4.2 Anatomia do caule não espessado.....	37
4.3 Rizóforo.....	42
4.4 Raízes adventícias.....	48
4.5 Perfil cromatográfico.....	53
4.6 Germinação de sementes.....	57
4.7 Enraizamento de estacas.....	60
4.8 Capacidade de rebrotamento no campo.....	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

RESUMO

Morfoanatomia, perfil químico e propagação de *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacaceae)

As espécies do gênero *Smilax* L., conhecidas popularmente como salsaparrilha, são empregadas na medicina popular desde o século XVI, porém essas plantas ainda são exploradas de maneira extrativista. Com o aumento da comercialização de plantas medicinais cresce a necessidade de trabalhos que certifiquem a qualidade da matéria prima. A caracterização anatômica e o perfil químico certamente fornecem uma base mais segura nessa certificação. Visando auxiliar no atendimento da demanda e apontar propostas do manejo sustentável em áreas de ocorrência natural de *Smilax fluminensis* Steud. os objetivos do presente estudo foram: a) analisar a morfoanatomia dos órgãos vegetativos e indicar as características de valor diagnóstico para essa espécie; b) analisar o perfil químico de *S. fluminensis* através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Diodos utilizando-se extratos metanólicos (EMeOH) de raízes, rizóforos e ramos aéreos; c) realizar estudos de germinação de sementes e de propagação vegetativa por estacas de ramos aéreos e subterrâneos e, d) acompanhar ao longo de um ano a capacidade de rebrotamento das plantas no campo. As análises ao microscópio de luz foram realizadas utilizando-se as técnicas usuais para o preparo de lâminas semipermanentes e permanentes. Para as análises no microscópio eletrônico de varredura, amostras de folhas foram fixadas em Karnovsky, desidratadas em série etílica e submetidas ao método do ponto crítico de CO₂, montadas sobre suportes de alumínio e metalizadas. As sementes foram submetidas a diferentes temperaturas, sob fotoperíodo diário de oito horas e na ausência de luz. Para o enraizamento de estacas, foram utilizados ramos aéreos e subterrâneos com aproximadamente 20 cm, com duas regiões nodais submetidas ao tratamento com ácido indolbutírico a 100 ppm ou apenas em água destilada. Dentre os caracteres anatômicos que permitiram a delimitação da espécie destacam-se: estômatos anisocíticos e paracíticos presentes na epiderme da face abaxial; cera epicuticular na forma de grânulos globosos; mesofilo homogêneo com ampla câmara subestomática; presença da bainha amilífera nos primeiros entrenós do caule aéreo; presença de endoderme com reforço em “U”; ausência de meristema de espessamento no rizóforo adulto; presença de exoderme com estrias de Caspary nas raízes brancas e ausência de córtex interno nas raízes marrons. Em relação ao perfil químico, os extratos obtidos apresentaram picos correspondentes às substâncias: ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido *trans*-cinâmico. As melhores porcentagens de germinação foram 80% em 20-30° C no claro e 85% a 30°C no escuro. Apenas as estacas de ramos subterrâneos enraizaram. Ao final de um ano de acompanhamento das plantas no campo, todas apresentaram em média 4.05 novos brotamentos. As espécies cujas partes utilizadas para o preparo dos medicamentos são as raízes correm maior risco de extinção como é o caso de *S. fluminensis*. Portanto, a capacidade de propagação por sementes, por estacas e de regeneração de ramos aéreos após a remoção de parte das estruturas subterrâneas aliada ao perfil químico confirma o seu potencial para a exploração econômica de maneira sustentável, sendo uma alternativa para reduzir o extrativismo predatório dessa espécie nativa.

Palavras-chave: Estacas; Germinação de sementes; Rebrotamento; Salsaparrilha

ABSTRACT

Morph-anatomy, chemical profile and propagation of *Smilax fluminensis* Steud. (Smilacaceae)

The *Smilax* L. species, popularly known as “salsaparrilha”, have been used in folk medicine since the sixteenth century; however, these plants have still been handled in extractive way. With the increasing commercialization of medicinal plants, there is need to study to certify the raw material quality. Anatomical analyses and chemical profile characterization certainly provides a more secure basis to this certification. Aiming to meet the demand and to point proposals for sustainable management of natural occurrence of *Smilax fluminensis* Steud., the objectives of this study were: a) to analyze the morph-anatomy of vegetative organs and indicate the features of diagnostic value for this species, b) to examine the chemical profile of *S. fluminensis* by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detector using methanol extracts (EMeOH) of roots, rhizophore and stems c) to conduct studies of seed germination and vegetative propagation on cuttings of aerial and subterranean stems and d) to monitor, over a year, the resprouting ability of plants in the field. We carried out the analyses under a light microscopy using the usual techniques for preparing semi-permanent and permanent slides. To perform the analyses under a scanning electron microscopy, leaf samples were fixed in Karnovsky, dehydrated in ethanol series and subjected to critical point method of CO₂, mounted on aluminum supports and coated with gold. Seeds were exposed to different temperatures under a daily photoperiod of eight hours and in the absence of light. To analyze the sprouting, aerial and subterranean stems were used with about 20 cm of length, with two nodal regions subjected to treatment with IBA at 100 ppm or in distilled water. Among the anatomical features that enable delimitation of the species are: anisocytic and paracytic stomata in the epidermis of the abaxial surface, epicuticular wax in the form of granules globules, homogeneous mesophyll with large substomatal chambers, presence of starch sheath in the first internodes of the aerial stem, the presence of endoderm-reinforced “U” and the absence of primary thickening meristem in the adult rhizophore, exodermis with Casparian strips in roots, and the absence of inner cortex in brown roots. Regarding the chemical profile, extracts showed peaks corresponding to the following substances: chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, p-coumaric acid, ferulic acid and trans-Cinnamic acid. The best germination was 80% at 20-30°C under light and 85% at 30°C in the dark. Only roots sprouted. After one year of monitoring the plants in the field, all had an average of 4.05 new aerial shoots. The species whose roots are used for the preparation of medicines face a greater risk of extinction as is the case of *S. fluminensis*. Therefore, the ability to spread by seeds, cuttings and shoots regeneration after removal of aerial stems combined with the chemical profile confirms its potential for economic use in a sustainable manner, and an alternative to reduce the predatory extraction of native species.

Keywords: Cuttings; Greenbrier; Resprouting; Seed germination

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais no Brasil têm se destacado pela a sua importância no uso popular e na produção de medicamentos fitoterápicos. A identificação botânica e a composição química da matéria prima garantem a uniformidade e a qualidade do produto final, uma vez que tais características podem ser alteradas no processo de comercialização (FARIAS et al., 1985).

O estudo de plantas medicinais presentes no Cerrado tornou-se essencial para o manejo sustentável da vegetação, uma vez que a maioria das informações provém da medicina popular, portanto verificar a potencialidade farmacológica e garantir a exploração da espécie de forma sustentável tornou-se essencial para a conservação do bioma (MARONI; DI STASI; MACHADO, 2006, ALMEIDA et al., 1998).

As espécies do gênero *Smilax* L., conhecidas popularmente como salsaparrilha, são empregadas na medicina popular como fortificante, contra o reumatismo e antissifilítico (LORENZI, 2002).

Devido às semelhanças morfológicas nas estruturas comercializadas para fins medicinais, ou seja, sistemas subterrâneos espessados e raízes de espécies de *Smilax* e de *Herreria salsaparrilha* Mart. ocorre frequentemente a falsificação da salsaparrilha empregando-se espécies do gênero *Herreria* no lugar das plantas do gênero *Smilax* (CUNHA, 1937a). A falsificação também pode ser detectada entre espécies do mesmo gênero de *Smilax* (LORENZI, 2002).

Conforme discutido por Martins e Appezzato-da-Glória (2006) os caracteres utilizados na descrição das salsaparrilhas na Farmacopéia Brasileira de 1929 não eram úteis na separação das espécies de *Smilax*. Portanto, a caracterização morfoanatômica é uma ferramenta de grande importância para evitar este tipo de falsificação e garantir o controle de qualidade da matéria prima utilizada na elaboração dos fitoterápicos (MING, 1994).

Dentre os trabalhos morfoanatômicos encontrados na literatura sobre o gênero *Smilax* estão: Vandercolme (1947) que analisou as raízes das espécies *S. laurifolia*, *S. syringoides*, *S. syphilitica* e *S. pseudosyphilitica*; Caponetti e Quimby (1956) que estudaram a anatomia foliar, caulinar e radicular de cinco espécies: *S. auriculata*, *S. hispida*, *S. glauca*, *S. bona-nox* e *S. herbacea*; Ervin e Evert (1967) que estudaram o floema em *S. rotundifolia*; Martin e Tucker (1985) que analisaram ápices caulinares em *S. bona-nox*, *S. rotundifolia*, *S. laurifolia* e *S. pumila*; Marquete e Pontes (1994) que estudaram a anatomia foliar comparativa de três espécies: *S. spicata*, *S. rufescens* e *S. fluminensis*; Barradas e Figueiredo (1974) que analisaram a nervação

foliar de seis espécies do gênero *Smilax*. Oliveira, Silva e Rocha (1973), Andreatta e Menezes (1999), Souza et al. (2005) analisaram os órgãos reprodutivos de *Smilax fluminensis*. 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 e Silveira (2005) e Palhares et al. (2009) sobre *Smilax goyazana*, o de Martins e Appezzato-da-Glória (2006) que descrevem *S. polyantha* e o de Guimarães (2009) que descreveu *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora*.

Outro aspecto importante a ser considerado é a determinação do perfil químico das espécies empregadas na medicina popular, uma vez que, através dele pode ser determinada a concentração e a composição química do princípio ativo das plantas medicinais. Tal abordagem permite avaliar se realmente a espécie possui o conjunto de substâncias ativas para atividade farmacológica. A literatura sobre esta identificação das substâncias químicas e de seus diversos extratos obtidos a partir das plantas do gênero *Smilax* é vasta. As substâncias mais encontradas são flavonóides, ácidos fenólicos (XU et al., 2005, CHEN et al., 1999, GUO et al., 2004) e saponinas (SHU et al., 2004, JU; JIA, 1992, BERNARDO et al., 1996) cujas propriedades medicinais atribuídas são antiinflamatória, antioxidante e antirreumática.

