UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA LABORATÓRIO DE ANATOMIA VEGETAL

Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* Mart., *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog.

Andresa Vieira Machado

Florianópolis, fevereiro de 2002.

Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* Mart., *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog.

Andresa Vieira Machado

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Marisa Santos

Florianópolis, fevereiro de 2002.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	
OBJETIVOS	
OBJETIVOS GERAIS	
MATERIAIS E METODOS	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
1. Morfologia Foliar	9
2. Anatomia Foliar	
2.1. Lâmina foliar	
2.1.1. Caracterização geral	
2.1.2. Epiderme	
2.1.3. Mesofilo	
2.1.4. Nervura Mediana	
2.1.6. Bordo	
2.2. Pecíolo	
CONCLUSÕES	
BIBLIOGRAFIA	24
ILUSTRAÇÕES	
ANEXOS ERRO	D! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

RESUMO

Espinheira-santa é uma planta conhecida na medicina popular por suas propriedades tônicas e balsâmicas. Maytenus ilicifolia Mart. Ex Reiss (Celastraceae) é a verdadeira espinheira-santa, entretanto, duas outras espécies, Sorocea bonplandii Baillon (Moraceae) e Zollernia ilicifolia Vog. (Leguminosae Papilionoideae), são freqüentemente confundidas, no Sul do Brasil, devido à semelhança morfológica das folhas. O conhecimento morfo-anatômico das folhas pode contribuir com a identificação taxonômica das três espécies, fator indispensável para pesquisas referentes ao uso fitoterápico e ao controle de qualidade. O estudo foi realizado em microscopia óptica, usando material fresco e fixado em glutaraldeído 2,5%, desidratado em série etílica e incluído em hidroximetacrilato ou parafina. Para as análises em microscópio eletrônico de varredura algumas amostras, depois de desidratadas em série etílica, foram imersas em HMDS para total secagem. Foram feitos cortes paradérmicos e transversais na região média da lâmina foliar e transversais e longitudinais no pecíolo. Testes histoquímicos foram empregados para identificação da natureza química das estruturas. A folha de M. ilicifolia é do tipo oblonga estreita, com ápice atenuado, enquanto a de S. bonplandii é obovada oblongolanceolada, com ápice acuminado, e a de Z. ilicifolia é elíptica estreita, com ápice obtuso. Outras características morfológicas da lâmina foliar como: ângulo de divergência das nervuras secundárias, ângulo de origem das nervuras terciárias, as terminações de nervuras e as aréolas, também podem ser utilizadas como ferramentas para diferenciação taxonômica. De modo a complementar a caracterização morfo-anatômica das folhas, foram feitas as seguintes análises quantitativas: determinação de índice estomático, medidas de espessura de membrana cuticular e do mesofilo. Nas três espécies as folhas são dorsiventrais e hipoestomáticas. O mesofilo é constituído de parênquimas paliçádico e esponjoso, mas apenas Z. ilicifolia apresenta hipoderme na face adaxial. Os estômatos são do tipo paracítico em M. ilicifolia e Z. ilicifolia e do tipo anomocítico em S. bonplandii. Tricomas ocorrem em Z. ilicifolia e em S. bonplandii, não tendo sido encontrados em M. ilicifolia. Destaca-se, ainda, apenas em S. bonplandii, a presença de vasos laticíferos predominantemente associados ao floema. A abertura glandular do dente de M. ilicifolia possui tricomas, enquanto às de S. bonplandii e Z. ilicifolia são glabras. A forma e disposição dos tecidos na nervura central, no bordo e no pecíolo apresentam características distintas nas três espécies. Os resultados revelaram que algumas características morfo-anatômicas da lâmina foliar e do pecíolo podem ser utilizadas na distinção entre as três espécies.

INTRODUÇÃO

Maytenus ilicifolia Mart. (Celastraceae), popularmente chamada de espinheirasanta, é uma planta nativa do Brasil e largamente cultivada na região Sul, bem como em Minas Gerais e São Paulo. É um arbusto de até 3 metros de altura, com folhas alternas persistentes, simples, glabras, coriáceas, oblongas a oblongolanceoladas, ápice espinhoso, margem dentada espinhosa. Suas flores são pequenas e estão dispostas em fascículos axilares. Seu fruto é uma cápsula verde ou vermelha (Gupta, 1995).

É conhecida na medicina popular por suas propriedades tônicas e balsâmicas. Conforme Simões *et al.* (1995), suas folhas são utilizadas popularmente como antiasmática, anticonceptiva, em tumores estomacais e contra ressaca alcoólica (uso interno); como antisséptica em feridas e úlceras (uso externo). De acordo com revisões feitas por estes autores, estudos químicos e farmacológicos revelam propriedades medicinais da espécie.

Devido a crescente busca do mercado por ervas medicinais e pela desordenada extração das mesmas, *Maytenus ilicifolia* está em perigo de extinção (Pavan-Fruehauf, 2000). De acordo com Reis (1996), o que poucos sabem é que na falta das ervas corretas, muitos colhem plantas parecidas e vendem-nas como se fossem plantas originais. É o que acontece hoje com a espinheira-santa, muito confundida no Sul do Brasil devido à semelhança morfológica das folhas, com duas outras espécies sem propriedades farmacológicas conhecidas, *Sorocea bonplandii* Baillon (Moraceae) e *Zollernia ilicifolia* Vog. (Leguminosae Papilionidae).

Estudos fitoterápicos, conforme Simões e colaboradores (1999), costumam ser divididos em etapas seqüenciais: etapa botânica, relacionada à identificação do material de estudo; etapa farmacêutica, etapa de ensaios biológicos pré-clínicos e etapa clínica. Sendo que, a primeira etapa, seleção do material testado, como ressaltam estes autores, é essencial para garantir a uniformidade e a estabilidade do produto a ser utilizado durante todo ensaio. Evans (1996) enfatiza que quando a planta medicinal oferece dificuldades já na fase preliminar, todo estudo fica comprometido, sendo comum a confusão botânica entre espécies afins.

Para a identificação das espécies é aconselhável a presença de flores e/ou frutos; a falta dessas estruturas pode induzir ao erro ou dificultar extremamente o trabalho do botânico. O mesmo nome popular pode significar diferentes espécies. Na caracterização de uma espécie, para sua determinação ou identificação, usualmente inicia-se por observar as estruturas macroscópicas. Nas análises de rotina são necessários conhecimentos básicos de botânica, disponibilidade de literatura especializada e, preferencialmente, de material para

comparação, tais como amostras autênticas, desenhos ou fotos. Os critérios devem basear-se na descrição dos elementos característicos da espécie, sendo, geralmente, desnecessária a descrição botânica completa. Para tal, conforme Evans (1996), é essencial o estabelecimento de estruturas que permitam a diferenciação entre a espécie medicinal ou farmacopéica e espécies freqüentemente encontradas como adulterantes.

O processo de identificação constitui-se em um dos objetivos básicos da taxonomia vegetal e uma das ferramentas mais utilizadas nesse processo é a chave diagnóstica. As chaves fornecem uma descrição das plantas, mostrando caracteres diagnósticos essenciais, por meio dos quais os táxons podem ser identificados. A escolha desses caracteres é de fundamental importância na elaboração da chave e a presença desses é essencial para a identificação. Assim, o uso de características vegetativas como elementos diagnósticos para espécimes vegetais têm sido considerados cada vez mais relevantes no processo de identificação, em especial daquelas relacionadas à forma das partes constituintes do vegetal. Embora a forma há muito tempo seja aceita como elemento importante no estudo taxonômico, a sua aplicação não tem sido explorada em todo seu potencial, devido à dificuldade inerente de sua descrição e comparação.

Caracteres diagnósticos, relativos às folhas, permitem a detecção de contaminantes ou substitutos, sendo de grande relevância as características da lâmina foliar, tais como, composição (simples ou pinada/palmada), incisão (pinada ou palmada), forma, venação, margem, ápice, base, superfície e textura (Evans, 1989). Aspectos relacionados à forma da lâmina, principalmente à forma do ápice e da base, têm sido consideradas como de potencial taxonômico, através da utilização de termos padronizados (Dickinson *et al.*, 1987). Dentre os trabalhos que tratam da venação de folhas, como ferramenta de identificação taxonômica, destacam-se os elaborados por Hickey (1973, 1979), Melville (1969, 1976) e Rizzini (1977), os quais incluem descrição qualitativa do curso das nervuras, da localização do ponto de inserção e da terminação, do comprimento relativo e da espessura, medidas dos ângulos de inserção, além de classificar as folhas segundo determinados padrões. Embora as nervuras e os padrões de venação possam ser influenciados por fatores ambientais, o padrão básico de venação não varia muito dentro de uma única espécie, o que o torna valioso taxonomicamente (Köhler, 1993 - *apud* Roth *et al.*, 1995).

