

Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de *Marsilea minuta* L. (Marsileaceae) ocorrente na Amazônia, Pará, Brasil

Jorgeane Valéria Casique-Tavares¹, Tatiani Yuriko Souza Kikuchi², Alba Lúcia Ferreira de Almeida Lins³, Edilson Freitas da Silva¹

1. Biólogo(a), Mestre em Ciências Biológicas (Botânica Tropical). Museu Paraense Emílio Goeldi (Coordenação de Botânica), Brasil. E-mail: valerytvares@hotmail.com; freitasdasilva20@yahoo.com.br
2. Engenheira Agrônoma, Mestre em Ciências Biológicas (Botânica Tropical). Museu Paraense Emílio Goeldi (Coordenação de Botânica), Brasil. E-mail: typinheiro@yahoo.com.br
3. Bióloga, Doutora em Botânica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pesquisadora Associada II, Museu Paraense Emílio Goeldi (Coordenação Botânica), Brasil. E-mail: alfalins@gmail.com

RESUMO: *Marsilea minuta* L. popularmente conhecida como “trevo de quatro folhas”, é uma samambaia aquática de difícil identificação devido ao seu curto período fértil. O objetivo deste trabalho foi a caracterização anatômica dos órgãos vegetativos de espécimes ocorrentes em áreas urbanas inundadas por precipitação e em solos saturados d’água, nos municípios de Belém e Bragança, Pará, a fim de subsidiar dados para a sua identificação e áreas correlatas. Amostras coletadas foram processadas segundo as técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura. Testes histoquímicos foram realizados nas estruturas secretoras para revelar a natureza química do exsudato. As estruturas anatômicas dos órgãos vegetativos dos espécimes analisados, em distintos níveis de inundação foram semelhantes. Entretanto, o tamanho dos órgãos (folíolos, pecíolos e rizomas) dos indivíduos emergentes, apresentaram-se maiores. A raiz, rizoma e pecíolo, em secção transversal, apresentam forma cilíndrica, com três regiões: epidérmica, cortical e medular. A epiderme desses órgãos é unisseriada, a região cortical é formada por aerênquimas (maiores em diâmetros no pecíolo em indivíduos aquáticos) e a medular (onde se localiza o sistema vascular). Grãos de amido ocorrem na região cortical do pecíolo e rizoma. A lâmina foliar é anfistomática com deposição de cera do tipo laminar. As estruturas secretoras observadas foram ductos e glândulas peroladas, ambas armazenam compostos fenólicos, especialmente tanino. Os ductos foram observados dispersos principalmente no parênquima cortical do rizoma e pecíolo, bem como associados ao feixe vascular da lâmina foliolar. Já as glândulas peroladas ocorrem no rizoma, pecíolo e lâmina foliar, sendo este o primeiro registro de ocorrência para a espécie em estudo. Assim, a anatomia dos órgãos vegetativos de *Marsilea minuta* oferece caracteres úteis que auxiliam a identificação da espécie em estudo, assim como para estudos farmacológicos.

Palavras-chave: Samambaia, macrófita aquática, glândula perolada, tanino.

Anatomical characterization of the vegetative organs of *Marsilea minuta* L. (Marsileaceae) occurring in Amazon, Pará, Brazil

ABSTRACT: *Marsilea minuta* L. commonly known as “Four Leaf Clover” is an aquatic fern of difficult identification due to its short period of fertility. The objective of this work was to characterize anatomic the vegetative structures of specimens of *M. minuta* occurring in flooded urban areas by rainfall and in water-saturated soils in the municipalities of Belém and Bragança in Pará, in order to subsidize its correct identification and related areas. Samples were collected from fertile specimens and processed according to the light microscopy and scanning electron microscopy techniques. Histochemical tests were carried out in the secretory structures to reveal the chemical nature of exudate. The vegetative organs of *Marsilea minuta* are similar anatomically analyzed in both environments. The root, rhizome and petiole, in cross section, have a cylindrical shape, with three regions: the epidermal and cortical bone marrow. The epidermis of these bodies is uniseriate, followed by cortical region formed by aerenchyma (larger in diameter in the petiole on aquatic individuals) and bone marrow (where is the vascular system). Starch grains occur in the cortical region of the petiole and rhizome. The leaf blade is amphistomatic with wax deposition laminar type. The secretory structures were observed pearl glands and ducts, store both phenolic compounds, especially tannin. The ducts were observed mainly dispersed in the cortical parenchyma of rhizome and petiole and associated with vascular bundle the leaflet blade. The pearly glands occur in the rhizome, petiole and leaf blade of the analyzed specimens, which is the first occurrence in the species under study. Thus, the anatomy of the vegetative organs of *Marsilea minuta* provides useful characters for species identification, as well as related areas.

Keywords: Fern, aquatic macrophyte, pearly glands, tannin.

1. Introdução

Marsilea L. é um gênero anfíbio com cerca de 70 espécies, as quais estão distribuídas em todo o mundo (JUDD et al., 2009), principalmente na Índia e no continente Africano (NAGALINGUM et al., 2007). Nas Américas foram identificadas apenas 12 espécies (PALACIOS-RIOS; JOHNSON, 1992), sendo que no Brasil, até o momento, foram listadas cinco, são elas: *Marsilea ancylopoda* A. Braun, *Marsilea crotophora* D. M. Johnson, *Marsilea deflexa* A. Braun, *Marsilea minuta* L. e *Marsilea polycarpa* Hook. & Grev. (WINDISCH, 2015).