Alguns estudos têm comprovado as capacidades farmacológicas das espécies tais como: atividade antiinflamatória e antirreumática (JIANG et al., 1997, JIANG; XU, 2003), atividade antimicrobiana e antimutagênica (LEE et al., 2001), propriedades antioxidantes (DEMO et al., 1998), propriedade anticancerígena (COX et al., 2005), propriedades analgésicas (MONTEIRO; ANDREATA, 1997), propriedades depurativas, antirreumáticas, diuréticas e para problemas hepáticos (ALMEIDA et al., 1998). Stellfeld (1938) atribui à salsaparrilha a propriedade de aumentar o teor de colesterol no sangue, tendo 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. Medeiros et al. (2007) cita as propriedades antibiótica, diurética e depurativa das salsaparrilhas.

A espécie escolhida para este estudo é a *Smilax fluminensis* Steud. conhecida popularmente como salsaparrilha, japicanga, salsa, salsinha (ANDREATA, 1997), quina-de-cipó ou cipó-quina (PIO CORREA, 1969). A escolha baseou-se na sua ampla distribuição ocorrendo em todas as regiões do Brasil em diferentes ambientes: áreas de cerrado, mata ciliar, campos rupestres, pantanal, áreas perturbadas, áreas fechadas como floresta atlântica, floresta mesófila.

Segundo Andreata (1997) o sucesso adaptativo em diversos ambientes pode ser atribuído à sua plasticidade fenotípica. Além disso, nas observações de campo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, a espécie *S. fluminensis* possui alta capacidade de formação de ramos aéreos e de ramos subterrâneos distribuídos horizontalmente, podendo alguns indivíduos alcançar cerca de 10 metros de comprimento. Tudo indica que a espécie apresenta alto potencial de propagação vegetativa que poderia ser explorado no seu cultivo caso o perfil químico confirme a presença das substâncias comentadas anteriormente.

Estudos de propagação vegetativa e de germinação de sementes de espécies medicinais indicam a viabilidade de cultivo, possibilitando um controle de qualidade da matéria prima (FARIAS et al., 1985), além de desestimular o extrativismo de espécies nativas do seu ambiente natural, estabelecendo um manejo sustentável destas espécies (MARONI et al., 2006).

Ono e Rodrigues (1996) observaram que o enraizamento de estacas permite obter plantas com características desejáveis a partir da seleção das matrizes. O ácido indolbutírico (IBA) é considerado a auxina mais eficiente para finalidade de enraizamento de estacas devido a sua baixa mobilidade, e a sua aplicação exógena estimula a formação de raízes adventícias. As estacas que possuem uma quantidade elevada de carboidratos também são favoráveis ao enraizamento (HARTMANN et al., 2002).

Quanto à germinação de sementes em espécies de *Smilax*, há poucas espécies estudadas e as variáveis testadas são muito distintas, o que dificulta estabelecer a análise comparativa de respostas. As espécies já estudadas são *Smilax rotundifolia* L. e *S. glauca* Walt. (HOLM, 1890), *Smilax elastica* Grisebach, *S. quinquinervia* Vell. e *S. syphilitica* Humboldt (ANDREATA; PEREIRA, 1990), *Smilax campestris* Grisebach (ROSA; FERREIRA, 1999), *Smilax japecanga* Grisebach (SANTOS et al., 2003), *Smilax goyazana* A.D. Candolle (PALHARES et al., 2009) e *Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. campestris* Grisebach, *S. cissoides* Martius ex Grisebach e *S. polyantha* Grisebach. (MARTINS, 2009).

Tendo disponíveis as informações necessárias para a propagação destas espécies medicinais, torna-se possível o cultivo destas para o mercado informal e para as indústrias farmacêuticas dedicadas à fabricação de medicamentos de origem vegetal (FARIAS, 1999). Evitam-se assim as adulterações ocorridas nas manipulações dos fitoterápicos onde, as plantas são alteradas por não terem uma devida classificação botânica e química, estes meios tornam-se

essenciais para garantir a qualidade da matéria-prima em sua comercialização (FARIAS et al., 1985).

Portanto, os objetivos do presente estudo são:

- _ Analisar a morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax fluminensis* coletadas em áreas de Cerrado e indicar as características de valor diagnóstico para a espécie.
- _ Analisar o perfil químico de *Smilax fluminensis* através do HPLC-UV-PDA (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Diodos) utilizando-se extratos metanólicos de raízes, rizóforos e ramos aéreos de *Smilax fluminensis*;
- _ Realizar estudos de germinação de sementes e de propagação vegetativa por estacas de ramos aéreos e subterrâneos da espécie *Smilax fluminensis*.
- _ Acompanhar ao longo de um ano a capacidade de rebrotamento das plantas no campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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 de plantas dióicas, lianas ou trepadeiras herbáceas, raramente subarbustos ou arbustos. Seus caules aéreos são, em geral, aculeados e podem apresentar rizóforos. 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).

As espécies do gênero *Smilax* L. ocorrentes no Brasil são lianas lenhosas, de pequeno ou grande porte, arbustivas ou subarbustivas, podendo se tornar escandentes quando encontram suportes, possuem caules e ramos aculeados. Suas folhas são 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). As espécies são encontradas em diferentes ecossistemas, principalmente no Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga e em matas ciliares (ANDREATA, 1997).

Dentre os trabalhos morfoanatômicos encontrados na literatura sobre o gênero *Smilax* estão: Vandercolme (1947) que analisou as raízes de quatro espécies brasileiras (*S. laurifolia*, *S. syringoides*, *S. syphilitica* e *S. pseudosyphilitica*). Caponetti e Quimby (1956) estudaram a anatomia foliar, caulinar e radicular de *S. auriculata*, *S. hispida*, *S. glauca*, *S. bona-nox* e *S. herbacea*. Martin e Tucker (1985) analisaram ápices caulinares em *S. bona-nox*, *S. rotundifolia*, *S. laurifolia* e *S. pumila*.

De acordo com Cunha (1937b) a parte utilizada nas salsaparrilhas verdadeiras, ou seja, as pertencentes ao gênero *Smilax* para o uso medicinal são as raízes. O autor propôs a utilização das características da endoderme para estabelecer diferenças entre as raízes de *Smilax medica*, *Smilax salsaparrilha* e *Smilax syphilitica*. Também Stellfeld (1938) ao estudar *Smilax aspera* comentou que 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. No entanto, Martins e Appezzato-da-Glória (2006) ao analisarem *Smilax polyantha* observaram que há variação na estrutura anatômica da raiz à medida que essa se desenvolve, não podendo tal característica ser utilizada para a diagnose da espécie.

Marquete e Pontes (1994) estudaram a anatomia foliar comparativa de três espécies *S. spicata*, *S. rufescens* e *S. fluminensis* e observaram a variação na organização do mesofilo.

Barradas e Figueiredo (1974) estudaram a nervação foliar de *Smilax irrorata*, *S. cissoides*, *S. spinosa*, *S. undulata*, *S. fluminensis* e *S. oblongifolia* ocorrentes no Cerrado e observaram que 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.

O sistema subterrâneo de *Smilax japeçanga* Grisebach distribui-se paralelamente ao solo, ficando parcialmente enterrado e ramificando-se com frequência (OLIVEIRA et al., 1973). Segundo os autores apresenta forma irregular e possui os nós e entrenós por vezes bem delimitados. Em cortes transversais apresenta epiderme constituída por células com paredes espessadas e alongadas tangencialmente, parênquima cortical com células isodiamétricas, geralmente com paredes espessadas, entre as quais se observam idioblastos repletos de cristais de oxalato de cálcio (OLIVEIRA et al., 1973). Segundo Andreatta e Menezes (1999) o indivíduo adulto de *Smilax quinquenervia* é constituído pelo caule aéreo e subterrâneo (rizóforo) posicionado horizontalmente em relação ao solo. As espécies deste gênero possuem uma alta capacidade de rebrotamento em condições adversas devido à presença de gemas laterais, protegidas por catafilos, localizadas nos três primeiros nós da porção caulinar que geralmente são subterrâneos (ANDREATA; PEREIRA, 1990).

Smilax fluminensis Steud. é conhecida popularmente no Brasil como japicanga, salsa, salsinha (ANDREATA, 1997), quina-de-cipó ou cipó-quina (PIO CORREA, 1969); na Argentina, Bolívia e Paraguai é conhecida como “ijuapecá guasu” e “zarzaparrilha” (ANDREATA, 1997). Caracteriza-se por ser uma planta trepadeira com caule escandente e cilíndrico, possui folhas coriáceas, triangulares, obtusas, apiculadas no ápice (MARQUETE; PONTES, 1994), seus pecíolos não possuem acúleos, elas frutificam ao longo do ano todo, tendo frutos alaranjados quando maduros e seu período de florescimento é preferencialmente de maio a dezembro nas plantas masculinas e femininas (ANDREATA, 1997). Destaca-se devido à sua ampla distribuição geográfica no Brasil ocorrendo em São Paulo, Minas Gerais, em toda região do Centro-Oeste, Rio de Janeiro, Pará, Roraima, Bahia, estendendo-se à Argentina, Paraguai e Bolívia.

Pode ser encontrada em áreas de Floresta Atlântica, floresta mesófila, campos rupestres, Pantanal, no Cerrado e em mata ciliar. Sua plasticidade fenotípica é o que garante esse sucesso adaptativo (ANDREATA, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de *Smilax fluminensis* Steud. foram realizadas em área de Cerrado da Estação Ecológica Itirapina, Itirapina-SP. O material coletado foi identificado pela especialista Profa. Dra. Regina Helena Potsch Andreata, as exsicatas foram registradas e incorporadas ao acervo do Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo sob o número 107633.

3.1 Estudos anatômicos

As análises anatômicas foram realizadas na folha, caule aéreo, caule subterrâneo não espessado, caule subterrâneo espessado (rizóforo) e nas raízes de *Smilax fluminensis*.

