



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

CLEDSON DOS SANTOS MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DE
FOLHAS DE *Trema micrantha* (L.) Blume UTILIZADA COMO ANTIOFÍDICA**

Recife
2020

CLEDSON DOS SANTOS MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DE
FOLHAS DE *Trema micrantha* (L.) Blume UTILIZADA COMO ANTIOFÍDICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção de grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Karina Perrelli Randau

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Pernambuco

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Solma Lúcia Souto Maior de Araújo Baltar

Universidade Federal de Alagoas

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Magalhães, Cledson dos Santos

Caracterização anatômica, histoquímica e fitoquímica de folhas de *Trema micrantha* (L.) Blume utilizada como antiofídica / Cledson dos Santos Magalhães- 2020.

67 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Karina Perrelli Randau

Coorientadora: Solma Lúcia Souto Maior de Araújo Baltar

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndice.

1. Cannabaceae 2. Controle de qualidade 3. Farmacobotânica

I. Randau, Karina Perrelli (Orientadora) II. Baltar, Solma Lúcia Souto Maior de Araújo (Coorientadora) III. Título

583.45

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-086

CLEDSON DOS SANTOS MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA, HISTOQUÍMICA E FITOQUÍMICA DE
FOLHAS DE *Trema micrantha* (L.) Blume UTILIZADA COMO
ANTIOFÍDICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção de grau de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Karina Perrelli Randau (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Carolina Lins da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Rafaela Damasceno Sá (Examinadora Externa)
Centro Universitário da Vitória de Santo Antão

Dedico este trabalho à minha amada avó materna Maria Serapião dos Santos “Lourive” (*in memoriam*), minha maior incentivadora, com amor e saudade dedico mais esta conquista. Aos meus pais, Maria Selma dos Santos Magalhães e Isvaldo Teixeira de Magalhães, por toda a dedicação, ensinamento, amor e confiança depositados em mim. Aos meus irmãos, Viviane dos Santos Magalhães, Clessiane dos Santos Magalhães e Clecivaldo dos Santos Magalhães, por todo apoio, carinho e amor dedicados a mim, e que mesmo distantes estão presentes em cada momento de conquista, alegria e momentos difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha Mãe Santíssima, por serem a minha fonte de fé, força e coragem me motivando sempre a enfrentar todos os caminhos a serem seguidos.

Aos meus pais, Isvaldo e Selma, e aos meus irmãos, Viviane, Clessiane e Clecivaldo, pelo carinho, amor, compreensão, força, união, ensinamentos e apoio em todos os momentos de minha vida. Sou eternamente grato por ter vivido e aprendido o verdadeiro significado de família e por todos os valores que formaram meu caráter.

Ao Norman Monteiro da Silva Junior, pelo companheirismo e incentivo nas noites e dias de trabalho em frente ao computador. Agradeço por sua dedicação e paciência comigo durante este tempo de minha vida aqui em Pernambuco e também durante esta empreitada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Karina Perrelli Randau, pela oportunidade, confiança, paciência, apoio e incentivo me guiando na realização desta pesquisa com postura marcada por competência, profissionalismo e rigor científico. Agradeço por todo o ensinamento passado ao longo deste período e nos próximos que estão por vir.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Solma Lúcia Souto Maior de Araújo Baltar, pelo incentivo, amizade e pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos que a vida acadêmica me proporcionou conhecer por terem me permitido fazer parte da caminhada de vocês e de partilhar momentos memoráveis.

Aos amigos de caminhada, do Departamento de Farmácia e de bar, pela descontração e pelas conversas jogadas fora, confesso que aliviavam as tensões.

A Rozalia Bernardo, pelo apoio nesta caminhada, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacobotânica, em especial a Dra. Rafaela Damasceno Sá pelos ensinamentos passados ao longo desses dois anos, a Rodrigo Vinícius Luz da Silva e José Pedro Martins Barbosa Filho pelo apoio e contribuição na reta final desta etapa acadêmica, e a todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste projeto.

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Ao programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela possibilidade do desenvolvimento desta pesquisa e pelo suporte ofertado.

A todos os professores que fazem parte do programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica pelos ensinamentos passados.

A profa. Dra. Flávia Carolina Lins da Silva e a profa. Dra. Rafaela Damasceno Sá pela preciosa participação na Banca de Defesa, agradeço a vocês pela atenção, pelo exame e pela disponibilidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo e concessão da bolsa.

Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, caminhe.
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha.
(CALCUTÁ, 2004)

RESUMO

Trema micrantha (L.) Blume pertence à família Cannabaceae e é popularmente conhecida como pau-de-bugre. Na medicina popular suas folhas são utilizadas em chás indicados para o tratamento de sífilis, reumatismo, diabetes e em alguns casos é relatado seu uso como antiofídica. Devido a isso, estudos que visam identificar caracteres de diagnóstico são necessários com o intuito de contribuir para o controle farmacobotânico da espécie. Este estudo teve por objetivo identificar os caracteres anatômicos, histoquímicos e fitoquímicos das folhas de *T. micrantha*. Com esta finalidade, métodos usuais em anatomia vegetal foram utilizados para o preparo e análise, em microscópio de luz e de polarização, de lâminas semipermanentes contendo secções transversais e secções paradémicas da lâmina foliar de *T. micrantha*. Também foram realizados testes histoquímicos com objetivo de localizar os constituintes químicos em secções transversais da lâmina foliar e testes fitoquímicos objetivando identificar e avaliar a presença de compostos químicos da espécie vegetal, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes. Além disso, foram realizadas análises da composição química elementar dos cristais. A avaliação microscópica óptica de luz e de polarização viabilizaram a identificação e caracterização anatômicas da lâmina foliar e pecíolo, revelando caracteres de diagnose como organização dos feixes vasculares na nervura central, do mesofilo, da epiderme bem como presença de cristais do tipo drusa. Por meio das técnicas histoquímicas evidenciou-se a presença de compostos fenólicos, alcaloides, compostos lipofílicos, óleos essenciais, lignina e cristais de oxalato de cálcio. A análise fitoquímica possibilitou a identificação mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, saponinas, derivados cinâmicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e açúcares redutores. O teor médio de oxalato total é considerado muito maior que o teor de oxalato de alimentos diários. A correta caracterização fornece importantes informações anatômicas úteis para o controle de qualidade da droga vegetal e padronização farmacobotânica, uma vez que existe uma variabilidade nos caracteres de diagnose.

Palavras-chave: Cannabaceae. Controle de qualidade. Farmacobotânica.

ABSTRACT

Trema micrantha (L.) Blume belongs to the Cannabaceae family and it is popularly known as pau-de-bugre. In folk medicine its leaves are used in teas indicated for the treatment of syphilis, rheumatism, diabetes and in some cases its use is reported as an antiophidic. Because of this, studies that aim to identify diagnostic characters are necessary in order to contribute to the pharmacobotanical control of the species. This study aimed to identify the anatomical, histochemical and phytochemical characters of *T. micrantha* leaves. For this purpose, usual methods in plant anatomy were used to prepare and analyze, under a light microscope and a polarization microscope, semipermanent slides containing cross sections and parademic sections of the leaf blade of *T. micrantha*. Histochemical tests were also performed in order to locate the chemical components in cross sections of the leaf blade and phytochemical tests in order to identify and evaluate their presence the chemical components of the plant species, identifying groups of relevant secondary metabolites. An optical microscopic evaluation and polarization will make feasible the identification and anatomical characterization of the leaf and petiole laminae, revealing characteristics such as the organization of vascular corrections in the central rib, mesophyll, epidermis as well as the presence of druse crystals. Through histochemical techniques, the presence of phenolic compounds, alkaloids, lipophilic compounds, essential oils, lignin and calcium oxalate crystals was evidenced. Phytochemical analysis enabled the identification of mono and sesquiterpenes, triterpenes and steroids, saponins, cinnamic derivatives, flavonoids, hydrolyzable tannins and reducing sugars. Phytochemical analysis enabled the identification of mono and sesquiterpenes, triterpenes and steroids, saponins, cinnamic derivatives, flavonoids, hydrolyzable tannins and reducing sugars. The average total oxalate content is considered much higher than the oxalate content of daily foods. The correct characterization provides important anatomical information useful for the quality control of the vegetal drug and pharmacobotanical standardization, since there is a variability in the diagnostic characters.