Marsilea minuta, é uma samambaia aquática conhecida popularmente como “trevo de quatro folhas”, caracterizada por apresentar esporocarpos ramificados ou seriados (com dente superior e inferior), a partir da

região axilar do pecíolo com o rizoma e raízes intermodais (JOHNSON, 1986), que apesar de ser comum em áreas urbanas inundáveis por precipitação é de difícil identificação, devido ao seu curto período fértil. No Brasil, este táxon possui registro de ocorrência para a região Sudeste, Nordeste (WINDISCH, 2015) e recentemente para o Norte do país (TAVARES et al., 2014).

De acordo com Smith (1955), as espécies tropicais americanas são pouco estudadas, o que dificulta o estabelecimento de relações filogenéticas dentro do gênero. Havendo a necessidade de uma revisão taxonômica do grupo (JOHNSON, 1986), uma vez que o caráter heterospórico, viabiliza a adaptação em diversos ambientes (SCHAEFER et al., 2011).

Nesse contexto, estudos anatômicos de espécies de

Marsilea podem ajudar na identificação das mesmas (JOHNSON, 1986). Tendo em vista que análises só com base na morfologia, muitas vezes impossibilita a identificação (LAUNERT, 1968).

Com relação a sua importância, *Marsilea minuta*, cujo princípio ativo é a Marsiline (1-triacontanol cerotato), é utilizada na medicina tradicional no tratamento de certos males como sangramento do nariz, indigestão, doenças renais, diurético e anti-tóxico (PRANEETHA et al., 2011), além de auxiliar no tratamento de doenças psicopatológicas, hepatite, diarreia, tosse, bronquite e doença de pele (PARIHAR, 2006; TIWARI, 2010; MITHRAJA, 2011; PRANEETHA et al., 2011).

Estudos farmacológicos com o extrato etanólico de *Marsilea minuta*, em roedores, comprovaram a sua atividade ansiolítica, antidepressiva, sedativa, anticonvulsivante (BHATTAMISRA et al., 2008), antifertilidade e hipocolesterômica (BHARDWAJ et al., 1984; GUPTA et al., 2002). Porém, ainda não há registros na literatura sobre o(s) sítio(s) de liberação e/ou armazenamento dessa substância.

Ademais, informações anatômicas permitem localizar estruturas secretoras, bem como, definir, em alguns casos, o momento em que as glândulas estão em pleno desenvolvimento (MING, 1994), possibilitando além da identificação de espécies morfologicamente semelhantes, as relações ecológicas e o papel adaptativo dos vegetais (METCALFE; CHALK, 1950; RAVEN et al., 2007).

Diante do exposto, este estudo teve por objetivo caracterizar a anatomia dos órgãos vegetativos de *Marsilea minuta*, bem como revelar a natureza histoquímica de suas estruturas secretoras, como forma de proporcionar subsídios para áreas correlatas e que favoreçam a identificação de espécimes emergentes (em substratos inundados por precipitação) e anfíbios (ocorrentes em substrato saturados de água), ocorrentes em áreas urbanas dos municípios de Belém e Bragança, Pará.

2. Material e Métodos

Os espécimes ocorrentes em áreas urbanas inundadas por precipitação (emergentes) e em solos saturados d'água (anfíbios) foram coletados nos municípios de Belém e Bragança, Pará, Brasil, nos períodos de maio a setembro de 2012, os quais foram herborizados e incorporados no Herbário MG, João Murça Pires, sob os registros MG205573, MG205574 (espécimes emergentes) e MG205575, MG205576 (espécimes anfíbios). A identificação dos espécimes foi confirmada pelo especialista em Marsileaceae (D.M. Johnson, comunicação pessoal, 2013).

Amostras foram retiradas dos órgãos vegetativos (raiz, rizoma, pecíolo e folíolos), fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 70% GL) e SFF (sulfato ferroso em formalina) (JOHANSEN, 1940), submetidas a vácuo por 24 horas e conservadas em álcool etílico 70% GL. Posteriormente, foram desidratadas em série butílica (JOHANSEN, 1940) e incluídas em parafina.

Seções seriadas transversais e longitudinais foram feitas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo Leica RM 2245), com 10-12 µm de espessura, coradas com safranina básica e azul de astra (GERLACH, 1969) e

montadas entre lâmina e lamínula em resina sintética Permout®.

Amostras também foram incluídas em historesina (2-hidroxi-etil)-metacrilato, seccionadas com 2-4 µm de espessura e coradas com azul de toluidina 0,05% (GERRITS; SMID, 1983).

A diafanização da folha inteira (quatro folíolos) foi realizada em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 5%, por 72 horas, quando ocorreu a completa clarificação do material e logo após foi corada em safranina 5% hidro-alcoólica (JOHANSEN, 1940), desidratada em série alcoólica etílica crescente e montada entre lâminas de vidros em resina sintética Permout®.

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram desidratadas em série de álcool etílico (JOHANSEN, 1940), secas através de ponto crítico de CO₂ e metalizadas com uma camada de ouro de aproximadamente 15 nm de espessura. As eletromicrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Leo 1450 VP, com aceleração de voltagem de 12 kV.