Na folha completamente expandida, foram analisados a região mediana da lâmina foliar (na porção da nervura central, área internervural e bordo) e o pecíolo. O caule aéreo foi analisado da região do terceiro entrenó até o nível do solo. No sistema subterrâneo, além das regiões não espessadas, foram analisados nós intumescidos de diferentes diâmetros e raízes adventícias em diferentes estágios de desenvolvimento.

As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool etílico 50%) (JOHANSEN, 1940) ou em Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), para uma melhor fixação, 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, caules e raízes) e em micrótomos de deslizamento (caules aéreo e subterrâneo) com 60-90 µm de espessura. Alguns cortes foram corados com verde iodo e vermelho Congo (DOP; GAUTIER, 1928) e montados em gelatina glicerizada. Outros cortes foram corados em safranina e azul de astra (BURGER; RICHTER, 1991), desidratados em série etílica, acetato de butila 50% e 100% e montados em resina sintética “Entellan”.

Amostras dos órgãos vegetativos também foram desidratadas em série etílica, incluídas em hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin). Os blocos obtidos foram seccionados a 8-10 µm de espessura. As secções foram coradas 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 mesofilo 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 glicerinada (JOHANSEN 1940).

Os testes histoquímicos foram realizados utilizando-se secções de material fresco ou fixado dos órgãos vegetativos. A presença de substâncias lipídicas foi visualizada pelo emprego de Sudan IV e Sudan Black B (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 pécicas evidenciadas pelo vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940).

As imagens foram capturadas digitalmente através de microscópio Leica DM LB com uma câmera de vídeo acoplada a um computador, no qual foi utilizado o software IM50 para análise de imagens. A morfologia dos órgãos vegetativos foi documentada por meio de fotografias com câmera digital ou por ilustrações botânicas.

Para a análise da ornamentação cuticular, amostras de folhas foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), desidratadas em série etílica até etanol absoluto. Em seguida, foram submetidas à desidratação pelo método do ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969) e montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e elétrôn-micrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura LEO modelo VP 435, operado a 20 kV, com as escalas das elétrôn-micrografias diretamente impressas nas mesmas.

3.2 Etapa química

Extração

Foram coletados três indivíduos de *Smilax fluminensis* para os estudos de perfil químico. 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.

Os pós resultantes dos ramos, raízes e rizóforo foram submetidos à extração por maceração a frio 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.

Perfil cromatográficos dos extratos metanólicos por HPLC-UV-PDA

Para determinar o perfil cromatográfico do EMeOH de raízes, ramos e rizóforo da espécie de *Smilax fluminensis* foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Diodos de (HPLC-UV-PDA) para auxiliar na caracterização das matrizes vegetais.

Foi utilizada uma alíquota de 30 mg de cada extrato (ramos, raízes e rizóforos), sendo dissolvida em 1 mL de MeOH/H₂O 8:2, filtrada em filtro Millex de 0,45 µm e em filtro de 0,22 µm. 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. Os eluatos finais foram investigados sob diferentes condições de análise, variando-se a fase móvel, o fluxo e o 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 a 1 mg/mL - na proporção de 4:1 - e comparação dos tempos de retenção e espectros de violeta dos picos presentes com os dos padrões utilizados.

3.3 Germinação de sementes

Os frutos maduros de *Smilax fluminensis* Steud. foram coletados aleatoriamente buscando-se um maior número possível de indivíduos dentro de cada população garantindo dessa forma a variabilidade genética. Os frutos foram coletados em abril de 2008 nas seguintes localidades no estado de São Paulo: Itirapina, Assis, Franca, Anhembi.

Após a secagem natural dos frutos, as sementes foram retiradas manualmente. O experimento foi instalado em 30 de junho de 2008 e avaliado por 30 semanas, até fevereiro de 2009.

Para avaliar a viabilidade das sementes foram avaliadas as temperaturas constantes 25°C e 30°C e alternadas 20-30°C e 20-35°C, na presença de luz com fotoperíodo de oito horas, na qual a luz era fornecida por lâmpadas fluorescentes, e na ausência de luz branca fluorescente.

Para o teste de germinação, foram utilizadas caixas plásticas (11 cm de lado por 3cm de altura) contendo 292g de areia esterilizada como substrato, umedecida com 45mL de água, correspondente a 60% da capacidade de retenção de água pela areia. Para cada combinação de

temperatura e luz foram semeadas quatro repetições de 25 sementes. O teste de germinação foi avaliado em intervalos de sete dias, com o registro das plântulas normais e anormais e das sementes não germinadas. A partir das avaliações foram calculadas as porcentagens de plântulas normais (germinação) e o índice de velocidade da germinação (MAGUIRE, 1962).

As sementes foram submetidas ao teste do tetrazólio (BRASIL, 1992) para verificar sua viabilidade. Nesse teste, as sementes imediatamente após terem sido cortadas longitudinalmente, foram colocadas em um pequeno copo plástico contendo solução 1% de tetrazólio. Esse recipiente foi coberto com papel alumínio para evitar evaporação da solução e mantido a 30°C por 24 horas. As sementes que apresentaram o embrião corado de vermelho foram consideradas viáveis. Além da viabilidade das sementes foram determinadas também as sementes sem embriões e aquelas contaminadas por fungos.

A análise de variância foi baseada em teste de aleatorização (distância Euclidiana, 10.000 interações) para testar os valores obtidos nas taxas de germinação para a espécie.

3.4 Enraizamento de estacas

A coleta das estacas de ramos aéreos e subterrâneos de *S. fluminensis* foi realizada em maio de 2008 na Estação Ecológica Itirapina-SP conforme descrito no próximo item. As estacas com cerca de 20 cm com duas regiões nodais provenientes de ramos aéreos e subterrâneos de cinco plantas foram submetidas ao tratamento com ácido indolbutírico (AIB) a 100 ppm, ou apenas em água destilada (controle), sendo a base das estacas imersas *overnight* na solução. A seguir essas estacas foram plantadas na posição vertical em sacos de polietileno contendo areia, depois levadas para casa de vegetação, onde foram irrigadas manualmente em dias alternados.

O delineamento foi inteiramente casualizado com dois tratamentos em cinco repetições. Após um ano do plantio foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de estacas vivas enraizadas, porcentagem de estacas mortas, número de raízes e de brotações por estaca enraizada, número de folhas, comprimento dos brotos e das três maiores raízes, massa fresca e massa seca de raízes. Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância e as médias do tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Também foram realizados cortes a mão livre das estacas e a reação com Lugol para a detecção de amido (BERLYN; MIKSCH 1976).

3.5 Capacidade de rebrotamento no campo

Na Estação Ecológica Itirapina-SP foram escolhidas cinco parcelas (áreas) ao longo de um trecho que acompanha a mata ciliar. Para cada parcela foram escolhidas quatro plantas que, após a remoção dos ramos aéreos e parte dos ramos subterrâneos, foram acompanhadas ao longo de 12 meses quanto à capacidade de rebrotamento. Parte desses ramos aéreos e subterrâneos foi utilizada na instalação do experimento de enraizamento de estacas descrito no item anterior. As observações iniciaram em maio de 2008 e as plantas foram monitoradas mensalmente quanto ao número de brotos novos formados, o comprimento dos ramos e o número de folhas desses novos ramos. Os resultados obtidos estão ilustrados na forma de gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfoanatomia foliar

S. fluminensis Steud. possui o limbo foliar cordiforme (Figura 1A), coriáceo, com ápice apiculado e base cordada e cinco nervuras salientes apresentando venação acródroma (Figura 1B). Segundo Barradas e Figueiredo (1974), o número de nervuras principais salientes pode ser um caráter útil na separação ou no agrupamento de espécies de *Smilax*. Martins (2009) utilizou esse caráter além de outros caracteres foliares na separação das espécies *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides*.

S. fluminensis não apresenta emergências espiniformes no limbo foliar como aquelas descritas em *Smilax brasiliensis* Sprengel, *S. campestris* Grisebach e *S. cissoides* Martius ex Grisebach por Martins (2009).

Em vista frontal as paredes da epiderme *S. fluminensis* são sinuosas em ambas as faces (Figuras 1C-D) o que confirma a descrição de Marquete e Pontes (1994) e Andreatta (1997). Martins (2009) verificou variação no contorno parietal entre espécies de *Smilax*, ou seja, em *S. brasiliensis* (paredes retas), *S. cissoides*, (paredes sinuosas) e *S. campestris* (paredes retas e onduladas).

As folhas de *S. fluminensis* apresentam raros estômatos na face adaxial (Figura 1E), portanto as folhas são hipoestomáticas e não anfiestomáticas como descrevem Marquete e Pontes (1994) e Guaglianone e Gattuso (1991). Os estômatos são anisocíticos e paracíticos (Figura 1D). Há discordância quanto ao tipo de estômato nessa espécie, pois Andreatta (1997) descreveu-os como anomocíticos e Marquete e Pontes (1994) como anisocíticos apenas.

A cera epicuticular em ambas as faces é depositada na forma de grânulos globosos (Figuras 1G-H). Padrões distintos foram encontrados em outras espécies de *Smilax*: escamiforme (*S. polyantha*) (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006), protuberâncias crostosas (*S. brasiliensis*), papilosa (*S. campestris*) e grânulos diminutos (*S. cissoides*), sendo um caráter útil na delimitação de espécies (MARTINS, 2009).

Nos cortes transversais (Figuras 2A-C) observou-se a epiderme unisseriada com arranjo justaposto e espessamento parietal em pectina (Figura 2C). Tal espessamento pode estar associado à exposição das folhas à alta intensidade luminosa. A presença de pectina tem a função

de hidratação das paredes celulares pelas suas propriedades hidrofílicas (SAJO; MACHADO, 2001).

O mesofilo é homogêneo com células arredondadas pouco espessadas em pectina entre as quais ocorrem idioblastos fenólicos e outros contendo ráfides. A câmara subestomática é ampla (Figura 2A). São encontradas esclereides do tipo: colunares, fibriformes e esclereides ramificadas semelhantes a astroesclereides (Figuras 3A-I).