Key words: Cannabaceae. Quality control. Pharmacobotany.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Secções transversais do pecíolo de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	38
Figura 2 –	Aspecto frontal da lâmina foliar de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	39
Figura 3 –	Secções transversais da lâmina foliar de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	40
Figura 4 –	Histoquímica da lâmina foliar de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	41
Figura 5 –	Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na nervura central da lâmina foliar de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.	44
Figura 6 –	Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais no mesofilo da lâmina foliar de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Metodologia utilizada para a análise histoquímica de lâminas foliares.....	35
Quadro 2 –	Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica.....	36
Quadro 3 –	Resultados da prospecção fitoquímica de <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume a partir de extratos metanólicos foliares.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Incidência mensal dos acidentes ofídicos nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil, 2007-2016.....	20
Tabela 2 –	Distribuição dos acidentes ofídicos por ano de ocorrência nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil, 2007 – 2016.....	21
Tabela 3 –	Variáveis epidemiológicas relacionadas aos acidentes por animais peçonhentos ocorridos nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2016.....	22
Tabela 4 –	Variáveis clínicas relacionadas aos acidentes por animais peçonhentos ocorridas nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2016.....	23
Tabela 5 –	Enquadramento taxonômico da espécie <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume.....	30
Tabela 6 –	Concentrações médias (g/100 g de matéria seca) de oxalato nas lâminas foliares de <i>Trema micranta</i> (L.) Blume.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
GSH	Glutationa reduzida
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
LNC	Lista de Notificação de Compulsória
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MP	Microscopia de Polarização
MOL	Microscopia Óptica de Luz
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
NO	Óxido nítrico
PDI	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SOD	Superóxido dismutase
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivo Específico	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS ACIDENTES OFÍDICOS OCORRIDOS NOS ESTADOS DE ALAGOAS E DE PERNAMBUCO	19
2.2	TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO POR SERPENTE	24
2.3	TRATAMENTO COMPLEMENTAR À SOROTERAPIA TRADICIONAL ..	25
2.4	FAMÍLIA CANNABACEAE Martinov	27
2.5	GÊNERO <i>Trema</i> Lour.	28
2.5.1	Estudos Farmacológicos	28
2.5.2	Aspectos químicos	29
2.6	ESPÉCIE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	30
2.6.1	Informações Botânicas e Ecológicas	30
2.6.2	Uso Popular	31
2.6.3	Estudos Farmacológicos	31
2.6.4	Estudos Toxicológicos	31
2.6.5	Aspectos Químicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	33
3.2	CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR	33
3.2.1	Microscopia Óptica de Luz (MOL)	33
3.2.2	Microscopia de Polarização (MP)	34
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.3	CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR	34
3.4	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS FOLIARES	35
3.5	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS ...	37
3.6	DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO EM LÂMINAS FOLIARES	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

4.1	CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR DE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	38
4.1.1	Pecíolo	38
4.1.2	Lâmina Foliar	39
4.2	CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS FOLIARES DE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	42
4.4	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS EM LÂMINAS FOLIARES DE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	43
4.5	DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO EM LÂMINAS FOLIARES DE <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	45
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A – ARTIGO ACEITO NA REVISTA ACTA BRASILIENSIS	57

1 INTRODUÇÃO

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu os acidentes por animais peçonhentos, em particular os acidentes ocasionados por picadas de serpentes, na lista das doenças tropicais negligenciadas e em 2010 o agravo foi incluído na Lista de Notificação de Compulsória (LNC) do Brasil. Isto se deve ao fato do número elevado de notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), sendo acidentes por animais peçonhentos um dos agravos mais notificados (SINAN, 2020). De acordo com o SINAN (2020), no ano de 2019 ocorreram no Brasil 30.482 casos de acidentes por serpentes peçonhentas e deste total 147 foram a óbito pelo agravo notificado.

Existem aproximadamente 3.700 espécies de serpentes em todo o mundo, dessas 17% são consideradas peçonhentas (UETZ; HOSEK, 2018). Vale ressaltar que uma picada de serpente é uma lesão que, em alguns casos, resulta na intoxicação da vítima pela inoculação de peçonha (GOMEZ; DÍAZ, 2015; ALVES *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019).

O Brasil, entre os países da América do Sul, possui rica diversidade de serpentes estando descritas 450 espécies, 76 dessas são peçonhentas (UETZ; HOSEK, 2018) e pertencem às famílias Elapidae (39 espécies) e Viperidae (37 espécies) (COSTA *et al.*, 2019).

A região Nordeste é a campeã de acidentes causados por animais peçonhentos. Geralmente os acidentes ocorrem em sua grande maioria com vítimas da zona rural, do sexo masculino e os membros acometidos são os inferiores, estando geralmente relacionados ao aumento das atividades antrópicas e devido às longas distâncias entre o local de ocorrência do acidente e o local de atendimento médico, as vítimas demoram a receber o tratamento soroterápico específico (MOURA; MOURÃO, 2012).

Administrar o antiveneno de origem animal é a terapia primária mais segura, entretanto ainda não consegue amenizar ou mitigar o dano local proveniente do envenenamento por serpente (ALVES *et al.*, 2019).

Em contrapartida, nessas áreas rurais a medicina tradicional à base de vegetais tem sido historicamente usada para o tratamento do envenenamento por serpentes (SILVA *et al.* 2017). Devido a essa herança etnobotânica, alguns metabólitos secundários isolados das plantas foram testados contra a ação letal da peçonha (FERNANDES *et al.*, 2014 ; MOURA *et al.*, 2016; PICANÇO *et al.*, 2016), no entanto, muitos dos remédios tradicionais à base de plantas ainda não foram testados cientificamente.

Dentre as plantas utilizadas para combater o envenenamento por serpente destaca-se a espécie *Trema micrantha* (L.) Blume (THOMAS, 2001), pertencente à família Cannabaceae Martinov.