Diversos trabalhos têm comprovado a importância dos caracteres microscópicos, relativos as características histológicas das folhas, na distinção de espécies semelhantes macroscopicamente. Vattimo (1975) apresenta uma chave para identificação das espécies de *Aniba* (Lauraceae), baseada nos dados anatômicos obtidos após uma série de trabalhos iniciados em 1968. Olowokudejo (1987) atribui valor taxonômico às características

anatômicas do pecíolo de *Biscutella* (Cruciferae), para distinção entre espécies do gênero, as quais apresentam grande semelhança na morfologia foliar, o mesmo é constatado para espécies de *Ocotea* - Lauraceae (Santos & Oliveira, 1995). Em Poaceae, a anatomia foliar tem sido considerada, há muito tempo, como ferramenta de grande relevância, assim, por exemplo, espécies de *Spartina* podem ser facilmente reconhecidas, mesmo na ausência de material fértil (Santos & Almeida, 2000).

Muitas vezes também é preconizada a realização de reações histoquímicas, as quais permitem a caracterização de certos grupos de constituintes químicos auxiliares na identificação das estruturas microscópicas (Evans, 1996).

Na literatura, poucas informações têm sido registradas sobre a morfo-anatomia de *Maytenus ilicifolia* Mart., *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog.

Metcalfe & Chalk (1957), ao fazer ampla revisão sobre estudos anatômicos em famílias de dicotiledôneas, mencionam dados referentes a estes três gêneros. Salientam, entretanto, que nas espécies do gênero *Maytenus* (Celastraceae) há variações, tais como: folhas dorsiventrais ou isobilateriais; epiderme contendo células com cristais escassos ou em grande quantidade; estômatos em uma ou em ambas faces da folha; idioblastos esclerenquimatosos presentes em algumas espécies. Alquini & Takemori (2000) registram características anatômicas das folhas de *M.ilicifolia*, incluindo dados sobre epiderme, nervuras, mesofilo e pecíolo. Mais escassas são as informações referentes a *Zollernia* (Leguminosae Papilionoideae). Metcalfe & Chalk (*op.cit.*), citam a ocorrência de estômatos do tipo paracítico e a presença de hipoderme em algumas espécies deste gênero. Para *Sorocea* (Moraceae), estes autores, registram cristais na epiderme das folhas, mas não referem laticíferos neste órgão, embora os citem para córtex primário, floema primário e secundário, periciclo e medula de caules jovens. Esau (1959) refere que moráceas podem apresentar cistólitos e laticíferos nas folhas, porém não menciona o gênero *Sorocea*.

Entretanto, informações isoladas e não específicas, não possibilitam a comparação entre as espécies em questão. Neste sentido, alguns pesquisadores têm buscado investigar características que permitam a distinção entre as espécies freqüentemente confundidas com a verdadeira espinheira-santa. Sousa e colaboradores (1999) realizaram estudos morfoanatômicos com folhas de espécies conhecidas como espinheira-santa no Estado de Minas Gerais, *Maytenus ilicifolia*, com propriedades analgésicas e cicatrizantes, e *Sorocea guillerminiana*, sem propriedades terapêuticas conhecidas, utilizada devido a sua semelhança morfológica com a primeira. As diferenças anatômicas das folhas dessas espécies, de acordo com estes autores, mostraram-se úteis na diferenciação do material utilizado como fitoterápico. Alberton e colaboradores (1999), analisaram características epidérmicas a partir de folhas pulverizadas de amostras comerciais de espinheira-santa, concluindo que o formato das células epidérmicas e das células-guarda pode auxiliar na identificação de *Zollernia ilicifolia* nas amostras, mas encontraram dificuldades em diferenciar *Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bonplandii*. Machado & Santos (2000), em estudo preliminar com estas três espécies conhecidas como espinheira-santa, observaram que algumas características anatômicas poderiam possibilitar a distinção e que a confirmação destes dados, bem como análise mais acurada, em investigação amostral mais significativa, seria valiosa na identificação taxonômica.

Assim, estudo comparativo da morfo-anatomia das folhas de três espécies conhecidas como espinheira-santa no Sul do Brasil, *Maytenus ilicifolia* Mart.(verdadeira), *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog., incluindo descrição detalhada da histologia e do padrão de venação, poderá contribuir com dados que possibilitem a identificação taxonômica de amostras constituídas apenas de folhas ou mesmo de fragmentos destas.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Caracterizar a morfo-anatomia das folhas de *Maytenus ilicifolia* (verdadeira espinheira-santa), visando a distinção destas três espécies a partir de folhas ou fragmentos destas.

Objetivos específicos

- * Descrever, com base na análise em microscopia óptica, as características da epiderme (para esta também em Microscopia Eletrônica de Varredura), da nervura mediana, mesofilo e bordo da lâmina foliar e do pecíolo das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart., *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog.
- * Documentar a estrutura morfo-anatômica das três espécies.
- * Buscar identificar a natureza química, através de testes histoquímicos, de componentes celulares e extracelulares (parede celular e inclusões vacuolares).
- * Classificar as folhas das três espécies quanto às características morfológicas: forma da lâmina e bordo foliar e padrão de nervação.
- * Comparar as características morfo-anatômicas que possam auxiliar na determinação taxonômica das três espécies visando a distinção entre elas, a partir de folhas ou fragmentos dessas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas para o estudo, as folhas de três espécies: *Maytenus ilicifolia* Mart. (verdadeira espinheira-santa) e de *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog. (espécies freqüentemente confundidas com a espinheira-santa).

As coletas foram realizadas nos meses de março, julho e outubro em indivíduos previamente identificados, em período fértil, ocorrentes na Grande Florianópolis e proximidades.

Parte do material coletado foi mantida sob refrigeração, para observações 'in vivo' e realização de testes histoquímicos. Para análise histoquímica, foram feitas secções à mão-livre, com auxílio de lâmina de barbear. Como material de apoio foi utilizado isopor (Quintas, 1963). Para montagem das lâminas semipermanentes usou-se gelatina-glicerinada (Kaiser, 1880 – *apud* Kraus & Arduin, 1997). Foram utilizados diversos testes histoquímicos: azul de toluidina (Gahan, 1984), o reativo de Steimetz, original (Costa, 1982) e modificado (Lima, 1963) para identificação de suberina, lignina, cutina, celulose, mucilagem, amido e tanino; sudan IV (Costa, *op.cit.*) para detecção de sílica (Johansen, 1940); fluoroglucina/ HCl (Costa, *op.cit.*) para detecção de lignina; ácidos clorídrico, sulfúrico e acético (Evans, 1989) para detecção da natureza química dos cristais.

Algumas folhas coletadas seguiram diretamente para um processo de desidratação em estufa, a 40°C. Este material serviu para estudos da morfologia da lâmina foliar, incluindo dados sobre padrões de nervação e características do bordo e ápice da folha. As folhas desidratadas foram diafanizadas em Hipoclorito de Sódio (Johansen, 1940), lavadas em água, coradas com safranina, seguindo por desidratação em série etílica e passagem por xilol, sendo então feita a montagem entre lâminas de vidro, com uso de bálsamo do Canadá sintético.

Parte do material coletado foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2 e conservado também em etanol 70°GL, processo que permite melhor qualidade de fixação, servindo para preparação de lâminas permanentes e de amostras para microscopia eletrônica de varredura. Para isso foram usadas pequenas porções de lâminas foliares, com cerca de 3 mm de largura x 3 mm de comprimento, e de pecíolo, com cerca de 3 mm de comprimento. Algumas folhas inteiras foram fixadas em FAA 50° GL por 24 horas (Johansen, 1940) e conservadas em etanol 70° GL, servindo como reserva de amostras, utilizada apenas quando esgotadas aquelas melhor preservadas.

Lâminas permanentes foram preparadas seguindo os métodos tradicionais de desidratação em série gradual crescente etílica, passagem em xilol e inclusão em parafina (Johansen, 1940). O material emblocado, lâmina foliar e pecíolo, foi seccionado transversalmente em micrótomo de rotação E. Zimermann-Leipizig, em 15 µm de espessura. Para aderência das secções sobre a lâmina foi utilizado o adesivo de Bissing (Bissing, 1974). O material foi corado com safranina/fast-green e montado entre lâmina-lamínula com bálsamo do Canadá sintético. Também foram feitas lâminas permanentes seguindo os procedimentos de desidratação em série gradual etílica e posterior infiltração em hidroxietilmetacrilato (Jung's Historesin). Este processo possibilita seccionamento com menor espessura, sendo que do material em estudo foram feitas secções com 9 µm de espessura. O seccionamento foi também em micrótomo de rotação E. Zimermann-Leipizig. As lâminas foram coradas com Giemsa (Lillie, 1965). Devido a dificuldade de infiltração, nos dois procedimentos referidos, as peças foram mantidas em etilenodiamina 10% (Carlquist, 1982) por 6 dias, para amolecimento das estruturas, antes de iniciar o processo de desidratação. Pelo mesmo motivo, foi substituida a série etílica por butílica no processo de desidratação, para o material a ser emblocado em parafina. Procedimentos que se mostraram mais adequados.