Há variação entre as espécies de *Smilax* quanto ao tipo de mesofilo podendo ser homogêneo ou heterogêneo dorsiventral. Guaglianone e Gattuso (1991) diferenciaram as espécies *S. fluminensis* e *S. pilcomayensis*, com mesofilo homogêneo, das espécies *S. cognata* e *S. assumptionis* que apresentavam mesofilo heterogêneo. Yates e 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) e em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* (MARTINS, 2009) 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.

Esclereides colunares e fibriformes também já foram descritos em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* (MARTINS, 2009) e em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Porém, o tipo de ramificação das esclereídes difere entre *S. polyantha* (osteosclereide) e *S. fluminensis* (astroesclereide) o que pode auxiliar na separação das espécies.

Os feixes vasculares laterais do tipo colateral são encontrados em diferentes tamanhos, e sempre são envolvidos por células lignificadas tipo esclereide e fibras.

A nervura central possui cutícula espessa sobre a epiderme e na face abaxial observou-se colênquima angular. Há três conjuntos de dois feixes colaterais, cada qual envolvido por células de paredes espessadas e lignificadas (Figuras 2 D-E). A individualização dos feixes da nervura também é observada em *S. brasiliensis* e *S. cissoides* (MARTINS, 2009). Em *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*.

O bordo foliar apresenta epiderme uniestratificada com células menores e mais arredondadas do que as encontradas no restante da lâmina foliar, sendo que a cutícula é mais

espessa (Figura 2F). Entre as células subepidérmicas há idioblastos contendo compostos fenólicos e outros de lume maior com paredes espessas e lignificadas (Figura 2F) que podem ou não apresentar ráfides (Figura 2G). A presença das células esclerificadas no bordo parece ser um caráter compartilhado entre espécies do gênero, pois Yates e Duncan (1970), Marquete e Pontes (1994), Martins e Appezzato-da-Glória (2006) e Martins (2009) também descrevem tal característica.

No pecíolo (Figura 4A-C), a epiderme unisseriada é revestida por cutícula espessa. O córtex é constituído por colênquima angular (Figura 4B). Algumas células colenquimáticas podem acumular ráfides ou cristais prismáticos (Figura 4C). A última camada do córtex não apresenta espessamentos parietais e o arranjo das células é justaposto. O cilindro vascular possui feixes colaterais distribuídos aleatoriamente no parênquima. Ocorre o acúmulo de grãos de amido diminutos no córtex e no cilindro vascular (Figura 4D).

Figura 1 - *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Visão geral da folha no campo. **B.** Desenho da folha com cinco nervuras principais proeminentes. **C e D.** Vista frontal da epiderme da face adaxial e da face abaxial, respectivamente. **E e F.** Eletromicrografias de varredura da superfície foliar das faces adaxial (seta indica um estômato) e abaxial, respectivamente. **G e H** Eletromicrografias de varredura da superfície foliar mostrando o padrão de deposição de cera na forma de grânulos globosos

Figura 2 - Secções transversais do limbo foliar de *Smilax fluminensis* Steud. **A e B.** Visão geral. Observar as amplas câmaras subestomáticas (setas) e a presença de idioblastos fenólicos (i). **C.** No detalhe, observar a ampla câmara subestomática (seta) e o espessamento parietal em pectina na epiderme após coloração com vermelho de rutênio. **D.** Nervura central com três conjuntos de dois feixes colaterais. **E.** Detalhe de dois feixes formando um conjunto. **F.** Bordo foliar com idioblastos de paredes espessas contendo ráfides (setas). **G.** Detalhe do idioblasto com ráfides

Figura 3 - *Smilax fluminensis* Steud. Mesofilo dissociado. **A-C.** Astroesclereide; **D-F.** esclereide colunar; **G-H.** esclereide fibriforme

Figura 4 - Secções transversais do pecíolo de *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Visão geral com os feixes colaterais distribuídos aleatoriamente no parênquima do cilindro vascular. **B.** Detalhe do colênquima nas primeiras camadas do córtex evidenciado pelo vermelho de Rutênio. **C.** Detalhe de um idioblasto com ráfides e outro com cristal prismático. **D.** Observar os grãos de amido diminutos no parênquima cortical e no cilindro vascular após reação com cloreto de zinco iodado

4.2 Anatomia do caule não espessado

A gema caulinar em seção longitudinal (Figura 5A) possui organização túnica-corpo com túnica bisseriada (Figura 5B-C). Não se observa o meristema de espessamento primário como descrito por Martins (2009) em *S. polyantha*.

Até o quarto entrenó do caule, a epiderme unisseriada acumula compostos fenólicos (Figura 6A). No córtex, a primeira camada corresponde à hipoderme que possui células de

arranjo justaposto desprovidas de cloroplastos, segue-se com 2 a 3 camadas de células de parênquima clorofiliano e 4 a 5 camadas de colênquima angular. A presença de colênquima no córtex também relatada em *S. subsessiliflora* por Guimarães (2009) e em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2006).

A última camada do córtex é uma bainha amilífera (Figura 6A). Há feixes colaterais periféricos envolvidos por células não lignificadas (Figura 6B). No cilindro vascular, o periciclo apresenta 4 a 5 camadas de células menores ainda não lignificadas e os feixes colaterais estão distribuídos aleatoriamente (Figura 6B). A partir do quinto entrenó, as células do córtex e do periciclo começam a se lignificar e a bainha amilífera não é mais diferenciada (Figura 6C). No caule aéreo próximo ao solo (Figuras 6D-F) pode ser observado o maior grau de lignificação das camadas corticais, inclusive da hipoderme. Há um anel esclerenquimático quase contínuo devido à presença dos feixes periféricos (Figuras 6D-F). No cilindro vascular, os feixes são envolvidos por células parenquimáticas de paredes mais espessadas (Figura 6F). Caponetti e Quimby (1956) e Van Fleet (1942) relataram não ser possível nas porções mais jovens do caule detectar a presença da endoderme. Entretanto, segundo os mesmos autores, é possível identificar a endoderme somente quando ela se torna espessada e diferenciada, eles citam as porções caulinares próximas ao solo como as mais propícias a apresentarem a endoderme. No presente trabalho a endoderme a partir do quinto entrenó deixou de ser evidenciada como bainha amilífera, sendo possível a análise das células com espessamentos parietais somente nas regiões nodais intumescidas dos caules subterrâneos (Figuras 11E-F).

Os feixes periféricos da região cortical em *S. fluminensis* do quinto entrenó até a porção subterrânea do ramo caulinar são feixes vasculares corticais. Guaglianone e Gattuso (1991) analisaram *S. fluminensis*, *S. pilcomayensis*, *S. cognata*, *S. assumptionis* e *S. campestris* e também destacaram esses feixes vasculares periféricos externamente ao anel esclerenquimático em uma ou duas camadas. Esses feixes foram observados em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* (MARTINS, 2009) nas porções do ramo caulinar aéreo, em *S. quinquenervia* e, de ocorrência mais rara, em *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES 2009).

A lignificação das camadas periféricas do cilindro vascular varia entre as espécies em relação ao entrenó analisado (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Em *S. fluminensis* (presente estudo) e em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006) na região do terceiro entrenó não há lignificação. No entanto, Martins (2009), analisando *S. brasiliensis*, *S.*

campestris e *S. cissoides* observou que a região do terceiro entrenó e na porção subterrânea encontra-se lignificada na forma de um anel esclerenquimático.

Segundo Caponetti e Quimby (1956) e Ervin e Evert (1967) na porção interna do cilindro vascular cada feixe disperso no parênquima possui uma bainha de esclerênquima como visto na espécie analisada.

O caule subterrâneo não espessado (Figuras 6G-H) possui cutícula espessa recobrando a epiderme unisseriada com estômatos. No córtex, a hipoderme é unisseriada e as demais células corticais não possuem paredes lignificadas. A bainha amilífera não é diferenciada. O anel esclerenquimático é mais descontínuo do que na porção aérea. Há maior acúmulo de grãos de amido principalmente no cilindro vascular (Figura 6G).

O caule de *S. fluminensis* apresenta estruturas espinescentes tanto na região do entrenó quanto na região nodal. As estruturas não apresentam vascularização. Segundo Guimarães (2009) há emergências nas regiões nodais e do entrenó dos ramos caulinares aéreos, tais são constituídas de células epidérmicas e subepidérmicas, são vascularizadas em *S. quinquenervia* e não vascularizadas em *S. subsessiliflora*. Martins (2009) analisando *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides*, destacou a estrutura como sendo uma emergência espiniformes, já que essa estrutura não se trata de um acúleo, pois não são anexos epidérmicos e não podem ser classificadas como espinho, pois não possuem vascularização. Essa denominação também foi adotada no presente estudo.

Figura 5 - Secções longitudinais do ápice caulinar aéreo de *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Visão geral. **B.C.** Detalhes do ápice mostrando a organização da túnica-corpo

Figura 6 - Secções transversais do caule de *Smilax fluminensis* Steud. **A e B.** Terceiro entrenó. Observar a bainha amilífera após reação com cloreto de zinco iodado (**A**) e a ausência d lignificação do periciclo (**B**). **C.** Quinto entrenó. Observar o início da lignificação das células do córtex, do periciclo e do parênquima vascular. **D-F.** Secções transversais do caule aéreo próximo ao solo. Observar o aumento da lignificação (**D-E**), a presença do anel esclerenquimático quase contínuo e a ausência da bainha amilífera (**F**). **G e H.** Caule subterrâneo não espessado. Observar a ausência da bainha amilífera

4.3 Rizóforo

O sistema subterrâneo em *Smilax fluminensis* distribui-se paralelamente a superfície do solo a 10-15 centímetros de profundidade e pode alcançar de vários metros de comprimento (7-12 metros) até que uma nova ramificação aérea seja emitida. Devido a essa distribuição no campo, uma mesma planta pode ser erroneamente confundida com uma população de distribuição agregada (Figura 7A). O sistema é um caule com nós e entrenós marcantes e gemas protegidas por catafilos (Figura 7B). A presença de idioblastos com ráfides e fenólicos nos catafilos protetores da gema axilar do rizóforo em *S. fluminensis* provavelmente esteja associada à proteção contra herbivoria (PRYCHID; RUDALL, 1999). Alguns nós espessam de maneira isolada ou formando uma série (Figura 7B). Na área do espessamento há a formação de duas raízes adventícias em lados opostos à gema axilar (Figuras 7B-D). As primeiras classificações para o sistema subterrâneo do gênero *Smilax* são de Davis (1891) e Holm (1890) que classificaram a estrutura como sendo um rizoma. Essa mesma terminologia foi adotada por Caponetti e Quimby (1956), Oliveira et al. (1973), Palhares e Silveira (2005). No entanto, na revisão taxonômica das espécies brasileiras do gênero *Smilax*, Andreatta (1997) baseada na origem da estrutura descreveu-a como rizóforo em *S. quinquenervia* (ANDREATA; MENEZES, 1999). Também em *Smilax polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006), *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* (MARTINS, 2009) e em *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES, 2009) foi adotado o termo rizóforo. A definição desse termo, proposta por Menezes et al. (1979) em espécies de *Vernonia*, baseia-se no fato de que há dois sistemas de ramificação caulinar e todo o sistema radicular adventício é originado dessa estrutura caulinar subterrânea. Tendo em vista essas considerações o termo rizóforo também é adotado nesse estudo.