Testes histoquímicos com seus respectivos controles foram realizados em amostras frescas, para revelar a natureza química do exsudato armazenado e/ou liberado pelas estruturas secretoras: cloreto férrico, para evidenciar compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940) e vanilina clorídrica (MACE; HOWELL, 1974), para revelar tanino.

As fotomicrografias foram realizadas com auxílio de câmera fotográfica digital Canon Power Shot A660IS, acoplada ao microscópio Zeiss Axiostar Plus. Amostras foram submetidas à luz polarizada, a fim de evidenciar constituintes celulares de natureza birrefringente. As eletromicrografias de varredura foram obtidas por captura em microscópio Leo (modelo 1450 VP).

Os termos utilizados na descrição anatômica estão de acordo com Johnson (1986) e Awasthi (2009), respectivamente.

3. Resultados e Discussão

Os espécimes de *Marsilea minuta* analisados como emergentes (em substratos inundados por precipitação) e como anfíbios (ocorrentes em substrato saturados de água), apresentaram-se anatomicamente semelhantes na estrutura dos seus órgãos vegetativos. Porém, os espécimes emergentes diferem biometricamente, em maior tamanho, nos órgãos vegetativos - folíolos, pecíolos e rizomas - (TAVARES et al., 2014).

Os folíolos, em vista frontal, apresentam a superfície da face adaxial tanto dos indivíduos anfíbios quanto dos emergentes, constituída de células heterodimensionais com paredes anticlinais levemente sinuosas e deposição de cera epicuticular do tipo laminar (Figuras 1A-B, 1E). Tricomas glandulares do tipo perolado ocorrem dispersos aleatoriamente na superfície (Figuras 1A, 1E-F).

Os estômatos observados na superfície foram do tipo anomocíticos (Figura 1C) e anisocíticos (Figura 1D), sendo que o primeiro predomina em ambas as faces. A lâmina foliar é anfiestomática com conspícuas câmaras subestomáticas em ambas as faces (Figura 2B).

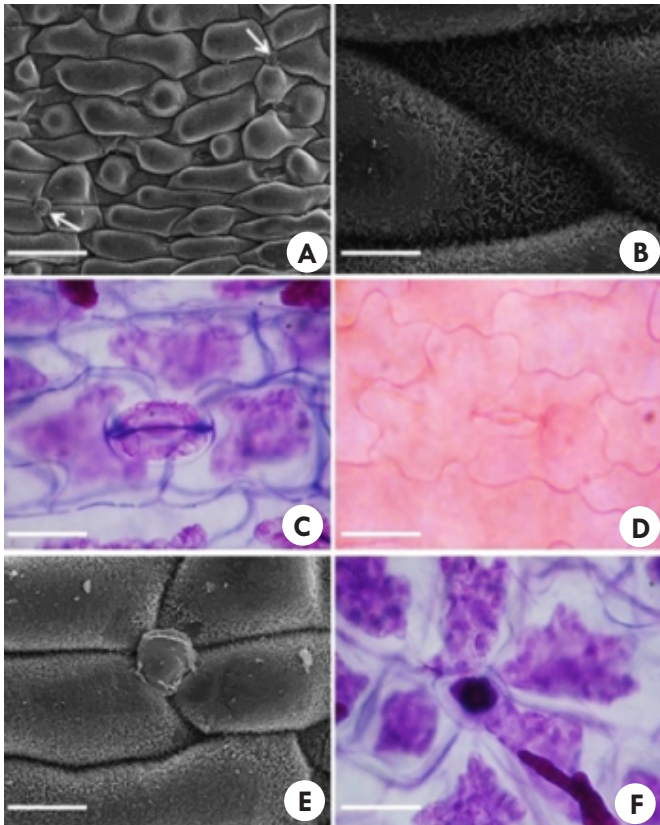


Figura 1. *Marsilea minuta* L. Superfície foliolar, em vista frontal. A: vista geral da epiderme adaxial, evidenciando os tricomas perolados (setas); B: detalhe da cera epicuticular do tipo laminar; C-D: detalhe do estômato anomocítico (C) e anisocítico (D); E-F: detalhe do tricoma perolado. Escalas: A-B= 50µm, C-F= 20µm. / **Figure 1.** *Marsilea minuta* L. leaf surface, in front view. A: overview of adaxial epidermis, revealing the pearly trichomes (arrows); B: detail of epicuticular wax laminar type; C-D: Detail anomocytic stomata (C) and anisocytic (D); E-F: Detail pearly trichomes. Scales: A-B= 50µm, C-F= 20µm.

Estômatos anomocíticos e anisocíticos foram encontrados nos folíolos de Marsileaceae (LAUNERT, 1968; KRAMER; GREEN, 1990). Entretanto, Montiel (1979) observou estômatos paracíticos para o gênero *Marsilea*. Porém, na espécie em estudo os mesmos não foram observados. Já o caráter anfistomático, observado em *Marsilea minuta*, é comumente encontrado em macrófitas aquáticas emergentes e anfíbias (SCULTHORPE, 1985).

Os tricomas glandulares do tipo perolado descritos por Solereder (1908) como glândula formada por uma célula basal e uma célula apical esférica semelhante a uma pérola, presentes apenas em órgãos aéreos de espécies de Piperaceae, dentre elas: *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (SILVA; MACHADO, 1999) e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (MARINHO, 2008). Contudo, ressalta-se a existência desta glândula também para *Marsilea minuta*, sendo este, o primeiro registro para um representante de *Marsilea*.