Cannabaceae encontra-se amplamente distribuída no mundo, ocorrendo em diferentes ecossistemas, incluindo zonas tropicais a temperadas, com exceção da Antártica (YANG *et al.*, 2013; VIANA; GIL, 2018). Representantes desta família podem ser ervas, lianas, arbustos ou árvores com folhas simples ou digitadas, geralmente alternas. Características florais que circunscrevem essa família em Rosales incluem flores unissexuadas, não vistosas, apresentando estames antetépalo e filetes livres, levemente adnatos às tépalas (VIANA; GIL, 2018).

A família inclui espécies de importância econômica, como o cânhamo (*Cannabis sativa* L.) e o lúpulo (*Humulus lupulus* L.). No Brasil, Cannabaceae está representada pelos gêneros *Celtis* L. e *Trema* Lour. (BFG, 2015), os gêneros mais ricos e amplamente distribuídos nas regiões tropicais e quentes (YANG *et al.*, 2013; VIANA; GIL, 2018).

Trema apresenta 14 espécies reconhecidas (VIANA, GIL, 2018). No Brasil ocorre em maior frequência a espécie *T. micrantha* (MACHADO; SILVA, 2019) seguida da espécie *Trema mollis* (Willd.) relatada no trabalho de Miquel (1853) e no Re flora (2020).

T. micrantha pode ser facilmente reconhecida dentre as espécies da flora pelo porte arbóreo ou arbustivo, apresentando folhas simples, alternas, com margens serreadas. Suas inflorescências são cimeiras axilares e curtas, com flores discretas, de esverdeadas a cremes. No Brasil, ocorre em todas as regiões e domínios fitogeográficos (VIANA; GIL, 2018).

O uso de *T. micrantha* na medicina tradicional gera questionamentos referente a segurança e eficácia da matéria vegetal, bem como a sua efetividade frente a ação antiofídica devendo ser realizadas pesquisas que comprovem esse uso popular, buscando caracterizar e avaliar os princípios ativos levando a uma padronização e posterior elaboração de novos medicamentos.

Devido a isso, estudos anatômicos dessa planta medicinal permitem a identificação segura e correta para uma possível padronização botânica. Estudos histoquímicos e fitoquímicos se fazem essenciais pelo grande poder terapêutico dos vegetais, fornecendo informações das estruturas de armazenamento de componentes bioquímicos responsáveis pelas atividades terapêuticas e identificando seus princípios ativos.

Portanto, este trabalho teve por objetivo realizar uma caracterização anatômica, histoquímica e fitoquímica de folhas de *Trema micrantha* (L.) Blume utilizada como antiofídica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a anatomia, histoquímica e fitoquímica de folhas de *Trema micrantha* (L.) Blume, espécie utilizada como antiofídica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização anatômica das folhas de *T. micrantha*;
- Histolocalizar os metabólitos secundários na lâmina foliar de *T. micrantha*;
- Identificar através da fitoquímica os metabólitos secundários em extratos foliares de *T. micrantha*;
- Determinar a composição química elementar dos cristais;
- Quantificar o teor de ácido oxálico em extratos foliares de *T. micrantha*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DOS ACIDENTES OFÍDICOS OCORRIDOS NOS ESTADOS DE ALAGOAS E DE PERNAMBUCO

Os acidentes por animais peçonhentos constituem um sério problema de saúde negligenciada, especialmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta (WHO, 2007; OLIVEIRA; WEN; SIFUENTES, 2009; CHIPPAUX, 2017; RORIS *et al.*, 2018). Dentre os animais peçonhentos, as serpentes são responsáveis pela ocorrência da maioria dos acidentes, muitas vezes, provocando graves envenenamentos e/ou mortes (BARBOSA, 2015). Lima, Campos e Ribeiro (2009) relataram que anualmente em todo mundo ocorrem 5 milhões de acidentes com serpentes peçonhentas, resultando em 2,5 milhões de casos de envenenamento, 125.000 mortes e, provavelmente, três vezes esse número de vítimas permanentes.

No Brasil, anualmente é notificado aproximadamente 25.000 casos de acidentes causados por serpentes peçonhentas, com uma taxa de letalidade de 0,4% (SINAN, 2018). As maiores incidências foram registradas nas regiões sudeste (28%), norte (27%) e nordeste (24%) do país (BARBOSA, 2015; BARBOSA; MEDEIROS; COSTA, 2015). Contudo, é questionado a precisão desses dados, uma vez que pode ocorrer subnotificações, além disso pode ocorrer também a não notificação tanto por questões logísticas como despreparo da equipe que atende esses indivíduos.