A análise anatômica das gemas axilares intumescidas foi de grande importância para esclarecer o processo de espessamento. A partir das secções transversais da área nodal durante a tuberização (Figuras 8A-D), foi possível observar que o processo de intumescimento do rizóforo se dá através da atividade meristemática na região da gema axilar (Figura 9A). Ocorre a instalação do MEP (Meristema de Espessamento Primário) restrito apenas aos flancos laterais da gema (Figuras 9B-D). Esse meristema possui células com paredes delgadas formadas por várias camadas de células achatadas ou não e dispostas tangencialmente (Figura 9B) e forma feixes vasculares colaterais e parênquima para o interior do órgão (Figuras 9C-D) e primórdio de raiz

adventícia (Figura 9E). No rizóforo adulto não foi possível identificar nenhuma faixa meristemática como aquela descrita em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2006), *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* (MARTINS, 2009). Somente nas proximidades da gema axilar observa-se algum crescimento adicional.

Em secção transversal, o rizóforo adulto e espessado apresenta epiderme unisseriada com estômatos (Figura 10). Também em *S. goyazana* (PALHARES; SILVEIRA, 2005), em *S. quinquenervia* (ANDREATA; MENEZES, 1999) e em *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES, 2009) o revestimento do rizóforo adulto é epidérmico. A presença dos estômatos em órgãos caulinares subterrâneos sugere que esses órgãos sejam derivados de estruturas aéreas (ANDREATA; MENEZES, 1999, APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2003). Entretanto, Caponetti e Quimby (1956) descreveram como peridérmico o revestimento do rizóforo. Em *S. polyantha*, o revestimento pode ser realizado tanto pela epiderme quanto pelo córtex (MARTINS, APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006).

O córtex é formado pela hipoderme unisseriada e lignificada, por 10-15 camadas de células parenquimáticas entre as quais ocorre grande quantidade de idioblastos contendo ráfides e outros contendo compostos fenólicos (Figura 10A). Observa-se também a presença de feixes colaterais periféricos envolvidos por células com o mesmo padrão de espessamento parietal das células endodérmicas (Figura 10B). Palhares e Silveira (2005) afirmaram que cada feixe vascular do rizóforo é envolto pela endoderme. Porém, em *S. fluminensis* não foi possível detectar a endoderme em cada feixe e apenas os feixes periféricos é que apresentavam algumas células com os espessamentos parietais. Em outras espécies do gênero não foi encontrada endoderme diferenciada morfológicamente em seus rizóforos (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006, MARTINS, 2009, GUIMARÃES, 2009). A endoderme constitui uma camada de células com paredes espessadas em “U” (Figuras 12 C-D). Van Fleet (1942) analisou o desenvolvimento e distribuição da endoderme em monocotiledôneas, entre elas espécies de *Smilax*, e observou que ao longo do eixo caulinar pode haver descontinuidade da endoderme. É interessante observar que nos caules aéreos de *S. fluminensis* até o quinto entrenó é possível reconhecer a endoderme pelo acúmulo de grãos de amido (bainha amilífera). A partir do quinto entrenó até o nível do solo não é possível reconhecer morfológicamente a endoderme. No entanto, nos caules subterrâneos a endoderme apresenta células com reforço em “U”, essa é contínua com a endoderme das raízes adventícias emitidas pelo caule, porém a continuidade é interrompida pela saída dos feixes

periféricos. Conforme comentado anteriormente algumas células que circundam esses feixes apresentam espessamentos parietais semelhantes ao das células endodérmicas. Segundo Van Fleet (1961) a suberização da endoderme está relacionada às condições do solo e que pode estar presente em todos os órgãos da planta, independentemente da presença de estrias de Caspary. O mesmo autor Van Fleet (1942) analisou o desenvolvimento e distribuição da endoderme em monocotiledôneas, entre elas espécies de *Smilax*, observou que ao longo do eixo caulinar pode haver descontinuidade da endoderme como visto na espécie analisada nesse trabalho.

O cilindro vascular possui periciclo com várias camadas de células alongadas no sentido anticlinal (Figuras 10C-D) e feixes colaterais distribuídos aleatoriamente, os quais geralmente são envolvidos por células de paredes espessadas e lignificadas. Há acúmulo de grãos de amido por todo o cilindro vascular, mas com maior concentração nas células pericíclicas e ao redor dos feixes vasculares (Figuras 10D-E). Os rizóforos têm grande importância por ampliar a rizosfera e exercer a função de armazenamento e condução de água e nutrientes, tratando-se de um órgão de resistência e de propagação vegetativa (ANDREATA; MENEZES, 1999). Segundo Andreatta (1997) o sistema subterrâneo de *S. fluminensis* apresenta 99 % de manose. No presente estudo se observou grande quantidade de grãos de amido por todo o cilindro vascular, em especial, na região pericíclica e ao redor dos feixes vasculares.

Figura 7 - *Smilax fluminensis* Steud **A.** Distribuição da planta no campo. **B-C.** Sistema subterrâneo mostrando os nós intumescidos presença de catafilos saída de ramos aéreos e subterrâneos. Raízes adventícias marrons em **B** e brancas em **C**. **D** Secção transversal de região similar à indicada em **B**. Observar a gema axilar (seta) e a formação de duas raízes adventícias

Figura 8 - *Smilax fluminensis* Steud. **A-D** Secções transversais da região nodal em diferentes estágios de espessamento

Figura 9 - *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Secção longitudinal da gema axilar numa região nodal em início de espessamento. **B.** Detalhe da faixa meristemática indicada em **A.** **C-D.** Formação de feixes completos a partir da área meristemática. **E.** Formação de um primórdio de raiz adventícia num setor abaixo ao indicado em **A**

Figura 10 - Secções transversais do rizóforo adulto de *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Notar a endoderme com espessamentos parietais em “U” e a presença de idioblastos contendo ráfides na região cortical. **B.** Feixe vascular periférico com células similares às endodérmicas (setas). **C-E.** Acúmulo de amido evidenciado pelo cloreto de zinco iodado. Observar o acúmulo maior nas camadas pericíclicas (**D**) e ao redor do feixe vascular (**E**)

4.4 Raízes adventícias

O sistema radicular adventício em *Smilax fluminensis* é constituído por raízes em estágios distintos de desenvolvimento. Há raízes brancas, tenras e de diâmetro maior (Figura 7C) e raízes

marrons, rígidas e de diâmetro variável (Figura 7B). O mesmo foi observado em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006), *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES, 2009) e em *S. brasiliensis*, *S. campestris* e *S. cissoides* (MARTINS 2009). Esse conhecimento é fundamental, pois as raízes são utilizadas para fins farmacológicos (CUNHA, 1937b).

O ápice radicular nas raízes brancas apresenta coifa expandida, possui organização apical do tipo aberta (Figura 11A-C) o ápice possui 1 mm de diâmetro. Nota-se a diferenciação próxima à região do promeristema de idioblastos contendo ráfides, enquanto os idioblastos de conteúdo fenólico diferenciam-se posteriormente. O ápice radicular da raiz marrom possui cerca de 3 mm de diâmetro. A coifa é menos desenvolvida e ocorrem divisões periclinais nas células iniciais (Figura 11B-D). Martins (2009) associou a presença de idioblastos contendo ráfides e compostos fenólicos no ápice das raízes com a proteção.

As raízes brancas representam a fase mais jovem do desenvolvimento, caracteriza-se pela presença dos pelos radiculares e epiderme unisseriada (Figura 12A). O córtex apresenta exoderme unisseriada com paredes providas de estrias de Caspary (Figuras 12B- C), segue-se o parênquima cortical constituído de células isodiamétricas, sendo que as células da penúltima camada cortical apresentam espessamentos na parede periclinal interna e nas paredes radiais (Figura 12D). A endoderme possui células mais alongadas no sentido anticlinal e paredes com estrias de Caspary. No cilindro vascular, o periciclo é formado por cerca de quatro camadas de células com paredes pouco espessas (Figura 12E). A raiz é poliarca, os tecidos vasculares ainda são pouco diferenciados e a medula parenquimática é desprovida de grãos de amido (Figura 12A). A presença de estrias de Caspary na exoderme em *S. fluminensis* na raiz branca, não foi descrita na exoderme de *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006), *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* (MARTINS 2009), *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES, 2009). Caponetti e Quimby (1956) ao analisarem a *S. herbacea*, descreveram a camada de células logo abaixo da epiderme como hipoderme.