O mesofilo, em seção transversal, é dorsiventral (Figura 2A). Apresenta de uma a duas camadas de células paliçádicas e de duas a três camadas de parênquima lacunoso e grandes lacunas aeríferas (Figuras 2A, 2C).

O feixe vascular é colateral (Figura 2C), constituído de traqueídes com espessamento de parede do tipo anelar e pontoadas (Figura 2D), os quais são delimitados por uma camada de células parenquimáticas que estão associados a três a seis ductos ao seu redor (Figuras 2A, 2C), contendo substância amarelada *in natura*, a qual reagiu

positivamente para compostos fenólicos.

A margem, em seção transversal, apresentou aspecto afilado com células epidérmicas globosas, cutícula levemente espessa e conteúdo denso (Figuras 2E), que cora de roxo, em azul de toluidina, sugerindo conteúdo mucilaginoso.

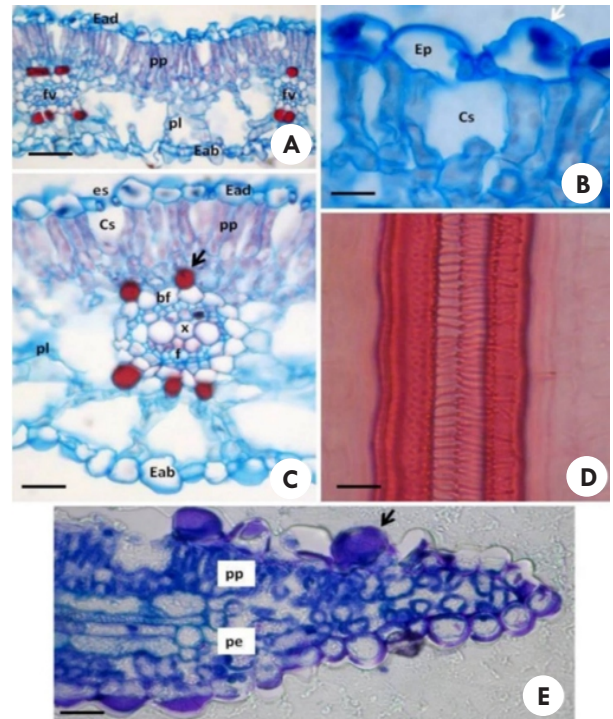


Figura 2. *Marsilea minuta* L. Estrutura da lâmina foliolar, em seção transversal. A: vista geral do mesofilo; B: detalhe da epiderme evidenciando conteúdo mucilaginoso (seta) e estômato com grandes câmaras subestomáticas; C: detalhe do feixe vascular no mesofilo, associado a ductos nos polos; D: detalhe de traqueídes com espaçamento anelar; E: margem afilada, notar mucilagem nas células epidérmicas, evidenciada com azul de toluidina (seta). bf: bainha do feixe, es: estômato, Eab: Epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Ep: epiderme, Cs: câmara subestomática, f: floema, fv: feixe vascular, pe: parênquima esponjoso, pl: parênquima lacunoso, pp: parênquima paliçádico, x: xilema. Escalas: A= 100µm; B,D= 30µm; C,E= 50µm. / **Figure 2.** *Marsilea minuta* L. Structure of the leaf, in cross section. A: overview mesophyll; B: detail of the epidermis showing mucilaginous content (arrow) and stomata with large substomatic; C: beam vascular detail in the mesophyll, ducts associated with the poles; D: tracheids detail with ring spacing; E: tapered edge, mucilage noted in epidermal cells, shown with toluidine blue (arrow). bf: hem beam; es: stomata, Eab: abaxial epidermis, Ead: adaxial epidermis, Ep: epidermis, Cs: substomatic camera, f: phloem, fv: vascular bundle, pe: spongy parenchyma, pl: lacunary parenchyma, pp: palisade parenchyma, x: xylem. Scale: A= 100µm; B,D= 30µm; C,E= 50µm.

O pecíolo, em seção transversal, apresenta forma cilíndrica (Figura 3A), com epiderme unisseriada, constituída por células cuboídes, cobertas por cutícula espessa (Figuras 3A e 6A). Os estômatos e os tricomas glandulares do tipo perolado estão distribuídos aleatoriamente, apresentando conteúdo denso amarelado, que reagiu positivamente para compostos fenólicos (Figuras 3B; 6A, 6C, 6E). A descrição realizada por Johnson (1986) para epiderme do pecíolo de *M. minuta* foi semelhante, diferindo apenas pela presença dos tricomas perolados que não foram descritos pelo autor supracitado.

O córtex mais externo do pecíolo constituiu-se de uma camada de exoderme, seguido por lacunas aeríferas que ocupam aproximadamente 2/3 da região cortical e são maiores em diâmetro nos espécimes emergentes (Figura 3A). Já o córtex mais interno, constituiu-se de cinco a seis camadas de células parenquimáticas, com abundantes grãos de amido (Figura 3D), além de ductos contendo compostos

fenólicos distribuídos aleatoriamente nessa região (Figuras 3C). As descrições da região cortical do pecíolo estão de acordo com os observados por Sculthorpe (1985) e Johnson (1986).