No Brasil são registrados nove gêneros de serpentes peçonhentas reconhecidas como: *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus* e *Leptomicrurus* e devido a manifestações semelhantes e tratamento com o mesmo antiveneno, os envenenamentos dos primeiros dois gêneros são classificados como botrópico (LE MOS *et al.*, 2009; BARBOSA, 2015; BARBOSA; MEDEIROS; COSTA, 2015). *Bothrops* é o gênero responsável por 86,9% dos casos, 8,7% são causadas por *Crotalus*, 3,6% pelo gênero *Lachesis* e 0,8% pelo gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus* (MELGAREJO, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Nas vítimas os efeitos clínicos variam de acordo com a espécie e o tipo de veneno, podendo causar efeitos locais (dor, edema, sangramento, dentre outras) e sistêmicos (cefaleia, vômitos, dor abdominal, hipotensão, alterações na coagulação sanguínea, hemorragias, dentre outras) (BARBOSA; MEDEIROS; COSTA, 2015).

O Ministério da Saúde (MS) no Brasil, motivado pela importância destes acidentes criou na Década de 1980 o Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos e a partir de 1993, e instituiu a notificação compulsória deste agravo no Sistema de Informações

de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2009; SINAN, 2018). Estas medidas podem subsidiar pesquisas e contribuir para o entendimento da dinâmica desse tipo de agravo, gerando assim importantes ações de vigilância em saúde.

De acordo com os registros do SINAN, no período de 2007 a 2019, foram notificados 4.287 acidentes ofídicos no Estado de Alagoas e 10.464 casos no Estado de Pernambuco. O ano de maior ocorrência em Alagoas foi em 2009 (382 casos) apresentando maiores incidências nos meses de março e junho, enquanto em Pernambuco foi o ano de 2016 (1.003 casos) destacando os meses de abril a julho (Tabela 1).

Tabela 1. Incidência mensal de acidentes ofídicos nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2019.

Incidência mensais de acidentes ônicos nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil, 2007-2019														
Ano acidente		Mês												
		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
Alagoas	2007	18	17	20	41	24	34	29	38	30	21	18	30	320
	2008	23	24	32	36	40	35	32	27	23	34	30	16	352
	2009	27	26	47	49	38	27	41	27	33	32	17	18	382
	2010	26	28	36	32	43	34	29	29	31	29	19	23	359
	2011	17	28	30	22	31	26	27	26	23	28	20	26	304
	2012	20	20	36	21	30	24	36	22	23	17	26	13	288
	2013	20	10	28	31	33	34	30	28	22	27	23	25	311
	2014	16	26	28	28	39	30	28	26	22	21	20	16	300
	2015	13	23	24	25	39	34	34	23	37	24	28	24	328
	2016	34	22	30	32	45	32	32	15	26	27	29	13	337
	2017	25	25	29	40	35	30	23	32	20	25	23	27	334
	2018	26	15	21	31	25	29	24	35	30	30	13	23	302
	2019	34	35	40	35	31	32	35	29	34	26	24	15	370
TOTAL		299	299	401	423	453	401	400	357	354	341	290	269	4.287
Pernambuco	2007	47	60	94	65	67	80	83	70	56	41	51	47	761
	2008	61	59	78	83	76	74	79	63	54	41	20	37	725
	2009	62	59	80	63	83	71	73	89	76	65	59	35	815
	2010	74	87	74	93	76	61	47	54	42	54	38	49	749
	2011	83	52	106	108	99	89	72	47	74	62	63	51	906
	2012	60	78	64	68	89	66	53	44	42	50	54	30	698
	2013	54	44	61	66	63	49	50	66	43	43	34	30	603
	2014	37	46	63	69	76	47	44	57	52	55	49	49	644
	2015	52	42	49	86	105	81	58	101	94	73	78	49	868
	2016	90	78	93	93	111	88	75	95	93	53	75	59	1.003
	2017	81	56	80	89	100	75	59	74	64	73	63	34	848
	2018	46	70	102	88	115	73	66	74	59	51	51	60	855
	2019	74	111	107	104	118	89	75	68	68	81	48	46	989
TOTAL		821	842	1.051	1.075	1.178	943	834	902	817	742	683	576	10.464

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net (Dados atualizados em janeiro de 2020).

A maioria dos acidentes (31,16% em Alagoas e 32,09% em Pernambuco) foram ocasionados pelo gênero *Bothrops* e por serpentes não peçonhentas (31,67% em Alagoas e 17,49% em Pernambuco), seguidos dos gêneros *Crotalus* (8,32%, Alagoas e 12,71%, Pernambuco), *Micrurus* (3,3% em Alagoas e 3,18% em Pernambuco) e *Lachesis* (0,68% em Alagoas e 0,47% em Pernambuco) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos acidentes ofídicos por ano de ocorrência nos estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2019.