Com o desenvolvimento, ocorre a lise (Figura 12E) e eliminação gradual da epiderme e de todo o parênquima cortical diferentemente do que foi observado em *S. polyantha* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA 2006), *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* (MARTINS, 2009), *S. quinquenervia* e *S. subsessiliflora* (GUIMARÃES, 2009) nas quais o córtex interno persiste. A raiz se torna marrom e rígida nesse estágio. O revestimento passa a ser exercido pela parede periclinal interna da penúltima camada do córtex e pela endoderme, nessa fase, com

paredes espessas e altamente lignificadas (Figura 12H). O tipo de espessamento da endoderme foi apontado como critério anatômico distintivo por Cunha (1940) e Caponetti e Quimby (1956) para a delimitação de espécies de *Smilax*. *S. polyantha*, *S. subsessiliflora*, *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* (MARTINS; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006, GUIMARÃES, 2009; MARTINS, 2009) apresentaram a endoderme com reforço em “O”, enquanto em *S. fluminensis* o espessamento era em “U”. O acúmulo de grãos de amido ocorre na medula da raiz marrom a qual exerce a função de reserva. Seguindo a classificação de Oliveira e Akissue (1989) para a morfologia dos grãos de amido, na espécie analisada, os grãos de amido são poliédricos (compostos) e esféricos e (simples) (Figura 12I). Martins (2009) descreveu grãos de amido esféricos e isolados em *Smilax goyazana* e *S. brasiliensis*, poliédrico e composto em *S. oblongifolia*, *S. campestris* e *S. cissoides*.

Figura 11 - **A-D.** Secções longitudinais do ápice radicular de *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Visão geral do ápice radicular de uma raiz branca. **B.** Visão geral do ápice radicular de uma raiz marrom. **C.** Detalhe da região meristemática de uma raiz branca com organização aberta. **D.** Detalhe da região meristemática de uma raiz marrom

Figura 12 - Secções transversais da raiz de *Smilax fluminensis* Steud. **A.** Raiz branca revestida pela epiderme. **B.** Raiz branca corada com berberina observada sob luz polarizada. **C.** Detalhe da exoderme com estrias de Caspary. **D.** Penúltima camada do córtex com paredes espessadas e células altas da endoderme. **E.** Início do processo lisígeno (seta) das células do córtex. **F.** Detalhe do espessamento parietal da endoderme com reforço em “U” e periciclo. **G.** Raiz marrom revestida pela parede da penúltima camada do córtex e endoderme. **H.** Detalhe do revestimento da raiz marrom. **I.** Grãos de amido esféricos (seta maior) e poliédricos (seta menor) localizados na medula

4.5 Perfil cromatográfico

O rendimento dos extratos metanólicos após a evaporação dos solventes indica os órgãos que apresentam os melhores rendimentos. O rendimento encontrado para ramos aéreos foi de 15,4%, 32,4% para rizóforo e de 52,2% para raiz. Esses resultados evidenciaram as raízes como as estruturas de melhor rendimento de extração seguidas dos rizóforos e folhas.

As classes de substâncias encontradas nos extratos metanólicos de *Smilax fluminensis* foram evidenciadas pelos picos que aparecem na Figura 13 e descritos na Tabela 1. Os picos evidenciados estão divididos pelos órgãos da planta que foram analisados (ramos, rizóforos e raízes) e, a partir desses dados agrupados na Tabela 1, podemos detectar particularidades que podem ser utilizadas como características distintivas entre órgãos e também entre espécies podendo auxiliar em análises taxonômicas utilizando tais produtos do metabolismo secundário.

A co-injeção de padrões comerciais durante as análises realizadas por HPLC-UV-PDA permitiu a identificação dos picos 4 (ácido clorogênico), 11 (ácido cafeico), 25 (rutina), 50 (ácido *p*-cumárico), 34 (ácido ferúlico) e 66 (ácido *trans*-cinâmico) nos extratos de raiz, rizóforo e folhas (Figuras 13 e 14). Os demais picos ainda não foram identificados.

As análises realizadas para determinar o perfil químico da espécie de *Smilax fluminensis* obtidas no presente estudo foram observadas em outras espécies do gênero que, segundo Martins (2009), as espécies de *Smilax* apresentam semelhanças químicas. Verificou-se que os ácidos clorogênico, *p*-cumárico e ferulico, são comuns no metabolismo secundário das seguintes espécies *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* (MARTINS, 2009) e na espécie analisada nesse trabalho.

As classes de substâncias encontradas também foram detectadas em outros trabalhos com outras espécies do gênero *Smilax*, demonstrando 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).

Embora as classes de substâncias sejam semelhantes entre as espécies alguns picos que foram detectados na espécie analisada diferem de outras espécies analisadas por Martins (2009). Dessa forma os picos 6, 56 estão presentes na maioria das vezes apenas nos extratos metanólicos de *S. fluminensis*. Alguns picos foram encontrados em outras espécies, entretanto estão ausentes em *S. fluminensis*.

A correta determinação das classes químicas correspondentes a esses picos pode expressar diferenças significativas entre as espécies através do seu metabolismo secundário. No entanto, a produção dos metabólitos secundários pode ser alterada por fatores ambientais, que podem comprometer as análises das substâncias isoladas (MARTINS, 2009).

Segundo Martins e Appezzato-da-Glória (2006) a identificação de compostos de classes de ácidos fenólicos confirma o que é observado nas análises anatômicas, ou seja, a reação positiva para cloreto férrico em idioblastos presentes nos tecidos das folhas, raízes e rizóforos.

Na medicina popular as espécies brasileiras estão relacionadas a propriedades analgésicas (MONTEIRO; ANDREATA, 1997), depurativas, antirreumáticas, diuréticas e para problemas hepáticos (ALMEIDA et al., 1998). Stellfeld (1938) atribui à salsaparrilha a propriedade de aumentar o teor de colesterol no sangue, tendo 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. Medeiros et al. (2007) ainda cita as propriedades antibiótica, diurética e depurativa conferidas as salsaparrilhas.

Os ensaios farmacológicos realizados com extratos de outras espécies do gênero confirmaram as mesmas atividades farmacológicas descritas na medicina popular, como em *S. aspera*, *S. bockii* e *S. glabra* (DEMO et al., 1998; XU et al., 2005; CHEN et al., 1999; JIANG; XU, 2003, JIANG et al., 1997) que apresentaram substâncias que estão relacionadas a atividade antioxidante, antiinflamatória, antirreumática e como hepatoprotetor. Em *Smilax glyciphylla*, Cox et al. (2005) observou que o consumo do chá dessa espécie pode reduzir o dano oxidativo no trato gastrointestinal atribuindo mais uma atividade farmacológica para o gênero.

Figura 13 - Perfil Cromatográfico dos extratos MeOH de *Smilax fluminensis* Steud. (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 1 - Tempos de retenção relacionados a cada um dos picos dos espectros observados no cromatograma em *Smilax fluminensis* Steud. (Ra) raiz, (Ri) rizóforo (Fo) folhas

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

Figura 14 - Espectros representativos na região do ultravioleta referentes aos picos indicados nos cromatogramas dos extratos MeOH de *Smilax fluminensis* Steud

4.6 Germinação de sementes

O experimento de germinação de sementes foi acompanhado semanalmente desde a instalação do experimento em 30 de junho de 2008 até fevereiro de 2009, totalizando 30 semanas. A germinação foi constatada após a terceira semana de instalação do experimento a partir da emissão da parte aérea, pois as sementes foram germinadas em caixas contendo areia.

Para todas as combinações de temperatura e luz estudadas não houve diferença significativa entre claro e escuro, ou seja, a luz não interferiu na taxa de germinação (fotoblásticas neutras). Os resultados indicaram que não foram encontradas diferenças significativas entre as temperaturas alternada 20-30°C e as constantes 25 e 30°C. A temperatura 20-35°C diferiu significativamente das demais com a menor taxa de germinação (Figura 15).

Figura 15 - Germinação (%) de sementes de *Smilax fluminensis* Steud. sob quatro temperaturas associadas à luz e ao escuro. Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa quanto à luz e letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa quanto às temperaturas

A porcentagem média de germinação verificada ao final do experimento foi de 79% para o tratamento 30°C, 65% para o tratamento 25°C, 73% para o tratamento 20-30°C e 29% para o tratamento 20-35°C. O IVG (Índice de Velocidade de Germinação) foi mais alto para as temperaturas de 30°C (2.84) e 20-30°C (1.63) (Tabela 2).

Tabela 2 - Germinação (%) de sementes de *Smilax fluminensis* Steud. sob quatro temperaturas associadas à luz e ao escuro, no período de junho de 2008 a fevereiro de 2009 e IVG (Índice de Velocidade de Germinação)

Temperaturas	Fotoperíodo	IVG	ESCURO	IVG
	8 horas			
30°C	73	2.04	85	2.84
25°C	65	1.68	65	1.14
20-30°C	80	2.16	66	1.63
20-35°C	24	0.95	33	0.89

Nos tratamentos 30°C e 20-30°C, a maior parte das sementes que não germinou apresentava fungos (Tabela 3). No tratamento 20-35°C, 76 sementes ainda apresentavam viabilidade, ou seja, 53% das sementes que não germinaram.

Tabela 3 - Viabilidade de sementes verificada a partir do teste do Tetrazólio após a desinstalação do experimento de germinação de sementes de *Smilax fluminensis* Steud. (V) Número de sementes viáveis não germinadas; (E) Número de sementes sem embrião ou com embrião que não apresenta coloração rósea após o teste; (FU) Número de sementes com fungos; (Ge) Número de sementes germinadas

	Temperatura (°C)															
	25				30				20-35				20-30			
	V	E	FU	Ge	V	E	FU	Ge	V	E	FU	Ge	V	E	FU	Ge
Número de sementes	30	12	28	130	5	2	33	158	76	8	59	57	4	5	45	146

No presente estudo as sementes germinaram 20 dias após a instalação do experimento, enquanto em *S. campestris* a germinação ocorreu após 30 dias (ROSA; FERREIRA, 1999), em *S.*

rufescens, *S. elastica*, *S. syphilitica*, *S. quinquenervia* e *S. syringoides* variou entre 39 a 93 dias (ANDREATA; PEREIRA, 1990), em *Smilax oblongifolia* 40 a 100 dias (PALHARES et al., 2009) e em *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. brasiliensis* e *S. polyantha* variou de 22 e 36 dias (MARTINS, 2009). Segundo Pogge e Bearce (1989) o aumento na intensidade de luz pode reduzir o tempo para o início da germinação, como foi visto também em *S. brasiliensis* (MARTINS, 2009), entretanto nessa pesquisa a luz não interferiu no início da germinação de *S. fluminensis*.