Os compostos fenólicos são componentes de adaptações defensivas (DICKSON, 2000), envolvidos em processos contra a radiação e agressões de patógenos (FARAR; DONANGELO, 2006), apresentando propriedades farmacológicas e anti-nutricionais que inibem a lipidação e a proliferação de fungos (SOARES, 2002).

Segundo Feio et al. (2013) estes compostos possuem propriedades peculiares relacionadas a herbivoria e evasão de patógenos em *Elaphoglossum laminarioides* (Fée) T. Moore, demonstrando que a espécie é adaptada ao seu ambiente, produzindo metabólitos secundários diretamente relacionados ao seu sucesso adaptativo. Ainda de acordo com esses autores os compostos mucilaginosos encontrados exclusivamente nessa espécie, servem para reter água, uma vez que a mesma ocorre em áreas expostas ao sol.

O sistema vascular do pecíolo constitui-se por cordões de xilema em forma de 'V', com protoxilemas nas extremidades e metaxilemas ao centro (Figura 3C).

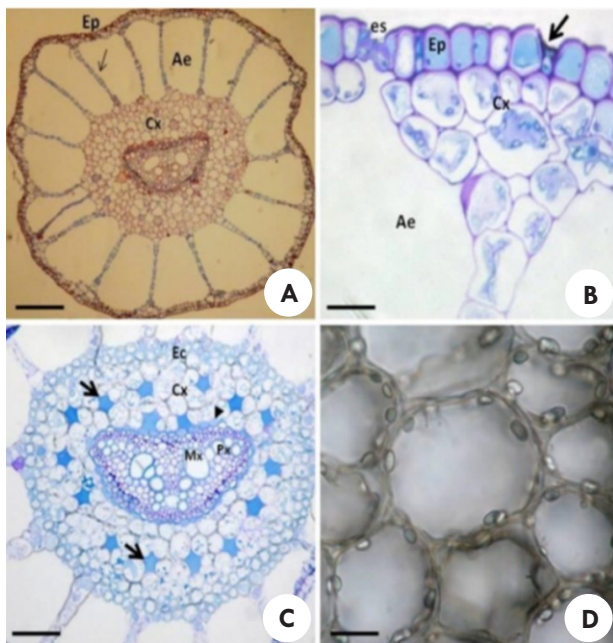


Figura 3. *Marsilea minuta* L. Estrutura do pecíolo, em secção transversal. A: vista geral, notar septos (seta); B: detalhe da periferia, notar base do tricoma perolado (seta); C: detalhe da região cortical, evidenciando ductos (setas) e o sistema vascular na região medular, notar endoderme (cabeça de seta); D: parênquima com grãos de amido no córtex. Ae: Aerênquima, bf: bainha do feixe, Cx: córtex, es: estômato, Ec: esclerênquima, Ep: epiderme, Mx: metaxilema, Px: protoxilema. Escalas: A= 150µm; B,D= 20µm, C= 100µm. / **Figure 3.** *Marsilea minuta* L. Petiole structure, in cross-section. A: overview, noting septa (arrow); B: detail the periphery, noting the pearl base trichomes (arrow); C: detail of the cortical region, showing ducts (arrows) and the vascular system in the spinal region, noting endoderm (arrowhead); D: parenchyma with starch granules in the cortex. Ae: aerenchyma, bf: hem beam, Cx: cortex, es: stomata, Ec: sclerenchyma, Ep: epidermis, Mx: metaxylem, Px: protoxylem. Scale: A= 150µm; B,D= 20µm, C= 100µm.

Em *Marsilea minuta* as características estruturais do sistema vascular em forma de arco com feixes colaterais de menor calibre (que assessoram o feixe vascular principal), são mencionadas como padrão para Marsileaceae (PURI; GARG, 1953; SMITH, 1955;

SCULTHORPE, 1985; JOHNSON, 1986; AWASTHI, 2009).

De acordo com Feio et al. (2013) a estrutura vascular do pecíolo de *Elaphoglossum discolor* (Kuhn) C. Chr., *E. flaccidum* (Fée) T. Moore e *E. laminarioides* (Fée) T. Moore (Samambaias) foi semelhante ao descrito para a nervura central dos taxa. Entretanto, em *Marsilea minuta* o sistema vascular de cada órgão analisado apresentou-se distinto, permitindo a identificação independente dos mesmos.

O rizoma, em secção transversal, apresentou contorno cilíndrico (Figura 4A). A epiderme é unisseriada formada por células justapostas com paredes espessadas, coberta por cutícula delgada com tricomas glandulares do tipo perolado (Figura 6A). Assim como observado na superfície foliar e pecíolo, Johnson (1986) não descreveu para a epiderme do rizoma de *M. minuta* a presença dos tricomas perolados.

O córtex externo do rizoma é constituído por uma hipoderme, associada a lacunas aeríferas (Figura 4A). Uma camada de células parenquimáticas e um cilindro formado por duas a três camadas de células lignificadas (Figura 4A). Cerca de oito camadas de células parenquimáticas com grãos de amido (Figuras 4A-B, 4D-E) e ductos secretores com arestas agudas e conteúdo denso amarelado *in natura* (Figuras 4B e 6D), adjacentes a uma endoderme externa. Testes histoquímicos realizados nos ductos revelaram a presença de compostos fenólicos (Figura 6E), especificamente tanino (Figura 6F).