	Ano de ocorrência	Gêneros										Não Peçonhentos		Total	
		Em branco		Bothrops		Crotalus		Micrurus		Lachesis		n	%	N	%
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
Alagoas	2007	70	1,6	116	2,73	20	0,46	7	0,16	1	0,02	106	2,48	320	7,45
	2008	111	2,6	120	2,8	33	0,77	9	0,21	2	0,04	77	1,79	352	8,21
	2009	94	2,2	125	2,9	30	0,71	14	0,3	5	0,12	114	2,66	382	8,89
	2010	76	1,82	115	2,69	25	0,58	15	0,34	-	-	128	2,98	359	8,41
	2011	54	1,28	94	2,19	16	0,37	9	0,21	4	0,1	127	2,96	304	7,11
	2012	70	1,6	83	1,9	14	0,32	12	0,31	1	0,02	108	2,53	288	6,68
	2013	58	1,37	101	2,36	22	0,51	13	0,3	1	0,02	116	2,73	311	7,29
	2014	87	2,03	80	1,87	25	0,58	10	0,23	3	0,07	95	2,21	300	6,99
	2015	86	2,0	99	2,3	37	0,87	11	0,25	-	-	95	2,21	328	7,63
	2016	89	2,07	106	2,48	37	0,87	8	0,19	1	0,02	96	2,23	337	7,86
	2017	86	2,0	105	2,45	39	0,91	8	0,19	4	0,1	92	2,14	334	7,79
	2018	74	1,7	90	2,1	27	0,63	13	0,3	3	0,07	95	2,21	302	7,01
	2019	111	2,6	102	2,39	32	0,74	12	0,31	4	0,1	109	2,54	370	8,68
	TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100
Pernambuco	2007	206	1,96	317	3,025	105	1,00	24	0,22	7	0,065	102	0,97	761	7,24
	2008	176	1,68	297	2,835	119	1,13	18	0,17	6	0,055	109	1,04	725	6,91
	2009	234	2,23	350	3,34	112	1,07	17	0,16	1	0,01	101	0,96	815	7,77
	2010	248	2,38	323	3,08	81	0,775	16	0,15	4	0,035	77	0,73	749	7,15
	2011	345	3,29	307	2,93	119	1,135	25	0,24	4	0,035	106	1,01	906	8,64
	2012	297	2,84	217	2,07	60	0,57	32	0,31	3	0,03	89	0,86	698	6,68
	2013	236	2,26	145	1,38	68	0,64	27	0,25	2	0,02	125	1,19	603	5,74
	2014	272	2,59	131	1,25	90	0,87	27	0,25	3	0,03	121	1,16	644	6,15
	2015	320	3,06	237	2,27	92	0,88	21	0,21	3	0,03	195	1,87	868	8,32
	2016	337	3,23	289	2,77	114	1,09	34	0,33	5	0,045	224	2,145	1003	9,61
	2017	301	2,88	220	2,11	117	1,12	29	0,28	7	0,065	174	1,665	848	8,12
	2018	254	2,43	248	2,38	121	1,16	26	0,25	2	0,02	204	1,95	855	8,19
	2019	337	3,23	277	2,65	132	1,27	37	0,36	3	0,03	203	1,94	989	9,48
	TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net (Dados atualizados em janeiro de 2020).

A frequência dos acidentes em homens foi superior (73,5% em Alagoas e 71,85% em Pernambuco) à das mulheres (26,5% em Alagoas e 28,13% em Pernambuco), com a faixa etária mais atingida entre 20 a 39 anos (37,03% em Alagoas 34,41% e em Pernambuco) (TAB. 3). Em relação ao grau de instrução para a maioria das vítimas (93,63% em Alagoas e 92,9% em Pernambuco) não foi informado (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis epidemiológicas relacionadas aos acidentes por animais peçonhentos ocorridos nos Estados de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2019.