A presença ou ausência de luz não foi um fator influenciador na taxa de germinação para *S. fluminensis* assim como em *S. campestris*, *S. cissoides* e *S. polyantha* (MARTINS, 2009), embora Rosa e Ferreira (1999) tenham observado que, em *S. campestris*, a maior taxa de germinação ocorreu no escuro. No entanto, Pogge e Bearce (1989) relataram que as espécies encontradas em áreas mais abertas como *S. glauca*, precisam de uma maior intensidade luminosa para a germinação do que as ocorrentes em ambientes mais sombreados como *S. rotundifolia*. Segundo os autores, a luminosidade parece ser um fator limitante para a germinação em *S. rotundifolia*.

As melhores porcentagens de germinação obtidas para *S. fluminensis* foram de 80% em 20-30° C no claro e 85% a 30°C no escuro, estão próximas dos resultados obtidos por Martins (2009), ou seja, 82%, 78% e 55%, na temperatura de 20-30° C, no claro em *Smilax campestris* e *S. cissoides* e no escuro em *S. brasiliensis*. Rosa e Ferreira (1999) observaram que a maior taxa de germinação em *S. campestris* foi de 71% no claro sob a temperatura de 30°C. Segundo Pogge e Bearce (1989), em *S. rotundifolia* a taxa de germinação foi de e em *S. glauca* 82% sob a temperatura de 22°C.

4.7 Enraizamento de estacas

As estacas de ramos aéreos não enraizaram nos dois tratamentos sendo que, após quatro meses do início do experimento, todas as estacas estavam mortas. Por sua vez, as estacas de ramos subterrâneos, após um ano da instalação do experimento, não apresentaram diferença significativa para os tratamentos com e sem o fitorregulador para a porcentagem de estacas vivas enraizadas (60% e 56%, respectivamente), porcentagem de estacas mortas (40% e 44%), comprimento médio das três maiores raízes (17.4 cm e 18.8 cm), número médio de raízes (6.8 e

6.2), número médio de folhas (5.5 e 5.2), número médio de brotos por estaca enraizada (1.8 e 1.7) e comprimento dos brotos (19.0 cm e 13.1 cm). Houve diferença significativa em relação à massa fresca e seca de raízes com valores maiores nos tratamentos com hormônio (16.7g e 1.8 g, respectivamente) em relação ao controle (5.9 e 1.1g, respectivamente) (Figura 16).

Figura 16 - Variáveis analisadas para as estacas provenientes de ramos subterrâneos de *S. fluminensis* Steud. submetidas aos tratamentos controle e com ácido indolbutírico (IBA) 100 ppm após 12 meses da instalação do experimento. Letras iguais indicam que não há diferença significativa em cada variável analisada

Kersten et al. (1993) citam o outono como a melhor época para a confecção de estacas, pois nesta época os ramos apresentariam uma quantidade maior de carboidratos, o que influencia na porcentagem de enraizamento (BONA, 2002; SOUZA et al., 2006). Também Mayer et al. (2008) e Hartmann et al. (2002) sugerem que há uma relação entre a elevada taxa de enraizamento e o alto teor de carboidratos disponíveis. Em *S. fluminensis* foi possível observar tal correlação, pois as estacas de ramos aéreos que não enraizaram apresentaram pequeno acúmulo de grãos de amido, enquanto esse acúmulo foi expressivo nas estacas de ramos subterrâneos (Figura 17A e B).

Figura 17 - Cortes transversais das estacas de ramo aéreo (A) e subterrâneo (B) de *Smilax fluminensis* Steud. submetidas ao teste com lugol, evidenciando a presença de grãos de amido (setas) nas células do cilindro vascular

De Bona et al. (2005), Biasi et al. (2000) e Biasi e Costa (2003) relataram que o uso do IBA não aumentou o número de estacas enraizadas, entretanto o uso da auxina favoreceu o sistema radicular, aumentando a massa fresca e seca de raízes, como constatado neste trabalho.

Ayanoglu et al. (2002) estudando estacas de *Salvia indica* observaram que a aplicação do IBA não aumentou o número de estacas enraizadas. Porém, os autores mesmo assim sugerem o uso da auxina em baixas concentrações, como a utilizada no presente estudo (100ppm), por propiciar um melhor enraizamento devido ao aumento no número de raízes e suas ramificações (HARTMANN et al., 2002). Esse número maior de raízes por estaca facilita o transplante das mudas no campo (CARVALHO; ZAIDAN, 1995), pois durante o processo muitas raízes são danificadas.

Em *Smilax fluminensis* a formação das raízes adventícias nas estacas não envolve a formação de calo e nem ocorre na região basal das estacas (Figura 18A-B), mas sim após o intumescimento da gema axilar (Figura 18 C-D). Todo o sistema radicular adventício é formado na região basal da gema intumescida (Figuras 18 C-D) que permaneceu encoberta pelo substrato. Essas gemas formam novos ramos que, por sua vez, podem exibir gema axilar intumescida (Figura 18 B-D). A formação de raízes associada ao intumescimento de gemas axilares já foi descrito para outras espécies do gênero por Martins (2009).

Figura 18 - **A-D**. Estacas enraizadas de ramos subterrâneos de *Smilax fluminensis* Steud. após 12 meses da instalação do experimento. Observa-se que todo o sistema radicular adventício é formado na região basal da gema intumescida (**C-D**)

4.8 Capacidade de rebrotamento no campo

Na retirada dos ramos aéreos e parte dos ramos subterrâneos de distribuição plagiotrópica (Figura 19A) para a confecção das estacas (Figura 19B) sempre foi deixado uma região nodal intumescida (Figura 19C). O rebrotamento das plantas teve início após 30 dias da instalação do experimento com o desenvolvimento dos novos brotos (Figura 19D).

Figura 19 - A. Distribuição plagiotrópica dos ramos subterrâneos de *Smilax fluminensis* Steud. B e C. As regiões de poda, próximas à região nodal, foram marcadas no campo. D. Rebrotamento após 30 dias da instalação do experimento. E e F. Desenvolvimento dos novos ramos aéreos

Ao final do experimento todas as plantas apresentaram novos brotamentos, de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento. Os maiores ramos tinham em média 1.80 metros de comprimento. Cada planta formou em média 4.05 novos brotamentos. O desenvolvimento dos ramos foi mais evidente a partir do 5º mês do experimento, ou seja, na estação favorável do desenvolvimento no Cerrado devido ao aumento de temperatura e de precipitações (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico mostrando o número de novos brotamentos por área, a partir de ramos subterrâneos plagiotropicos de *Smilax fluminensis* Steud. ao longo de 12 meses

O rebrotamento no campo assim como a propagação assexuada por meio das estacas tem a vantagem de manter as características genéticas dos indivíduos e diminuir as possíveis alterações na produção dos metabólicos secundários que, segundo Ming (1994), é um dos maiores desafios para o cultivo e o manejo dessas espécies medicinais. Segundo o autor, a produção de metabólicos secundários na planta pode ser alterada por diversos fatores ambientais e genéticos conseqüentemente influencia na produção dos princípios ativos responsáveis pela ação farmacológica.

As espécies cujas partes utilizadas para o preparo dos medicamentos são as raízes correm maior risco de extinção (RODRIGUES; CARVALHO, 2001) como é o caso das espécies do gênero *Smilax*. Portanto, a capacidade de propagação por sementes e por estacas e de regeneração de ramos aéreos após a remoção de parte das estruturas subterrâneas em *S. fluminensis* confirma o seu potencial para a exploração econômica de maneira sustentável, sendo uma alternativa para reduzir o extrativismo predatório dessa espécie nativa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características morfo-anatômicas descritas no presente estudo poderão ser úteis na diagnose de *Smilax fluminensis* Steud. A análise do perfil químico dos extratos metanólicos da raiz, rizóforos e folhas apresentaram picos correspondentes às substâncias: ácido clorogênico, ácido cafeico, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido *trans*-cinâmico semelhantes aos identificados em outras *Smilax* por Martins (2009). A presença de substâncias como ácidos fenólicos e flavonóides pode estar relacionada à atividade antioxidante, antiinflamatória, antirreumática. No entanto, há alguns picos distintos das demais espécies cuja classe de substâncias não pode ser identificada. Portanto, sugere-se a continuidade de estudos de química e a realização de testes farmacológicos para verificar se há de fato atividade antiinflamatória. A capacidade de propagação por sementes, por estacas e de regeneração de ramos aéreos após a remoção de parte das estruturas subterrâneas confirma o seu potencial para a exploração econômica de maneira sustentável, sendo uma alternativa para reduzir o extrativismo predatório dessa espécie nativa caso o seu potencial farmacológico seja confirmado.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, CPAC, 1998. 464 p.
- ANDREATA, R.H.P. **Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax* Linnaeus (Smilacaceae)**. 1995. 397 p. Tese (Doutorado em Botânica)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- _____. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax Linnaeus* (Smilacaceae). **Pesquisas-Botânica**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 7-244, 1997.
- _____. Smilacaceae. In: _____. **Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso (São Paulo, Brasil)**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2000. v. 7
- ANDREATA, R.H.P.; MENEZES, N.L. Morfoanatomia do embrião, desenvolvimento pós-seminal e origem do rizóforo de *Smilax quinquenervia* Vell. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 18, p. 39-51, 1999.
- ANDREATA, R.H.P.; PEREIRA, T.S. Morfologia das plântulas de algumas espécies de *Smilax* L. **Pesquisas-Botânica**, Rio de Janeiro, v. 41: 7-24, 1990.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. **Morfologia de sistemas subterrâneos: histórico e evolução do conhecimento no Brasil**. Viçosa: Ed. da Universidade Federal de Viçosa, 2003. 80 p.
- AYANOGLU, F.; MERT, A.; ERDOGAN, C.; KAYA, A. Propagation of some native grown medicinal plants by stem cuttings. **Journal of Herbs, Spices e Medicinal Plants**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 405- 411, 2002.
- BARRADAS, M.M.; FIGUEIREDO, R.C.L. Contribuição ao estudo da nervação foliar de plantas dos cerrados – Liliaceae, subfamília Smilacoideae. **Hoehnea**, Botucatu, v. 4, p. 1-11, 1974.
- BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326 p.
- BERNARDO, R.R.; PINTO, A.V.; PARENTE, J.P. Steroidal saponins from *Smilax Officinalis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, p. 465-469, 1996.
- BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia Alba*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 455-459, 2003.
- BIASI, L.A.; DE BONA, C.M. Propagação de carqueja (*Bacharis trimera* (Less) A.P. de Candolle) por meio de estaquia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 37-43, 2000.