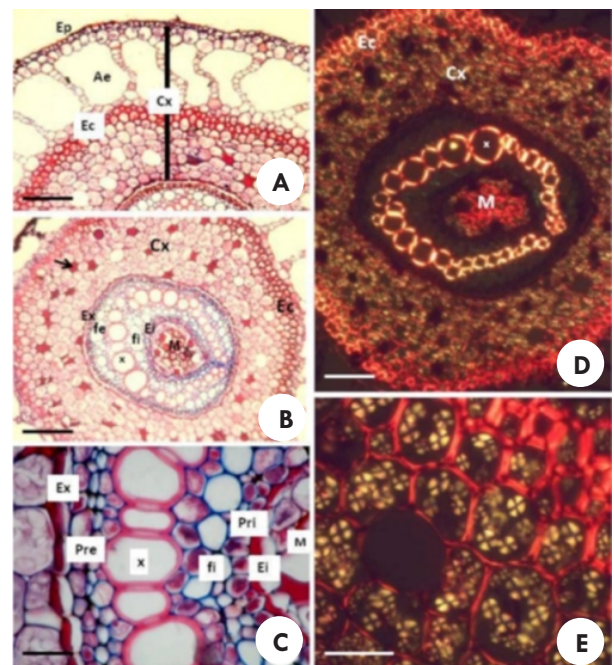


Figura 4. *Marsilea minuta* L. Estrutura do rizoma, em secção transversal. A: vista geral; B: detalhe da região do córtex, evidenciando ductos (seta) e sistema vascular; C: detalhe do sistema vascular; D-E sistema vascular (D) e grãos de amido em luz polarizada (E). Ae: Aerênquima, Cx: córtex, Ec: esclerênquima, Ep: epiderme, Ex: Endoderme externa, Ei: endoderme interna, fe: floema externo, fi: floema interno, M: medula, Mx: metaxilema, Px: protoxilema, Pri: periciclo interno, Pre: periciclo externo. Escalas: A-B, D= 100µm; C, E= 20µm. / **Figure 4.** *Marsilea minuta* L. Rhizome structure, in cross section. A: general view; B: detail region of the cortex, indicating ducts (arrow) and vascular system; C: vascular system detail; D-E vascular system (D) and starch grains polarized light (E). Ae: aerenchyma, Cx: cortex, Ec: sclerenchyma, Ep: epidermis, Ex: external endoderm, Ei: internal endoderm, fe: phloem external, fi: internal phloem, M: marrow, Mx: metaxylem, Px: protoxylem, Pri: pericycle internal, Pre: pericycle external. Scale: A-B, D= 100µm; C, E= 20µm.

De acordo Smith (1955) a estrutura da medula, em geral, depende das condições ambientais, ou seja, em rizomas que se desenvolvem em solos encharcados são parenquimatosas e as que ocorrem em áreas inundáveis são lignificadas.

O sistema vascular desse órgão é anfifloico e sifonostelo (Figuras 4B-D). O centro do cilindro vascular é ocupado pela medula, que é preenchida por células de paredes lignificadas em indivíduos anfíbios (Figuras 4B e 4D). A presença de floema anfifloico, endoderme (interna e externa) e o desenvolvimento regular do protoxilema são características primitivas (SCULTHORPE, 1985).

A raiz, em seção transversal, possui forma cilíndrica (Figura 5A). A superfície é constituída por uma camada unisseriada de células com paredes irregulares. Já a região cortical é formada por uma camada de células parenquimáticas justapostas, seguida por lacunas aeríferas (Figuras 5A-B). Ainda no córtex ocorrem de cinco a seis camadas de células esclerificadas com paredes bastante espessadas (Figuras 5C e 5E).