Para cada parâmetro investigado, foram analisadas 5 folhas, totalmente expandidas (3° a 6° nó), de pelo menos 3 indivíduos de cada espécie. As análises microscópicas das folhas foram concentradas no terço médio da lâmina foliar, com ênfase às características estruturais da epiderme, mesofilo, nervura mediana, bordo e porção média do pecíolo. Foram feitas secções paradérmicas, transversais e longitudinais nas lâminas foliares e transversais e longitudinais nos pecíolos das folhas das 3 espécies.

As análises foram feitas em microscópio óptico, marca Carl Zeiss – Jena, modelo Loboval 4, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC. Para o registro de imagens foram realizadas representações esquemáticas com auxílio de câmara clara acoplada ao referido microscópio e fotomicrografias feitas em microscópio Olympus BH2, equipado com fotoautomático, no Laboratório de Citologia da UFSC.

Algumas amostras conservadas também em etanol 70°GL, foram desidratadas em série gradual etílica até 100° GL. Posteriormente, as amostras foram imersas em HMDS (Hexametildesilazane) durante 30 minutos, em capela com exaustão, a seguir o HMDS foi pipetado e as amostras mantidas em capela até total secagem. Este procedimento evita o colapso de estruturas, como método substitutivo de ponto crítico de CO₂ (Bozzola & Russel, 1991). As amostras secas foram colocadas sobre suportes de alumínio, com auxílio de fita de carbono dupla face. O material foi coberto com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec,

modelo SCD005. A investigação e documentação foram efetivadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Phillips, modelo XL30, pertencente ao Laboratório de Materiais da UFSC. As imagens foram escaneadas para posterior identificação das estruturas e reprodução.

De modo a complementar a caracterização morfo-anatômica das folhas, foram feitas as seguintes análises quantitativas: determinação de índice estomático, medidas de espessura de membrana cuticular e mesofilo. O índice estomático foi calculado pela equação $n=(NE/NC+NE) \times 100$, onde NE: número de estômatos por área e NC: número de células epidérmicas na mesma área (Wilkinson, 1979). O número mínimo amostral foi calculado pela equação $n=(t^2.s^2).d^2$, onde t é dado pela tabela de Student (considerando n-1, para significância de 0,05), s é o desvio padrão e d é igual a $E/100 \times$ média, onde E=10 para 10% de probabilidade, valor considerado satisfatório. O número mínimo amostral determinado para os diferentes parâmetros morfométricos são apresentados na Tabela 1. Para comparação entre os valores médios obtidos foi usada análise de variância seguida de teste de Tuckey, através do programa computacional Statgraphics (1993). A membrana cuticular e mesofilo foram medidos com o auxílio da câmara clara acoplada ao microscópio óptico, com as devidas conversões.

Tabela 1. Número mínimo amostral dos parâmetros morfométricos analisados nas lâminasfoliares de Maytenus ilicifolia, Sorocea bonplandii e Zollernia ilicifolia.

Parâmetros morfométricos	M. ilicifolia	S. bonplandii	Z. ilicifolia
Espessura da membrana cuticular (Anexo 1)	30	28	9
Número de estômatos por mm ² (Anexo 2)	8	14	15
Número de células epidérmicas da face abaxial por mm ² (Anexo 3)	16	17	13
Espessura do mesofilo (Anexo 4)	1	7	4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Morfologia Foliar

Características morfológicas são facilmente observadas e são de uso prático nas chaves e descrições taxonômicas (Judd et al., 1999). Diversos trabalhos têm apresentado propostas para descrição morfológica das folhas de angiospermas (Hickey, 1973, 1979; Melville, 1969, 1976 e Rizzini, 1977), entre os quais destaca-se o de Hickey (1979), por ser específico para dicotiledôneas e ser mais minucioso na avaliação das características. Conforme a classificação deste autor, evidenciam-se aspectos distintos na morfologia foliar de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia* (Tab. 2).

Optou-se por dar maior ênfase aos aspectos que mostram características distintas nas três espécies. Entre estas características estão: a forma da lâmina foliar, a forma do ápice, o ângulo de divergência das nervuras secundárias, o ângulo de origem das nervuras terciárias, as terminações de nervuras e as aréolas. Dickinson *et al.* (1987) salienta que, desde que sejam utilizados termos padronizados, aspectos relacionados à forma da lâmina foliar, especialmente do ápice e da base, podem ter considerável importância taxonômica. Judd *et al.* (1999) também referem-se a necessidade do uso de termos bem definidos na descrição morfológica.

Macroscopicamente, a análise geral da forma da lâmina foliar, bem como do ápice dessas, mostra evidentes distinções: *M. ilicifolia* com lâmina oblonga estreita e ápice atenuado (Fig. 1a, 1b); *S. bonplandii* com lâmina obvada oblongolanceolada e ápice acuminado (Fig. 1c, 1d); e *Z. ilicifolia* com lâmina elíptica estreita e ápice obtuso (Fig. 1e, 1f). *M. ilicifolia* ainda pode ser reconhecida pela textura coríacea, quando comparada com *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia* caracterizadas por textura subcoriácea. Comparando as imagens da Figura 1 constata-se que a face abaxial apresenta-se mais clara e opaca do que a face adaxial, destacando-se ainda o aspecto mais brilhante da face adaxial da folha de *M. ilicifolia*, em relação às outras duas espécies. Estas aparências refletem diretamente as características teciduais que constituem cada uma das espécies, como será adiante referido. Cabe ressaltar, ainda, que a distância entre os dentes nas margens foliares, como pode ser evidenciado na Figura 1, é maior em *S. bonplandii*, menor em *Z. ilicifolia* e intermediária em *M. ilicifolia*. No entanto, essa característica, embora bastante freqüente, não pode ser utilizada como ferramenta para distinção entre as três espécies, pois não se mantém constante.

A nervação é uma outra característica macroscópica que se mostra útil na diferenciação entre as espécies em estudo. As nervuras e os padrões de nervação podem ser influenciados pelo ambiente, entretanto o padrão básico de nervação, numa mesma espécie, não se altera muito, sendo de valor taxonômico (Köhler, 1993 - *apud* Roth *et al.*, 1995).

O ângulo de divergência das nervuras secundárias (Tab. 2, Fig. 2) é distinto nas três espécies, sendo que o menor ocorre em *M. ilicifolia*. Essa espécie, também distingue-se das demais pelas características do curso das nervuras secundárias, que seguem, a partir da nervura primária, diretamente até o bordo da lâmina foliar (comparar Fig. 2a com Fig. 2b e 2c), razão que inclui as folhas de *M. ilicifolia* no tipo de nervação craspedódroma simples. Nas outras duas espécies as nervuras secundárias encurvam-se abruptamente antes de atingir o bordo foliar (Fig. 2b, 2c), caracterizando suas folhas no tipo de nervação craspedódroma semicraspedódroma. Com relação aos ângulos formados pelas nervuras terciárias, em relação à nervura secundária de origem, *M. ilicifolia* e *S. bonplandii* (Fig. 2d, 2e) distinguem-se de *Z. ilicifolia* (Fig. 2f), sendo agudos e retos, respectivamente.

As terminações de nervuras ou são livres ou ocasionalmente atravessam a aréola conectando-se com nervuras de mesma ordem. Percebe-se distinção quanto a esse aspecto nas três espécies em estudo (Fig. 3a, 3b, 3c; Tab. 2). *S. bonplandii* apresenta raras terminações livres e quando essas estão presentes não são ramificadas. *M. ilicifolia* e *Zollernia* possuem as terminações de nervuras ramificadas, mas diferem na quantidade de ramificações, sendo que em *M. ilicifolia* as terminações de nervuras são pouco ramificadas, dicotomizando-se duas a três vezes, e em *Zollernia* são bastante ramificadas, dicotomizando-se mais de quatro vezes.

Pequenas áreas com nervuras de ordens superiores interligadas constituem as aréolas, as quais apresentam-se com forma distinta em *M. ilicifolia* (Fig. 3a, 3d), irregular tendendo a um aspecto triangular, quando comparadas com aquelas em *S. bonplandii* (Fig. 3b, 3e) e em *Z. ilicifolia* (Fig. 3c, 3f), formando figuras com cinco ou mais lados. Embora as três espécies enquadram-se no tamanho médio é bastante evidente a ocorrência de aréolas menores em *M. ilicifolia*, mais amplas em *Z. ilicifolia* e intermediárias em *S. bonplandii*.