Alagoas e Pernambuco, Brasil, 2007-2010.																
	Variável	Gêneros										Não		Total		
		Em branco		Bothrops		Crotalus		Micrurus		Lachesis		Peçonhento				
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Alagoas	Em branco	-	-	-	-	1	0,02	-	-	-	-	1	0,02	2	0,04	
	<1 Ano	14	0,32	5	0,12	6	0,13	-	-	-	-	13	0,3	38	0,87	
	01-4	40	0,93	29	0,67	14	0,32	7	0,17	-	-	55	1,28	145	3,37	
	05-09	75	1,74	56	1,3	26	0,6	5	0,12	1	0,02	76	1,77	239	5,55	
	10/14	89	2,08	112	2,61	29	0,68	10	0,25	1	0,02	116	2,7	357	8,34	
	15-19	130	3,04	148	3,45	32	0,75	10	0,25	4	0,08	169	3,94	493	11,51	
	20-39	385	8,98	482	11,25	120	2,8	64	1,49	10	0,25	526	12,26	1587	37,03	
	40-59	252	5,88	368	8,58	92	2,15	30	0,69	10	0,25	295	6,88	1047	24,43	
	60-64	28	0,66	65	1,52	16	0,38	8	0,19	2	0,04	46	1,09	165	3,88	
	65-69	24	0,56	29	0,68	9	0,21	4	0,08	-	-	33	0,77	99	2,3	
	70-79	20	0,47	34	0,79	11	0,26	3	0,06	1	0,02	25	0,6	94	2,2	
	80 e +	9	0,21	8	0,19	1	0,02	-	-	-	-	3	0,06	21	0,48	
	TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100	
	Sexo	Em branco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Masculino	739	17,24	1088	25,38	249	5,8	106	2,48	24	0,56	945	22,04	3151	73,5
		Feminino	327	7,63	248	5,78	108	2,52	35	0,82	5	0,12	413	9,63	1136	26,5
		TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100
Escolaridade	Em branco	985	22,98	1283	29,92	327	7,62	133	3,11	29	0,68	1257	29,32	4009	93,63	
	Nenhum ano concluído	81	1,89	53	1,24	30	0,7	8	0,19	-	-	101	2,35	273	6,37	
	TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100	
Pernambuco	Em branco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<1 Ano	42	0,40	47	0,44	21	0,20	6	0,05	-	-	31	0,29	147	1,38	
	01-4	124	1,18	73	0,69	48	0,45	18	0,17	2	0,02	90	0,86	355	3,37	
	05-09	215	2,06	202	1,93	86	0,82	16	0,15	-	-	140	1,33	659	6,29	
	10/14	334	3,19	287	2,74	113	1,08	19	0,18	5	0,05	192	1,83	950	9,07	
	15-19	399	3,82	334	3,19	141	1,35	30	0,29	2	0,02	211	2,02	1117	10,69	
	20-39	1263	12,07	1115	10,65	451	4,32	137	1,31	19	0,18	615	5,88	3600	34,41	
	40-59	857	8,19	863	8,25	324	3,09	78	0,76	15	0,13	385	3,68	2522	24,10	
	60-64	115	1,09	145	1,39	55	0,53	9	0,08	2	0,02	62	0,59	388	3,7	
	65-69	89	0,86	132	1,27	36	0,35	6	0,05	3	0,03	48	0,46	314	3,02	
	70-79	97	0,93	126	1,21	48	0,46	12	0,12	2	0,02	44	0,43	329	3,17	
	80 e +	28	0,27	34	0,33	7	0,06	2	0,02	-	-	12	0,12	83	0,8	
	TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100	
	Sexo	Em branco	-	-	1	0,01	-	-	-	-	-	-	1	0,01	2	0,02
		Masculino	2431	23,24	2579	24,64	1029	9,84	239	2,29	42	0,40	1198	11,44	7518	71,85
		Feminino	1132	10,82	778	7,44	301	2,87	94	0,89	8	0,07	631	6,04	2944	28,13
		TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100
Escolaridade	Em branco	3323	31,76	3166	30,25	1228	11,73	304	2,90	48	0,45	1654	15,81	9723	92,9	
	Nenhum ano concluído	240	2,3	192	1,84	102	0,98	29	0,28	2	0,02	176	1,68	741	7,1	
	TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100	

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net (Dados atualizados em janeiro de 2020).

A maior parte das vítimas (32,44% em Alagoas e 31,65% em Pernambuco) foi atendida no hospital dentro das 3 primeiras horas após o acidente, entretanto, houve um número significativo (3,05% em Alagoas e 4,15% em Pernambuco) que foi atendida tardiamente 24h ou mais após o acidente (TAB. 4). A maioria dos casos foi classificado como leve (61,52% em Alagoas e 61,45% em Pernambuco), seguido de moderado (25,81% em Alagoas e 21,77% em Pernambuco) (Tabela 4). A maioria dos casos com quadro clínico grave foram provocados pelo gênero *Bothrops* (2,57% em Alagoas e 3,57% em Pernambuco) (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis clínicas relacionadas aos acidentes por animais peçonhentos ocorridas no estado de Alagoas e Pernambuco, Brasil. 2007-2019.