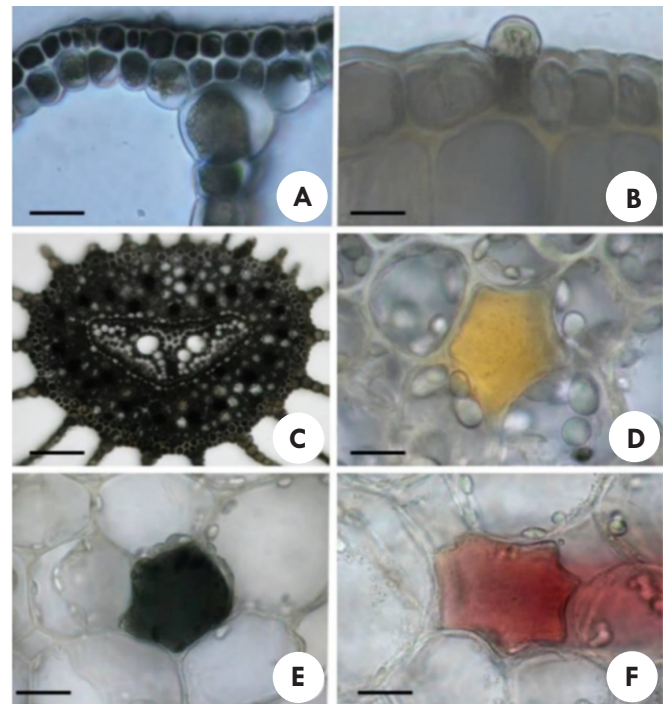


Figura 6. *Marsilea minuta* L. Testes histoquímicos nas estruturas secretoras dos órgãos vegetativos demonstrando reações positivas. A: SFF, no tecido de revestimento do pecíolo; B: Cloreto férrico no tricoma perolado; C: SFF, na região cortical e vascular do pecíolo; D: coloração *in natura* do conteúdo dos ductos, localizados no rizoma e pecíolo; E: Cloreto férrico nos ductos, localizados no rizoma e pecíolo; F: vanilina clorídrica nos ductos, localizados no rizoma e pecíolo. SFF: Sulfato Ferroso em formalina. Escalas: A-C= 50µm; D-F= 5µm. / **Figure 6.** *Marsilea minuta* L. Histochemical tests in secretory structures of the vegetative organs showing positive reactions. A: FSF, the tissue lining of the petiole; B: Ferric chloride in trichome pearly; C: FSF, in the cortical region and vascular petiole; D: staining *in natura* content of the ducts located in the stem and rhizome; E: Ferric chloride in the ducts located in the stem and rhizome; F: vanillin chlorine in the ducts located in the rhizome and petiole. FSF: Ferrous Sulfate formalin. Scale: A-C= 50µm; D-F= 5µm.

As características estruturais observadas nos espécimes analisados, tais como: sistema vascular com feixes colaterais nos folíolos foram mencionadas como padrão para Marsileaceae (PURI; GARG, 1953; SMITH, 1955; SCULTHORPE, 1985; JOHNSON, 1986; AWASTHI, 2009).

4. Conclusão

As características anatômicas descritos neste estudo ampliam o conhecimento sobre *Marsilea minuta* e fornecem caracteres que auxiliam a sua identificação, já que a espécie geralmente é encontrada estéril em seu ambiente de ocorrência. Além disso, fornece dados inéditos sobre as estruturas secretoras e dos exsudatos presentes nas mesmas.

5. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica concedida a primeira autora no período 01/08/2012 a 31/07/2013, ao Laboratório de Anatomia Vegetal da Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi pela infraestrutura concedida e ao Dr. D. M. Johnson (Department of Botany/Microbiology, University of Wesleyan, Ohio, USA), pela confirmação da espécie em estudo.

6. Referências Bibliográficas

- AWASTHI, D. K. *Cryptogams (Algae, Bryophyta and Pteridophyta)*. Meerut: Krishna Prakashan Media (P) Ltd., 2009.
BHARDWAJ, T. N.; GARG, A. The antifertility effect to fan Australian

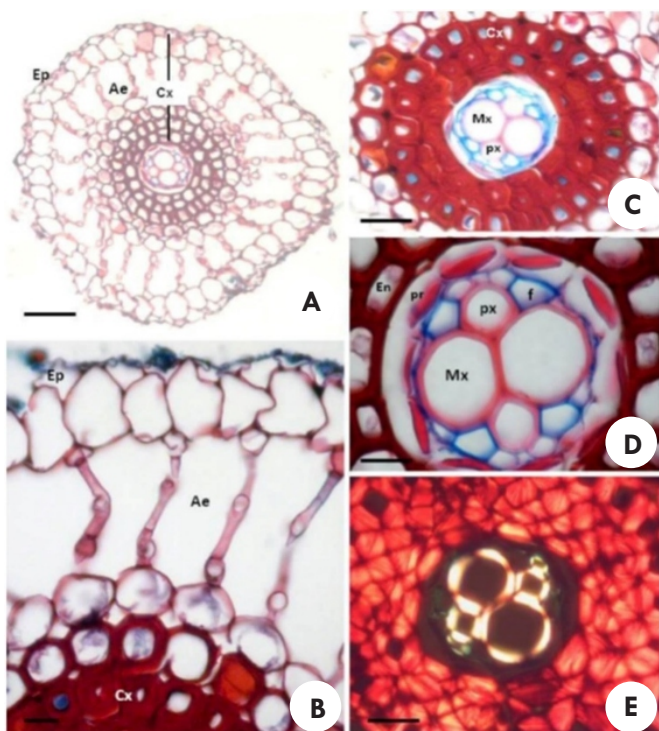


Figura 5. *Marsilea minuta* L. Estrutura da raiz, em seção transversal. A: vista geral; B: detalhe do sistema de revestimento e cortical; C: detalhe das camadas esclerificadas do córtex ao redor do sistema vascular; D-E: detalhe do sistema vascular (D) em luz polarizada (E). Ae: Aerênquima, Cx: córtex, En: endoderme, es: estômato, Ep: epiderme, f: floema, Mx: metaxilema, Px: protoxilema, pr: periciclo. Escalas: A= 150 µm; B-E= 50 µm; D= 20µm. / **Figure 5.** *Marsilea minuta* L. Root structure, cross-section. A: general view; B: detail of the coating system and cortical; C: sclerified detail of the layers of the cortex around the vascular system; D-E: detail of the vascular system (D) polarized light(E). Ae: aerenchyma, Cx: cortex, En: endoderm, es: stomata, Ep: epidermis, f: phloem, Mx: metaxylem, Px; protoxylem, pr: pericycle. Scale: A= 150 µm; B-E= 50 µm; D= 20µm.