Tabela 2. Classificação das folhas de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia*, com base nas características da lâmina foliar, do pecíolo e dos padrões de nervação, segundo Hickey (1979).

	Maytenus ilicifolia	Sorocea bonplandii	Zollernia ilicifolia
1.Organização da folha	simples	simples	simples
2. Forma da folha			
2.1. simetria			
A- lâmina inteira	simétrica	simétrica	simétrica
2.2. Forma			
A- lâmina	oblonga estreita	obovada	elíptica estreita
		oblongolanceolada	
B- Ápice	atenuado	acuminado	obtuso
C- Base	truncada	truncada	truncada
3. Forma da margem da			
folha	serreada	serreada	serreada
4. Textura da folha	coriácea	subcoriácea	subcoriácea
5. Posição de glândulas	marginal (nos dentes) e	marginal (nos dentes) e	marginal (nos dentes) e
	apical	apical	apical
6. Pecíolo	normal	normal	normal
7. Tipos de nervação	pinada, craspedódroma,	pinada, craspedódroma,	pinada, craspedódroma,
	simples	semicraspedódroma	semicraspedódroma
8. Nervuras primárias			
A- tamanho	robusta	moderada	moderada
B- curso	direto, não-ramificado	direto, não-ramificado	direto, não-ramificado
9. Nervuras secundárias			
A- ângulo de	estreito < 45°	largo, entre 65-80°	moderado, entre 45-65°
divergência			
B- variações no ângulo	divergente	divergente	divergente
	quase uniforme	quase uniforme	quase uniforme
C- espessura relativa	moderada	moderada	moderada
D- curso	direto e ramificado	encurvado abruptamente	encurvado abruptamente
		e ramificado	e ramificado
E- nervura			
intersecundária	simples	simples	simples
10. Nervuras terciárias			
A- ângulo de origem	agudo	agudo	reto
B- padrão	reticulado, ortogonal	reticulado, ortogonal	reticulado, ortogonal
C- arranjo	predominantemente	predominantemente	predominantemente
	alternado	alternado	alternado
11. Nervação de ordens			

superiores			
A- Resolução	formam um retículo no	formam um retículo no	formam um retículo no
	qual não podem ser	qual não podem ser	qual não podem ser
	distinguidas ordens de	distinguidas ordens de	distinguidas ordens de
	nervuras	nervuras	nervuras
B- Nervuras de 4 ^a			
ordem			
B1- tamanho	fino	fino	fino
B2-curso	ortogonal	ortogonal	ortogonal
C- Nervuras de 5 ^a			
ordem			
C1- tamanho	fino	fino	fino
C2- curso	ortogonal	ortogonal	ortogonal
D- Última nervação	fimbriada	arqueada	Fimbriada
marginal	(correndo junto com a		(correndo junto com a
	margem)		margem)
12. Terminações de	pouco ramificada	muito ramificada	simples linear
nervuras	(2 a 3 vezes)	(mais de 4 vezes)	
13. Aréola			
A- Desenvolvimento	imperfeito	imperfeito	imperfeito
B- Arranjo	ao acaso	ao acaso	ao acaso
C- Forma	irregular tendendo à	pentagonal à poligonal	pentagonal à poligonal
	triangular		
D- Tamanho	médio (1 – 0,3 mm)	médio (1 – 0,3 mm)	médio (1 – 0,3 mm)
Elementos da arqui-			
tetura do dente			
marginal			
A- glandularidade ¹	glandular, escuro	glandular, escuro	glandular, escuro
B- terminação do dente	espinhoso	espinhoso	espinhoso
C- configuração da			
nervura principal do			
dente			
C1- curso da nervura	excêntrico	excêntrico	excêntrico
C2- origem da nervura	direta	direta	direta

¹ Hickey (1979) considera como estruturas glandulares: nectários, hidatódios, glândulas taníferas, etc. No caso das três espécies em estudo constata-se a presença de hidatódios.

2. Anatomia Foliar

2.1. Lâmina foliar

2.1.1. Caracterização geral

As folhas de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia* são dorsiventrais e hipoestomáticas.

2.1.2. Epiderme

A epiderme nas três espécies é uniestratificada, o que pode ser constatado em corte transversal (Fig. 4). Em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas (Fig. 5) são retas em *M. ilicifolia* e em *Z. ilicifolia*, enquanto em *S. bonplandii* são sinuosas.

Diversos estudos têm considerado as conformações das paredes anticlinais com valor taxonômico, como utilizado, por exemplo, por Kasapligil (1951) para distinguir Laurus e Umbellularia (Lauraceae). Mas sua utilização, para tal fim, deve ser feita com cautela, pois fatores ambientais podem intervir nessa característica. Brenner (1900) - apud Napp- Zinn, 1983, refere-se à influência da umidade como determinante de maior ondulação. Watson (1942) considera a redução de luz como fator decisivo para aumentar a ondulação. Napp-Zinn (1974, 1984) ressalta que diversas pesquisas têm demostrado a variação intraespecífica das características da epiderme, com tendência ao aumento de sinuosidade sob condições de menor irradiação solar. Santos (1988) constata diferenças no padrão em quatro espécies de Ocotea (Lauraceae), constatando, entretanto, que em duas espécies, habitualmente mais expostas ao sol, as paredes anticlinais são retas, enquanto em outras duas, de interior de mata, mais sombreadas, as paredes são sinuosas. Estas informações mostram-se relevantes, considerando o ambiente em que se encontram os indivíduos em estudo. S. bonplandii, espécie provida de paredes anticlinais sinuosas, localizava-se sempre em ambientes sombreados, enquanto M. ilicifolia e Z. ilicifolia, espécies com paredes anticlinais retas, estavam sob maior intensidade luminosa. Parecem ser estes os ambientes preferenciais para as espécies, tendo em vista que não foi encontrado nenhum indivíduo de S. bonplandii exposto à luz ou de M. ilicifolia ou Z. ilicifolia em local sombreado. Porém, não pode ser descartada a possibilidade de alguma alteração no padrão da epiderme, caso os indivíduos encontram-se em outro tipo de ambiente. Mas, é pouco provável que o efeito do ambiente sobre o padrão da epiderme fosse tão acentuado a ponto de tornar as paredes retas de M. ilicifolia e Z. ilicifolia sinuosas como em S. bonplandii, ou eliminar totalmente a sinuosidade de S. bonplandii.

Campos de pontoação primária são bem evidentes, em vista frontal, apenas em *M*. *ilicifolia* (Fig. 5a).

Na epiderme de *S. bonplandii* ocorrem pequenos cistólitos (Fig. 4c), estruturas referidas por Esau (1959) para o gênero. O tipo de cistólito pode variar em diferentes espécies de um gênero (Dickison, 2000).

Utilizando azul de toluidina constata-se que *M. ilicifolia* e *S. bonplandii* reagem metacromaticamente, apresentando cor magenta (Fig. 5b, 5d), denotando natureza básica, e *Z. ilicifolia* mostra reação ortocromática, corando de azul (Fig. 5f), indicando natureza ácida.

Tricomas ocorrem em *S. bonplandii* apenas na face abaxial da lâmina foliar, sendo aglandulares (Fig. 6a), nas regiões costais, e glandulares (Fig. 6b), nas regiões intercostais, esses últimos com ápice globoso constituído por quatro células secretoras. Características similares são referidas, por Sousa et al. (1999), para *S. guillerminiana*. Em *Z. ilicifolia*, na lâmina foliar, os tricomas geralmente são caducos, pois na maioria das vezes constata-se apenas a presença da base destes entre as outras células da epiderme. Embora o presente estudo concentrou-se na análise de folhas adultas, observações em folhas muito jovens revelaram intensa pilosidade – tricomas aglandulares – em ambas faces da lâmina foliar. No pecíolo de *Z. ilicifolia*, estão presentes tricomas aglandulares. Nenhum tipo de tricoma foi encontrado em *M. ilicifolia*, o que também é citado por Sousa *et al.* (1999) para a espécie.

Cristais estão presentes nas células de vários tecidos nas folhas das três espécies, diferindo na forma e quantidade. Solereder (1908) cita a importância dos tipos e a localização dos cristais para classificação taxonômica. Em *M. ilicifolia* (Fig. 4a, 5a e7), eles aparecem na forma de prismas e ráfides, são pequenos e abundantes na epiderme, mas alguns ocorrem também nas células dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*, eles aparecem na forma prismática e são maiores que os encontrados em *M. ilicifolia*. Nestas espécies, em amostras de apenas uma das coletas foram evidenciados nas células epidérmicas, comumente são encontrados nas células que contornam os feixes vasculares (Fig. 3e, 3f). Em *S. bonplandii*, são ainda encontrados na forma de drusas, sempre em células próximas aos laticíferos. A natureza química dos cristais, presentes nas três espécies, foi elucidada com testes histoquímicos propostos por Evans (1989). Quando submetidos a ação do ácido clorídrico, os cristais nas três espécies, independente da forma, dissolveram por completo. Quando submetidos a ação do ácido sulfúrico apresentaram-se na forma de ráfides, devido à formação de novo composto químico, sulfato de cálcio. Deste modo, foi possível diagnosticar que os cristais são de oxalato de cálcio.