- BONA, C.M. **Estaquia calagem e sombreamento de carqueja**. 2002. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD-DNDV- CLAV, 1992. 365 p.
- BURGER, L.M.; RICHTER, H.G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 154 p.
- CAPONETTI, J.D.; QUIMBY, M.W. The comparative anatomy of certain species of *Smilax*. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Washington, v. 45, p. 691-696, 1956.
- CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P. Obtenção de plantas de *Stevia reubaudiana* através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 201-206, 1995.
- CHEN, T.; LI, J.; CAO, J.; XU, Q.; KOMATSU, K.; NAMBA, T. A new flavonone isolated from rhizome *Smilax glabra* and structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. **Planta Medica**, New York, v. 65, p. 56-59, 1999.
- COX, S.D.; JAYASINGHE, K.C.; MARKHAM, J.L. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (*Smilax glycyphylla*). **Journal-of-Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 101, p. 162-168, 2005.
- CUNHA, N.S. Curiosa falsificação de salsaparrilha. **Revista da Associação Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 399-352, 1937.
- DAVIS, W.T. Variations in rootstock of *Smilax glauca* dependent upon environment. **Bull. Journal of the Torrey Botanical Society**, Athens, v. 18, p. 118-119, 1891.
- DE BONA, C.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Propagação por estaquia de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., *Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle e *Baccharis stencephala* Baker com uso de auxinas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 2, p. 26-31, 2005.
- DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. **Food Research International**, Toronto, v. 31, p. 351-354, 1998.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manuel de technique botanique**. Paris: Lamarre, 1928. 594 p.
- DU, Q.; LI, L.; JERZ, G. Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v. 1077, p. 98-101, 2005.
- ERVIN, E.L.; EVERT, R.F. Aspects of sieve element ontogeny and structure in *Smilax rotundifolia*. **Botanical Gazette**, London, v. 128, p. 138-144, 1967.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.S.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed.Universidade de Santa Catarina, 1999. p. 197-220.

FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; PETROVICK, P. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 1, p. 73-82, 1985.

GATTUSO, S.J. Exomorfología y anatomía de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 14, p. 181-190, 1995.

GUAGLIANONE, E. R.; GATTUSO, S. Estudios taxonômicos sobre el genero *Smilax* (Smilacaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Cordoba, v. 27, p. 105-129, 1991.

GUIMARÃES, A.R. **Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax quinquenervia* Vell. e *S. subsessiliflora* Duham. (Smilacaceae)**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Botânica) - Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GUO, M.; KOIKE, K.; LI, W.; GUO, D.; NIKAIDO, T. Matol glucosides from the tuber of *Smilax bockii*. **Phytochemistry**, Maryland Heights, v. 65, p. 481-484, 2004.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES-JUNIOR, R.F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HOLM, T. Contributions to the knowledge of the germination of some North American plants. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, Athens, v. 2, p. 57-108, 1890.

HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, Washington, v. 163, p. 817-818, 1969.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.

JIANG, J.; XU, Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 85, p. 53-59, 2003.

JIANG, J.; WU, F.; LU, J.; LU, Z.; XU, Q. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *Rhizoma smilacis glabrae*. **Pharmacological Research**, Maryland Heights, v. 36, p. 309-314, 1997.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 528 p.

- JU, Y.; JIA, Z. Steroidal saponins from rhizomes of *Smilax menispermoides*. **Phytochemistry**, Maryland Heights, v. 31, p. 1349-1351, 1992.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 210 p.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KERSTEN, E.; LUCCHESI, A.A.; GUTIERREZ, L.E. Efeito do Ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ramos de plantas de ameixeira (*Prunus salicina*, Lindl.) **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 29-36, 1993.
- LEE, S.E.; JU, E.M.; KIM, J.H. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. **Experimental and Molecular Medicine**, Seoul, v. 33, p. 263-268, 2001.
- LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MARONI, B.C.; DI STASI, L.C; MACHADO, S.R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu**. Botucatu: Editora UNESP, 2006. 194 p.
- MARQUETE, O.; PONTES, R.G. Estudo anatômico foliar comparativo de *Smilax spicata* Vell., *Smilax rufescens* Griseb. e *Smilax fluminensis* Steudel. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 54, p. 413-426, 1994.
- MARTIN, B.F.; TUCKER, S. C. Developmental studies in *Smilax* (Liliaceae) I. Organography and the shoot apex. **American Journal of Botany**, Saint-Louis, v. 72, p. 66-74, 1985.
- MARTINS, A.R. **Morfoanatomia dos órgãos vegetativos e perfil químico de espécies do gênero *Smilax* L. (Smilacaceae)**. 2009. 158 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- MARTINS, A.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfoanatomia de órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, p. 555-567, 2006.
- MAYER, J.L.S.; CARDOSO, N.A.; CUQUEL, F.; BONA, C. Formação de raízes em estacas de duas espécies de *Calliandra* (Leguminosae- Mimosoideae). **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 3, p. 487-495, 2008.

MEDEIROS, M.F.T.; SENNA-VALLE, L.; ANDREATA, R.H.P. Histórico e o uso da “salsaparrilha” (*Smilax spp*) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 5, p. 27-29, 2007.

MENEZES, N.L. de; MULLER, C.; SAJO, M.G. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais) Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 7, p. 33- 38, 1979.

MING, L.C. Estudos e pesquisas de plantas medicinais na agronomia. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 12, p. 3-9, 1994.

MONTEIRO, M.H.D.A.; ANDREATA, R.H.P. A pharmacological and botanical study of *Smilax quinquenervia* Velloso from Brazil. In: SIMPOSIO ECUATORIANO DE ETNOBOTÁNICA Y BOTÁNICA ECONÓMICA, 2., 1997, Quito. **Memorias...** Quito, 1997. p. 383-395.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. 222 p.

OLIVEIRA, F.; SILVA, J.B.; ROCHA, A.B. Contribuição para o reconhecimento do rizoma de *Smilax japecanga* Grisebach. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, Araraquara, v. 7, p. 7-18, 1973.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 464 p.

OOI, L.S.M.; SUN, S.S.M.; WANG, H.; AND OOI, V.E.C. New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of salsaparrilha *Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 6091-6095, 2004.

PALHARES, D.; SILVEIRA, C.E.S. Estudo anatômico do rizoma de *Smilax goyazana* A.DC. (Smilacaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, p. 52-62, 2005.

PALHARES, D.; TINÉ, M.A.; VINHA, D.; SILVEIRA, C.E.S.; ZAIDAN, L.B.P. Studies on the seeds of *Smilax goyazana* A.DC (Smilacaceae). **Phyton**, Graz, v. 49, p. 117-130, 2009.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. v. 4, 765 p.

POGGE, F.L.; BEARCE, B.C. Germinating common and cat greenbrier. **Tree Planters' Notes**, Oxford, v. 40, p. 34-37, 1983.

PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. **Annals of Botany**, Oxford, v. 84, p. 725-739. 1999.

RODRIGUES, E.V.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento Etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROSA, S.G.T.; FERREIRA, A.G. Germination of medicinal plant: *Smilax campestris* Griseb. (salsaparrilha). **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 502, p. 105-111, 1999.

SAJO, M.G.; MACHADO, S.R. Submicroscopical features of leaves of *Xyris* species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 405-410, 2001.

SAKAI, W.S. Simple Method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-248, 1973

SANTOS, M.R.A.; PAIVA, R.; GOMES, G.A.C.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, L.V. Estudos sobre superação de dormência em sementes de *Smilax japecanga* Grisebach. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 319-324, 2003.

SHU, X.S.; GAO, Z.H.; YANG, X.L. Supercritical fluid extraction of saponins from tubers of *Smilax china*. **Fitoterapia**, Maryland Heights, v.75, p. 656-661, 2004.

SILVA, R.A.D. **Farmacopéia (Pharmacopéia) dos Estados Unidos Do Brasil**. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional, 1929. 186 p.

SOUZA, L.A.; SACRAMENTO, L.V.S; MING, L.C. Propagação por estaquia de três acessos de *Baccharis trimera* em fenofase reprodutiva. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 189-192, 2006.

SOUZA, S.O.C.; DE TONI, K.G.L.; ANDREATA, R.H.P.; COSTA, G.C. Anatomia e vascularização das flores estaminadas e pistiladas de *Smilax fluminensis* Steud (Smilacaceae). **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 56: 87: 107-121, 2005.

STELLFELD, C. A salsaparilha do Paraná e a ausência do parênquima cortical. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 6, p. 5-7, 1938.

STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. London: George Allen, 1913. 527 p.

VANDERCOLME, E. História botânica e terapêutica das salsaparrilhas. **Revista da Flora Medicinal**, Rio de Janeiro, v.7/11, p. 316-524, 1947.

VAN FLEET, D.S. The development and distribution of the endodermis and an associated oxidase system in monocotyledonous plants. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 29, p. 1-15, 1942.

_____. Histochemistry and function of the endodermis. **Botanical Review**, Philadelphia, v. 27, p. 165–221, 1961.

XU, J.; LI, X.; ZHANG, P.; LI, Z.; WANG, Y. Antiflammatory constituents from the roots of *Smilax bockii* Warb. **Archives of Pharmacal Research**, Amsterdam, v. 28, p. 395-399, 2005.

YATES, I.E.; DUNCAN, W.H. Comparative studies of *Smilax*, section *Smilax*, of the southeastern United States. **Rhodora**, Petersham, v. 72, p. 289-312, 1970.