O sistema vascular localiza-se na porção medular sendo delimitado por uma camada de endoderme externamente e um periciclo internamente (Figuras 5C-D). Está última camada apresenta conteúdo denso (Figura 5D). No interior do feixe observam-se vasos de metaxilema e protoxilema (Figuras 5C-E).

- species of the aquatic fern *Marsilea* L. **Indian Fern Journal**, v. 1, p. 75-82, 1984.
- BHATTAMISRA, S. K.; SINGH, P. N.; SINGH, S. K.; KUMAR, V. Anxiolytic activity of *Marsilea minuta* Linn in rodents. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2008.
- DICKINSON, W. G. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Academic Press, 2000.
- FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic Compounds in Coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.
- FEIO, A. C.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; POTIGUARA, R. C. V. *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae - Fern) of Amazon Rain forest in Brazil: Anatomic Characterization and Adaptative Strategies. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 9, p. 1863-1871, 2013.
- GERRITS, P. O., SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, v. 132, n. 1, p. 81-85, 1983.
- GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik**. Stuttgart: Thieme Verlag, 1969.
- GUPTA, M.; DATTA, U. K.; BHATTACHARYA, I.; MUKHERJEE, S.; MANIKANDAN, L. Studies of antifertility activity of *Marsilea minuta* Linn. **Indian Journal Pharmacology Science**, v. 64, n. 2, p. 176-178, 2002.
- JOHANSEN, A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc. Graw-Hill, 1940.
- JOHNSON, D. M. Systematics of the New World Species of *Marsilea* (Marsileaceae). Systematic Botany Monographs. **The American Society of Plant Taxonomists**, v. 11, p. 1-87, 1986.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KRAMER, K. U.; GREEN, P. S. **The families and genera of vascular plants**. Pteridophytes and Gymnosperms. Berlin: Springer Verlag, 1990.
- LAUNERT, E. A monographic survey of the genus *Marsilea* Linnaeus. The species of Africa and Madagascar. **Senckenbergiana Biologica**, v. 49, p. 273-315, 1968.
- MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, p. 2423 - 2426, 1974.
- MARINHO, C. R. **Características anatômicas, histoquímicas das estruturas secretoras e ontogenia de idioblastos da folha de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Piperaceae**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia. **Horticultura Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 3-9, 1994.
- MITHRAJA, M. J.; MARIMUTHU, J.; MAHESH, M.; PAUL, Z.; JEEVA, M. S. Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *Marsilea minuta* L. and *Salvinia molesta* Mitch. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicines**, v. 1, p. S26 - S29, 2011.
- MONTIEL, M. B. Observaciones ultraestructurales em epidermis de hidróptéridos. **Revista de Biología Tropical**, v. 27, n. 2, p. 177-187, 1979.
- NAGALINGUM, N. S.; SCHNEIDER, H.; PRYER, K. M. Molecular Phylogenetic Relationships and Morphological Evolution in the Heterosporous Fern Genus *Marsilea*. **Systematic Botany**, v. 32, n. 1, p. 16-25, 2007.
- PALACIOS-RIOS, M.; JOHNSON, D. M. Marsileaceae. **Flora de Veracruz**. v. 70, p. 1-11, 1992.
- PRANEETHA, P. V. RANI, S.; KUMAR, B. R. Hepato protective Activity of Methanolic Extract of Leaves of *Marsilea minuta* Linn Against CCl Induced Hepatic Damage in Rats. **Global Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 164-171, 2011.
- PARIHAR, P.; PARIHAR, L. Some pteridophytes of medicinal importance from Rajasthan. **Natural Product Radiance**, v. 5, n. 4, p. 297-301, 2006.
- PURI, V.; GARG, M. L. A contribution to the anatomy of the sporocarp of *Marsilea minuta* L. with a discussion of the nature of the sporocarp in the Marsileaceae. **Phytomorphology**, v. 3, p. 190-209, 1953.
- RAVEN, P. et al. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Anatomia comparada do pulvino, pecíolo e raque de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae - Faboideae). **Revista Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 381-390, 2004.
- SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. Koeltz: Scientific Books, 1985.
- SCHAEFER, H.; CARINE, M. A.; RUMSEY, F. J. From European Priority Species to Invasive Weed: *Marsilea azorica* (Marsileaceae) is a Misidentified Alien. **Systematic Botany**, v. 36, n. 4, p. 845-853, 2011.
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.
- SMITH, G. M. **Botânica Criptogâmica**. vol. II. Briófitos e Pteridófitos. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1955.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOLEREDER, M. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1908.
- TAVARES, J. V. T.; KIKUCHI, T. Y. S.; MACIEL, S.; LINS, A. L. F. A. *Marsilea minuta* L. (Marsileaceae): nova ocorrência para a Amazônia brasileira. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Ciências Naturais**, v. 9, n. 3, p. 687-692, 2014.
- TIWARI, O. M. P.; SUBHRATA, K.; BHATTAMISRA, T.; PUSHPENDRA, K. P. Anti-aggressive activity of a standardized extract of *Marsilea minuta* Linn. in rodent models of aggression. **Bio Science Trends**, v. 4, n. 4, p. 190-194, 2010.
- WINDISCH, P. G. **Pteridófitas da região Norte-Ocidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões**. São José do Rio Preto: UNESP, 1992.
- WINDISCH, P. G. Marsileaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB091500> (Acessada em 15/03/2015).