O termo membrana cuticular, é proposto por Holloway (1981), como mais adequado que o termo cutícula, pois na maioria das plantas está constituída por várias camadas. A membrana cuticular, que reveste as células epidérmicas, identificada através de reação com Sudan, é distinta nas três espécies, sendo mais espessa em *M. ilicifolia* que em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia* (Tab. 3).

Tabela 3. Espessura média da membrana cuticular, em μm, das folhas de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia*.

	M. ilicifolia	S. bonplandii	Z. ilicifolia
Espessura média da			
membrana cuticular (µm)	10 a	2,2 c	3,8 b

Nota: n= 30. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significaticas entre as médias, ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

A deposição de ceras foi observada em ambas faces da epiderme, em microscópio eletrônico de varredura, nas três espécies: em *M. ilicifolia* apresenta-se como película homogênea (Fig. 7, 8a, 8b, 9a, 9b); em *S. bonplandii* está em forma de placas (Fig. 8c, 9c, 9d); e em *Z. ilicifolia* mostra-se como película homogênea, porém ocorrem deposições superficiais isoladas com formas irregulares (Fig. 8d, 8e, 9e, 9f).

Os estômatos são do tipo paracítico em *M. ilicifolia* (Fig. 5b) e *Z. ilicifolia* (Fig. 5f) e do tipo anomocítico em *S. bonplandii* (Fig. 5d). Em vista frontal, ao redor dos estômatos de *Z. ilicifolia* (Fig. 5f) destacam-se células, de número não definido, que se coram diferencialmente das outras células epidérmicas e similar às células subsidiárias, fato que leva a possibilidade de também serem subsidiárias, confirmação só possível por investigação da origem ontogenética. Assim, se faz necessário um estudo ontogenético destas células para averiguação de um possível estômato ciclocítico. Em *M. ilicifolia* (Fig. 4b, 9a, 9b) os estômatos estão aprofundados em relação às demais células epidérmicas, embora as células-guardas, pequenas e estreitas localizem-se superiormente. Já em *S. bonplandii* (Fig. 4d, 9c, 9d) e *Z. ilicifolia* (Fig. 4f, 9e, 9f) os estômatos salientam-se na superfície da epiderme, principalmente as células-guarda.

A Tabela 4 apresenta os valores médios de estômatos por mm^2 , do número de células epidérmicas da face abaxial por mm^2 e do índice estomático, para as três espécies. Nesta evidencia-se que a densidade estomática média é maior em *S. bonplandii*, intermediária em *Z. ilicifolia* e menor em *M. ilicifolia*. O mesmo ocorre com relação ao índice estomático. As variações na densidade estomática são estatisticamente significativas entre as três espécies.

	M. ilicifolia	S. bonplandii	Z. ilicifolia
Número médio de estômatos / mm ²	280 c	458 a	372 b
Número médio de células epidérmicas da face abaxial / mm ²	1747	2120	2067
Índice Estomático	13,8	17,8	15,3

Tabela 4. Número médio de estômatos e de células epidérmicas da face abaxial, por mm², e índice estomático das folhas de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia*.

Nota: n= 30. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significaticas entre as médias, ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

Apesar de não estar nos objetivos deste trabalho, foram analisadas, em Microscopia Eletrônica de Varredura, amostras contidas em sachês de chá de "espinheirasanta", vendidos comercialmente. Comparando os resultados obtidos no presente estudo com as imagens destas amostras, constatou-se que nem sempre essas correspondiam à *M. ilicifolia*, sendo provavelmente algumas de *S. bonplandii* e outras de *Z. ilicifolia*. Assim, por exemplo, verifica-se que a Figura 10a (amostra de chá) mostra características similares às observadas na Figura 9a (*M. ilicifolia*), ambas correspondendo a vista frontal da face abaxial de *M. ilicifolia*. Porém, o mesmo não se verifica comparando a Figura 10b (outra amostra de chá) com a Figura 9a (*M. ilicifolia*), mas constata-se que é similar a Figura 9c (*Z. ilicifolia*). A Figura 10c (amostra de chá) mostra detalhes de ceras epicuticulares na face adaxial, as quais apresentam-se em forma de escamas. Analisando os resultados obtidos e ilustrados na Figura 8, constata-se que apenas na Figura 8c a cera apresenta este aspecto. Portanto, as características da amostra ilustrada na Figura 10c são similares às características encontradas em *S. bonplandii* e não às observações para se obter um resultado confiável.

2.1.3. Mesofilo

O mesofilo das três espécies é constituído por parênquimas paliçádico e esponjoso (Fig. 11, 12). Em *M. ilicifolia* o parênquima paliçádico apresenta-se com dois a três estratos

celulares (Fig. 11a, 12a), como também constatado por Souza *et al.* (1999) e Alquini & Takemori (2000), enquanto em *S. bonplandii* (Fig. 11b, 12b) e *Z. ilicifolia* (Fig. 11c, 12c) apresenta-se com um a dois estratos celulares. No mesofilo de *Z. ilicifolia* destaca-se, na face adaxial, um evidente estrato subepidérmico de células aclorofiladas (Fig. 11c, 12c), o qual é referido por Metcalfe & Chalk (1957), para o gênero *Zollernia*, como hipoderme.

Os valores médios da espessura do mesofilo são apresentados na Tabela 5. Nesta constata-se que o mesofilo em *M. ilicifolia* é bem mais espesso do que em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*. A diferença entre as espessuras do mesofilo dessas três espécies é estatisticamente significativa.

Segundo Metcalfe & Chalk (1957), a proporção do tecido assimilador é maior em xerófitas. Assim, os resultados obtidos quanto à espessura do mesofilo pode também estar associado à localização dos indivíduos, *M. ilicifolia* e *Z. ilicifolia* encontram-se mais expostos ao sol e *S. bonplandii* em ambiente mais sombreado.

Tabela 5. Espessura média do mesofilo, em μm, de folhas de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii* e *Zollernia ilicifolia*.

	M. ilicifolia	S. bonplandii	Z. ilicifolia
Espessura média do mesofilo	251,03	121,35	155,77

Nota: n = 30. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significaticas entre as médias, ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tuckey.

2.1.4. Nervura Mediana

Aspectos morfo-anatômicos gerais e alguns detalhes das nervuras medianas são ilustrados nas Figuras 13 e 14. É visível a distinção da nervura mediana, em vista transversal, nas três espécies quanto ao seu formato geral (Fig. 13a, 13c, 13e e 14a, 14c, 14e). Em *M*.

ilicifolia a nervura mediana, apresenta ambas as faces convexas, sendo bastante acentuada na face adaxial e mais atenuada na face abaxial (Fig. 13a, 14a), como também observado por Alquini & Takemori (2000). Em *S. bonplandii*, mostra-se com a face adaxial côncava e a face abaxial com acentuada convexidade (Fig. 13c e 14c). Em *Z. ilicifolia*, ambas faces são convexas, porém a abaxial é mais saliente (Fig. 13e e 14e).

O sistema vascular na nervura mediana, em corte transversal, apresenta-se, nas três espécies, lembrando o tipo de feixe concêntrico. Entretanto, em *M. ilicifolia* o feixe vascular é interrompido centralmente na face adaxial (Fig. 13a) e nas outras duas espécies, *S. bonplandii* (Fig. 13b) e *Z. ilicifolia* (Fig. 13c), ocorre um feixe em forma de "U", na face abaxial, e outro feixe plano, em posição inversa, na face adaxial. Destaca-se ainda, a forma do feixe abaxial que em *Z. ilicifolia* é mais aberto que em *S. bonplandii* possibilitando uma região mais ampla de parênquima medular.

O sistema vascular em *M. ilicifolia* e em *Z. ilicifolia* é contornado por um anel contínuo de fibras, o mesmo não ocorre em *S. bonplandii*. Nessa espécie, as fibras contornam externamente o feixe vascular abaxial, acompanhando a forma de "U", e algumas fibras eventualmente ocorrem na face adaxial junto ao floema.

Em *M. ilicifolia*, na face adaxial, o clorênquima é contínuo com o parênquima paliçádico do mesofilo, embora sem apresentar a forma em paliçada (Fig. 13b). Em *S. bonplandii*, o parênquima paliçádico modifica a forma, como na espécie anterior, mas é interrompido na porção central. O clorênquima em *Z. ilicifolia* envolve todo anel de fibras ao redor do sistema vascular, mantendo-se na face adaxial contínuo com o parênquima paliçádico.

O tecido colenquimático, em *M. ilicifolia*, está reduzido a uma faixa estreita na face abaxial, sendo do tipo anelar, e raras células na face adaxial. Ampla faixa de colênquima observa-se, na face abaxial, em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*, porém na primeira é do tipo anelar (Fig. 13d, 14d) e na segunda do tipo angular (Fig. 14f). Nessas duas espécies também ocorre colênquima sob a epiderme, na face adaxial.

Cristais de oxalato de cálcio estão presentes nos tecidos parenquimáticos e colenquimáticos que contornam o sistema vascular, externamente às fibras. Em folhas diafanizadas, é claramente evidenciada a presença destes cristais acompanhando as nervuras, em *S. bonplandii* (Fig. 3e) e em *Z. ilicifolia* (Fig. 3f). Wu (1997) cita a presença de uma bainha com cristais em Moraceae, sem especificar se o gênero seria *Sorocea*.

É importante destacar, ainda, em *S. bonplandii* ocorrem vasos laticíferos (Fig. 13f), do tipo não articulado e ramificado. Localizam-se na nervura mediana, associados ao floema, ou entre células do colênquima e/ou parênquima. Laticíferos não-articulados são

citados por Topper & J. Koek-Noorman (1980) e Esau (1959) para a família Moraceae. A utilização de Sudan, reagindo com o látex, assumindo a cor vermelha, possibilitou evidenciar a presença de óleo no mesmo (Fig. 13f).

<u>2.1.6. Bordo</u>

Comparando as secções transversais dos bordos foliares das três espécies (Fig. 15), verifica-se que: em *M. ilicifolia* o bordo é mais elevado na face adaxial, recurvando-se levemente na face abaxial; em *S. bonplandii* apresenta forma arredondada tendendo à afilada na extremidade; e em *Z. ilicifolia* tem um formato arredondado, mais uniforme que nas outras duas espécies.

O bordo foliar de *M. ilicifolia* tem uma grande quantidade de fibras envolvendo uma pequena nervura (Fig. 15a). Entre as células epidérmicas e as fibras ocorrem 5 a 6 camadas de células de clorênquima, não diferenciado em parênquimas paliçádico e esponjoso. As células epidérmicas que envolvem o bordo diferenciam-se daquelas do mesofilo, por serem papilosas. Em *S. bonplandii* (Fig. 15b), o bordo possui, sob a epiderme, cerca de 3 camadas de clorênquima, não diferenciado em parênquimas paliçádico e esponjoso, e mais no centro do bordo uma pequena quantidade de fibras. Assim como em *M. ilicifolia*, o bordo em *Z. ilicifolia* (Fig. 15c) apresenta uma pequena nervura. O bordo diferencia-se, nessa espécie comparado com as outras duas, por suas fibras ocuparem um espaço muito maior e, ainda, por ocorrerem raras células clorenquimáticas, uma ou duas camadas, sob a epiderme.

O bordo foliar das três espécies é ornamentado com dentes como pode ser observado na Figura 1. Os dentes (Fig. 16a) das três espécies são glandulares, como já foi citado na Tabela 2, o que pode ser comprovado pelo fato do xilema se estender até o ápice do dente (Fig. 16b, 16c, 16d). *M. ilicifolia* (Fig. 16e) possui tricomas ao redor da abertura glandular, distinguindo-se de *S. bonplandii* (Fig. 16f) e de *Z. ilicifolia* (Fig. 16g) as quais apresentam abertura glandular glabra.

2.2. Pecíolo

A morfo-anatomia geral e alguns detalhes anatômicos dos pecíolos de *M*. *ilicifolia, S. bonplandii* e *Z. ilicifolia* são ilustrados na Figura 17. Algumas características do pecíolo são bem distintas nas três espécies, tendo assim, um importante valor taxonômico.

Em secção transversal da região mediana, o pecíolo de *M. ilicifolia* (Fig. 17a), na face adaxial, tem duas expansões laterais, como registra Alquini & Takemori (2000), para essa espécie. A face adaxial tem a forma levemente côncava, acentuada principalmente devido a presença das expansões laterais, e a face abaxial é convexa, com contorno uniforme.

O pecíolo de *S. bonplandii* (Fig. 17b), possui ambas as faces convexas, mostrando um aspecto quase cilíndrico, com contorno levemente ondulado. Em *Z. ilicifolia* (Fig. 17c), a face adaxial é côncava e a face abaxial é convexa.

O sistema vascular de *M. ilicifolia* (Fig. 17a), em corte transversal, apresenta-se em forma de anel, um pouco achatado na face adaxial, constituído por xilema interno e floema externo, envolto por cordões isolados de fibras. O pecíolo de *S. bonplandii* (Fig. 17b) possui feixes vasculares colaterais dispostos em espiral, delimitados externamente por fibras. Em *Z. ilicifolia* (Fig. 17c), o sistema vascular tem xilema interno e floema externo, similar ao de *M. ilicifolia*, porém claramente distinto pela profunda concavidade da face adaxial e uma delimitação externa contínua de fibras.

O córtex de *M. ilicifolia* é constituído por células parenquimáticas e entre essas destacam-se, ainda, células pétreas (Fig. 17d) e muitos compostos fenólicos. Alquini & Takemori (2000) também referem a presença dos compostos fenólicos no pecíolo desta espécie. Em *S. bonplandii* um parênquima colenquimatoso (Fig. 17e) preenche o córtex. No córtex do pecíolo de *Z. ilicifolia* há grande concentração de células contendo compostos fenólicos (Fig. 17f), principalmente na porção média, quando visto em corte transversal.

Tricomas aglandulares são freqüentes no pecíolo de Z. ilicifolia.

CONCLUSÕES

Algumas características da morfo-anatomia da lâmina foliar e do pecíolo de *M*. *ilicifolia*, *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*, mostram-se bastante distintas podendo ser utilizadas como ferramentas para o reconhecimento de amostras de folhas inteiras e, em alguns casos, mesmo fragmentadas.

Com relação à morfologia da lâmina foliar, as características que merecem maior destaque são: a forma da lâmina foliar, a forma do ápice, o ângulo de divergência das nervuras secundárias e as terminações de nervuras (Tab. 6).

Às características anatômicas que possibilitam a diferenciação das três espécies são: epiderme, mesofilo, nervura mediana, bordo e pecíolo (Tab. 6).

Na epiderme, em vista frontal, as paredes anticlinais, em ambas as faces, são sinuosas em *S. bonplandii* e retas em *M. ilicifolia* e *Z. ilicifolia*. Além disso, apenas em *M. ilicifolia* os campos de pontoação primária são visíveis.

Em vista frontal, da face abaxial da epiderme, pode-se distinguir as três espécies pelas características de seus estômatos. Em *M. ilicifolia* e *Z. ilicifolia* os estômatos são paracíticos, enquanto em *S. bonplandii* são anomocíticos. Em *Z. ilicifolia* destaca-se, ainda, células epidérmicas que contornam os estômatos, corando-se diferencialmente das outras células epidérmicas, quando submetidas ao corante azul de toluidina.

A deposição de ceras, em ambas as faces, é distinta para as três espécies, fato que só pode ser constatado em microscopia eletrônica de varredura. Em *M. ilcifolia* e *Z. ilicifolia,* as ceras apresentam-se com aspecto liso e homogêneo, porém na última ocorrem deposições superficiais isoladas com formas irregulares. Em *S. bonplandii* as ceras formam placas.

Em *M. ilicifolia*, as folhas são glabras, porém nas outras duas espécies ocorrem tricomas. Esses são do tipo aglandular ou glandulares nas lâminas foliares de *S. bonplandii* e somente do tipo aglandular em *Z. ilicifolia*, presentes na lâmina foliar e no pecíolo.

Cristais de oxalato de cálcio apresentam-se sob diferentes formas e quantidade nas três espécies. Em *M. ilicifolia,* são abundantes na epiderme e aparecem em forma de ráfides e pequenos prismas. Em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia* mostram-se na forma de grandes prismas e localizam-se nas células em torno das nervuras, formando uma bainha. Em *S. bonplandii* estão também em forma de drusas, sempre próximos aos laticíferos.

O mesofilo, nas três espécies, pode ser diferenciado pela quantidade de estratos de parênquima paliçádico, mas a característica que permite reconhecer *Z. ilicifolia*, quando comparada com as outras duas espécies, é a presença de uma hipoderme na face adaxial.

Na nervura mediana, o formato geral, visto em corte transversal, é um dos caracteres mais marcantes. Em *M. ilicifolia* ambas as faces são convexas, sendo bastante acentuada na face adaxial e mais atenuada na face abaxial; em *S. bonplandii*, a face adaxial é côncava e a face abaxial tem acentuada convexidade; enquanto em *Z. ilicifolia*, ambas faces são convexas, porém a abaxial é mais saliente. Quanto ao tecido colenquimático, em *M. ilicifolia*, está reduzido a uma faixa estreita na face abaxial, sendo do tipo anelar, e raras células na face adaxial. Ampla faixa de colênquima observa-se, na face abaxial, em *S. bonplandii* e *Z. ilicifolia*, porém na primeira é do tipo anelar e na segunda do tipo angular. Nessas duas espécies também ocorre colênquima sob a epiderme, na face adaxial. É importante destacar, ainda, que somente em *S. bonplandii* ocorrem vasos laticíferos.

O bordo foliar de *M. ilicifolia* e *Z. ilicifolia* tem uma grande quantidade de fibras envolvendo uma pequena nervura, enquanto em *S. bonplandii* uma pequena quantidade de fibras se encontra no centro do bordo, sem tecido condutor. *Z. ilicifolia* diferencia-se de *M. ilicifolia* por suas fibras serem predominantes em relação aos outros tecidos encontrados no bordo.

Algumas características do pecíolo são bem distintas nas três espécies. Em secção transversal, o pecíolo de *M. ilicifolia* tem, na face adaxial, duas expansões laterais e forma levemente côncava, acentuada principalmente devido às expansões laterais, e na face abaxial tem forma convexa, com contorno uniforme. O pecíolo de S. bonplandii possui ambas as faces convexas, mostrando um aspecto quase cilíndrico, com contorno levemente ondulado. Em Z. ilicifolia, a face adaxial é côncava e a face abaxial é convexa. A distribuição dos tecidos vasculares, bem como das fibras que os contornam, quando vistos em corte transversal do pecíolo, também merecem atenção considerável como caráter para identificação taxonômica. O sistema vascular de M. ilicifolia apresenta-se em forma de anel, um pouco achatado na face adaxial, constituído por xilema interno e floema externo, envolto por cordões isolados de fibras. O pecíolo de S. bonplandii possui feixes vasculares colaterais dispostos em espiral, delimitados externamente por fibras. Em Z. ilicifolia, o sistema vascular tem xilema interno e floema externo, similar ao de M. ilicifolia, porém claramente distinto pela profunda concavidade na face adaxial e uma delimitação externa contínua de fibras. O córtex, em *M. ilicifolia*, é constituído por células parenquimáticas e entre essas destacam-se, ainda, células pétreas e muitos compostos fenólicos, embora estes compostos também estejam presentes em Z.ilicifolia. Em S. bonplandii, o preenchimento do córtex é feito por parênquima colenquimatoso.

Tabela 6. Síntese das conclusões.

	Maytenus ilicifolia	Sorocea bonplandii	Zollernia ilicifolia
Forma da lâmina foliar	Oblonga estreita	Obovada	Elíptica estreita
		oblongolanceolada	
Forma do ápice	Atenuado	Acuminado	Obtuso
Àngulo de divergência das nervuras secundárias	Estreito < 45°	Largo, entre 65-80°	Moderado, entre 45-65°
Terminações de nervuras	Pouco ramificada (2 a 3 vezes)	Muito ramificada (mais de 4 vezes)	Simples linear
Epiderme (vista frontal)			
Paredes anticlinais (MO) Campos primários de	Retas	Retas	Sinuosas
pontoação (MO)	Visíveis	Indistintos	Indistintos
Estômatos (MO)	Paracítico	Anomocíticos	Paracítico (circundados por células diferenciadas)
(MEV)	Lisa e homogenea	Formando placas	Lisa e algumas formas isoladas e irregulares
Tricomas	Ausentes	Glandulares e aglandulares, na lâmina	Aglandulares na lâmina e no pecíolo
Cristais (oxalato de Ca)			
Localização	Abundantes na epiderme	Contornando nervuras	Contornando nervuras, próximos aos laticíferos
Forma	Ráfides ou pequenos prismas	Drusas ou grandes prismas	Grandes prismas
Mesofilo			
Parênquima paliçádico Hipoderme	2 a 3 estratos Ausente	2 estratos Ausente	2 estratos Presente
Nervura mediana			
(corte transversal)			
Face adaxial	Convexa (acentuada)	Côncava	Convexa (atenuada)
Face abaxial	Convexa (atenuada)	Convexa (acentuada)	Convexa (acentuada)
Colênquima	Reduzido na face	Amplo na face abaxial,	Amplo na face abaxial,
Laticíferos	Ausentes	Presentes, do tipo não- articulado ramificado	Ausentes
Bordo	Pequena nervura envolta por algumas fibras	Sem tecido condutor fibras em pequena quantidade	Pequena nervura esclerênquima (fibras) é o tecido predominante
Pecíolo		quantitude	o techto predominante
(seccão transversal)			
Face adaxial	Levemente côncava com duas expansões laterais	Convexa, levemente ondulada	Côncava
Face abaxial	Convexa com contorno uniforme	Convexa, levemente ondulada	Convexa
Sistema vascular	Tecidos vasculares formam um anel, achatado na face adaxial e contornado por cordões isolados de fibras	Feixes vasculares colaterais dispostos em espiral delimitados externamente por fibras	Tecidos vasculares delimitados externamente por cordão contínuo de fibras
Córtex	Preenchido por parênquima, destaca-se a presença de células pétreas e compostos fenólicos	Preenchido por parênquima colenquimatoso	Preenchido por células parenquimáticas, destaca-se a presença de compostos fenólicos acumulados na região média do córtex

BIBLIOGRAFIA

- Alberton, M.D.; Falkenberg, D.B.; Medeiros, J.D.; Falkenberg & M.B. 1999. Análise microscópica aplicada ao controle de qualidade de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss). Resumos do VIII Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, Florianópolis, SC, 29 de outubro a 01 de novembro de 1999, p.20.
- Alquini, Y. & Takemori, N.K. 2000. Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico. Curitiba, Herbarium Laboratório Botânico, 80p.
- Bissing, D.R. 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. **Stain Technology**, **49** (2): 116-7.
- Bozzola, J.J. & Russel, L.D. 1991. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Boston, Jones and Barlett Publ. 542p.
- Carlquist, S. 1982. The use of ethylenediamine in softening hard plant structures for paraffin sectioning. **Stain Thechnology**, **57**(5): 311-17.
- Costa, A.F. 1982. Farmacognosia. 3º vol. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 1032p.
- Dickinson, T.A.; Parker, W.H. & Strauss, R.E. 1987. Another aproach to leaf shape comparisons. **Taxon**, **36** (1): 1-20.
- Dickison, W.C. 2000. Integrative Plant Anatomy. USA, Academic Press. 533p.
- Esau, K. 1959. Anatomia Vegetal. Barcelona, Ed.Omega S.A. 729 p.
- Evans, W.C. 1989. **Trease and Evans' Pharmacognosyn.** 13^a ed. London, Baillière Tindall. p.16–57: Plants and their structure.
- Evans, W.C. 1996. The plant and animal kingdoms as sources of drugs. In: Trease and Evans'Pharmacognosy. London, W.B. Saunders, p. 15-17.
- Gahan, P.B. & Onyia, G.O.C. 1984. Esterase activity in tubers of various species of *Dioscorea* and the effects of chilling. Saussurea, 15: 61-9.
- Gupta, M. P. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá, D.C., Colômbia, Convênio Andres Bello. 617p.
- Hickey, L.J. 1973. Classification of the architecture of Dicotyledonous leaves. American Journal of Botany, 60 (1): 17-33.

- Hickey, L.J. 1979. A revised classification of the architecture of Dicotyledonous leaves. In:C.r. Metacalfe & L. Chalk, (Ed.). 1979. Anatomy of the Dicotyledons. 2 ed., vol.1,Oxford, Claredon Press.
- Holloway, P.J. 1981. Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview.
 In: Cutler, D.F.; Alvin, K.L.& Price, C.E. (ed.). 1981. The Plant Cuticle. London, Acad.Press., Linnean Society Symposium Series. N¼10. p.1-32.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co.Inc. 523p.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. Plant Systematics. U.S.A., Sinauer Associates, Inc. 465p.
- Kasapligil, B. 1951. Morphological and ontogenetic studies of *Umbellularia californica* Nutt. and *Laurus nobilis* L. Univ. Calif. Publ. Bot., 25: 115-240.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédia, RJ. Ed. Universidade Rural. 198p.
- Lillie, R.D. 1965. Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. New York, McGraw-Hill. 715p.
- Lima, C. 1963. *Elementos de botânica*. Guia para trabalhos práticos. Belo Horizonte, Fac. de Farmácia. /cópia xerografada/. 10p.
- Machado, A.V. & Santos, M. 2000. Dados comparativos preliminares morfo-anatômicos das folhas de três espécies conhecidas como espinheira-santa. Resumos do 5º Encontro de Biólogos da Região Sul, UFSC / Florianópolis / SC, 17 a 20 de setembro de 2000, B014-Botânica.
- Melville, R. 1969. The terminology of leaf architecture. Taxon, 25 (5): 549-61.
- Melville, R. 1976. Leaf venation patterns and the origin of the Angiosperms. **Nature**, 224: 121-5.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1957. Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I e II. Oxford, Claredon Press.
- Napp-Zinn, K. 1974. Anatomie des Blattes. Blattanatomie der Angiospermen. Berlin, Gebrüder Borntraeger. v.2 Al (Zimermann, W.; Carlquist, S.; Ozenda, P. & Wulff, H.D. ed. Handbuch der Pflanzenanatomie. 2 ed. rev., 8 pte 2a).
- Napp-Zinn, K. 1984. Anatomie des Blattes. II. Blattanatomie der Angiospermen. B. Experimentelle und ökologische Anatomie des Angiospermenblattes. Berlin, Gebrüder

Borntraeger. v.1 (Braun, H. J.; Carlquist, S.; Ozenda, P. & Roth, I. ed. Handbuch der Pflanzenanatomie).

- Olowokudejo, J.D. 1987. Taxonomic value of petiole anatomy in the genus *Biscutella* L. (Cruciferae). **Bull. Jard. Bot. Nat. Belg. (Bull. Nat. Plantentuin Belg.), 57:** 307-20.
- Pavan-Fruehalf, S. 2000. Plantas Medicinais de Mata Atlântica, Manejo Sustentado e Amostragem. Ed. Annablume. 1^a edição. 215p.
- Quintas, A.T. 1963. Novo material apoio para cortes histológicos. Rev. Fac. Agr. Vet. Univ. RGS, 6: 51-4.
- Reis, M. S. 1996. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: Di Stasi, L. C. (org.) Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora Fundação Unesp, p. 1999-215.
- Rizzini, C.T. 1977. Sistematização terminológica da folha. Rodriguésia, 42: 103-25.
- Roth, A.; Mosburgger, V.; Belz, G. & Neugebauer, H.J. 1995. Hydrodynamic modelling study of angiosperm leaf venation types. **Botanica Acta**, **108**: 121-6.
- Santos, M. & Oliveira, P.L. 1988. Aspectos anatômicos da lâmina foliar de *Ocotea porosa* (Nees et Mart ex Nees) J. Angely (Lauraceae). **Insula**, Florianópolis, **18**: 3- 22.
- Santos, M. & Oliveira, P.L. 1995. Aspectos anatômicos do pecíolo de quatro espécies do gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul. **Insula**, **24**: 3-14
- Santos, M. & Almeida, S.L. 2000. Anatomia de *Spartina* (Poaceae) da Ilha de Santa Catarina (Florianópolis, SC). **Insula, 29**: 1-24.
- Simões, C.M.O.; Mentz, L.A.; Schenkel, E.P.; Irgang, B.E. & Stehmann, J.R. 1995. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 4^a ed. Porto Alegre, RS, Ed. da Universidade - UFRGS. 173p.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. 1999. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. Univ. UFRGS/ Ed. daUFSC. 821p.
- Solereder, H. 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons.Vol.I e II. Oxford, Claredon Press.1183 p.
- Sousa, H.C.; Messias, M.C.T.B. & Cordeiro, C.H.G. 1999. Estudo morfo-anatômico comparativo das espécies *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae) e *Sorocea* guillerminiana Gaudich (Moraceae), conhecidas como espinheira santa. Resumos do 50°

Congresso Nacional de Botânica, Blumenau, SC, 18 a 23 de julho de 1999, p.10 - n° 01.30.

- Statgraphics statistical graphics system. 1993. Ed. Statistical graphics corporation portions copyright version 7.
- Topper, S.M.C. & Koek-Noorman, J. 1980. The occurrence of axial latex tubes in the secondary xylem of some species of *Artocarpus* J. R. & Forster (Moraceae). IAWA Bulletin n.s., vol.1 (3): 113-119.
- Vattimo, I. 1975. Anatomia da folha das espécies conhecidas de pau-rosa. XI. Chave para identificação das espécies. Acta Amaz., 5 (2): 147-52.
- Watson, W.W. 1942. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. **New Phytol.**, **41**: 223-229.
- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface. Part I. Stomata. In: Metcalfe, C.R. & Chalk, L. (Ed.). Anatomy of the Dicotyledons. Vol. I. 2^a. Ed. Oxford, Claredon Press. p. 97-117.
- Wu, CC; Kuohuang LL. 1997. Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38(2): 97-104.

ILUSTRAÇÕES



Figura 1. Aspectos gerais das folhas de: a,b. *Maytenus ilicifolia*; c,d. *Sorocea bonplandii*;e,f. *Zollernia ilicifolia*. Vista de: a,c,e. face adaxial; b,d,f. face abaxial.



Figura 2. Representações esquemáticas, detalhando nervuras das lâminas foliares de: **a,d.** *Maytenus ilicifolia*; **b,e.** *Sorocea bonplandii*; **c,f.** *Zollernia ilicifolia*. Legenda: α - ângulo de divergência; 1°, 2°, 3° – ordens de nervuras.



Figura 3. Detalhes, em MO, de aréolas formadas pelas nervuras nas folhas de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia;* **c,d.** *Sorocea bonplandii;* **e,f.** *Zollernia ilicifolia;* **a,c,e.** representações esquemáticas; **b,d,f.** fotomicrografias. Setas indicam as bases das terminações de nervuras.



Figura 4. Cortes transversais das lâminas foliares de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia*; **c,d.** *Sorocea bonplandii*; **e,f.** *Zollernia ilicifolia*. Legenda: aba- face abaxial, ada- face adaxial, cr- cristal, ct- cistólito, e- epiderme, es- estômato, hp- hipoderme.



Figura 5. Vistas frontais, em MO, das lâminas foliares de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia;* **c,d.** *Sorocea bonplandii;* **e,f.** *Zollernia ilicifolia;* **a,c,e.** representações esquemáticas da face adaxial; **b,d,f.** fotomicrografias da face abaxial (setas indicam os estômatos). Legenda: cp-campos primários de pontoação, cr- cristais.



Figura 6. Detalhes, em corte transversal, da face abaxial de *Sorocea bonplandii*, destacando os tricomas: **a.** tricoma aglandular na nervura mediana, **b.** tricoma glandular no mesofilo.



Figura 7. Corte transversal da epiderme, na face adaxial da folha de *Maytenus ilicifolia*, destacando a membrana cuticular e a camada de cera depositada sobre esta. A seta indica um cristal prismático. Legenda: cc- camada de cera; fad- face adaxial; mc- membrana cuticular; ppe- parede periclinal externa.



Figura 8. Vistas, em MEV, da superfície adaxial das folhas de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia*; **c.** *Sorocea bonplandii*; **d,e.** *Zollernia ilicifolia*.



Figura 9. Vistas, em MEV, da superfície abaxial das folhas de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia*; **c,d.** *Sorocea bonplandii*; **e,f.** *Zollernia ilicifolia*. Aspectos: **a,c,e.** gerais; **b,d,f.** de detalhes dos estômatos.









Figura 13. Cortes transversais, em MO, das nervuras medianas de folhas de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia*; **c,d,f.** *Sorocea bonplandii*; **e.** *Zollernia ilicifolia*. Aspectos: **a,c,e.** gerais; **b,d,f.** de detalhes. Legenda: cl- clorênquima, co- colênquima, fab- face abaxial, fad- face adaxial, fb- fibras, fl- floema, lt- laticífero, x- xilema.



Figura 14. Cortes transversais, em MEV, das nervuras medianas de folhas de: **a,b.** *Maytenus ilicifolia*; **c,d.** *Sorocea bonplandii*; **e,f.** *Zollernia ilicifolia*. Aspectos: **a,c,e.** gerais; **b,d,f.** de detalhes dos tecidos na face abaxial. Legenda: co- colênquima, fab- face abaxial, fad- face adaxial, fb- fibras, fl- floema, x- xilema.





Figura 16. Imagens, em MEV, de dentes dos bordos de: **a,b,e.** *Maytenus ilicifolia*; **c,f.** *Sorocea bonplandii*; **d,g.** *Zollernia ilicifolia*. Aspectos: **a.** gerais; **b,c,d.** cortes transverso-longitudinais de ápices de dentes; **e,f,g.** de vistas frontais dos ápices dos dentes. Legenda: tr- tricoma, x- xilema.