Pernambuco, Brasil, 2007-2019.																
Variável Clínica		Gêneros														
		Em branco		Bothrops		Crotalus		Micrurus		Lachesis		Não Peçonhenta		Total		
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	
Alagoas	Tempo picada/atendimento	Em branco	190	4,43	112	2,61	43	1,00	27	0,62	3	0,06	182	4,24	557	12,96
		0 a 1 horas	301	7,02	293	6,83	87	2,02	45	1,05	7	0,18	325	7,58	1058	24,68
		1 a 3 horas	296	6,91	509	11,87	97	2,26	43	1,01	13	0,32	432	10,07	1390	32,44
		3 a 6 horas	165	3,85	270	6,29	85	1,98	18	0,42	4	0,08	268	6,25	810	18,87
		6 a 12 horas	47	1,09	70	1,64	20	0,47	5	0,12	2	0,04	71	1,66	215	5,02
		12 a 24 horas	29	0,68	46	1,08	16	0,38	2	0,05	-	-	34	0,79	127	2,98
		24 e + horas	38	0,89	36	0,84	9	0,21	1	0,03	-	-	46	1,08	130	3,05
		TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100
Alagoas	Classificação Final	Em branco	174	4,06	55	1,28	16	0,37	5	0,12	4	0,08	36	0,83	290	6,74
		Leve	748	17,45	411	9,58	135	3,15	31	0,72	7	0,18	1305	30,44	2637	61,52
		Moderado	129	3,01	760	17,73	148	3,45	35	0,82	17	0,4	17	0,4	1106	25,81
		Grave	15	0,35	110	2,57	58	1,35	70	1,64	1	0,02	-	-	254	5,93
		TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100
Alagoas	Evolução do caso	Em branco	178	4,16	69	1,61	20	0,46	11	0,26	4	0,08	36	0,83	318	7,4
		Cura	887	20,69	1265	29,51	337	7,86	130	3,04	25	0,6	1321	30,82	3965	92,52
		Óbito	1	0,02	2	0,04	-	-	-	-	-	-	1	0,02	4	0,08
		TOTAL	1066	24,87	1336	31,16	357	8,32	141	3,3	29	0,68	1358	31,67	4287	100
Pernambuco	Tempo picada/atendimento	Em branco	699	6,68	361	3,44	142	1,35	43	0,41	3	0,03	227	2,16	1475	14,07
		0 a 1 horas	899	8,59	589	5,62	319	3,05	92	0,88	8	0,07	490	4,69	2397	22,90
		1 a 3 horas	1034	9,88	1168	11,16	424	4,06	111	1,07	16	0,15	557	5,33	3310	31,65
		3 a 6 horas	496	4,74	729	6,97	220	2,11	58	0,56	16	0,15	326	3,12	1845	17,65
		6 a 12 horas	173	1,65	212	2,03	94	0,89	14	0,13	4	0,04	101	0,96	598	5,70
		12 a 24 horas	111	1,07	151	1,45	73	0,69	8	0,07	1	0,01	62	0,59	406	3,88
		24 e + horas	151	1,45	148	1,42	58	0,56	7	0,06	2	0,02	67	0,64	433	4,15
		TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100

Continua

															Conclusão
Classificação Final	Em branco	456	4,35	302	2,88	83	0,79	27	0,25	3	0,02	98	0,93	969	9,22
	Leve	2501	23,91	1530	14,62	554	5,29	158	1,50	23	0,22	1664	15,91	6430	61,45
	Moderado	501	4,79	1153	11,02	472	4,51	67	0,65	17	0,17	65	0,63	2275	21,77
	Grave	105	1,01	373	3,57	221	2,12	81	0,78	7	0,06	3	0,02	790	7,56
	TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100
Evolução do caso	Em branco	477	4,56	448	4,28	137	1,30	38	0,36	5	0,04	136	1,3	1241	11,84
	Cura	3079	29,44	2886	27,58	1172	11,20	295	2,82	45	0,43	1692	16,17	9169	87,64
	Óbito	7	0,06	24	0,23	21	0,21	-	-	-	-	2	0,02	54	0,52
	TOTAL	3563	34,06	3358	32,09	1330	12,71	333	3,18	50	0,47	1830	17,49	10464	100

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net (Dados atualizados em janeiro de 2020).

A maioria dos casos evoluíram para cura (92,52% em Alagoas e 87,64% em Pernambuco), entretanto, em Alagoas ocorreram dois óbitos e em Pernambuco 24 óbitos causados por espécies do gênero *Bothrops*, em ambos os estados ainda ocorreram obtidos decorrentes de acidentes por *Crotalus*, com Pernambuco apresentando alto índice de acidente (0,21%) se comparado com Alagoas, e obtidos por serpente não peçonhenta (TAB. 4).

Devido a esses dados, os acidentes ofídicos merecem ênfase devido a precocidade do atendimento, de modo que se o uso do antiveneno for necessário, as vítimas acometidas recebam a medicação o mais rápido possível e a peçonha seja neutralizada prontamente.

2.2 TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO POR SERPENTE

Os envenenamentos por serpente comumente são tratados pela administração de antivenenos administrado por via intravenosa. O antiveneno é composto por soros heterólogos monovalentes ou polivalentes, contendo imunoglobulinas derivados de cavalos ou ovelhas, visando a neutralização de toxinas (UPASANI *et al.*, 2017; MOURA *et al.*, 2018).

Em resposta à utilização do antiveneno podem ocorrer reações agudas e, na maioria das vezes, os sintomas são caracterizados por dor de cabeça, febre, náusea, urticária e vômito. Além disso, nos casos mais severos podem ocorrer alterações nos níveis de consciência, anafilaxia sistêmica, cianose e hipotensão (SILVA; RYAN; SILVA, 2015; PRADO, 2017).

O antiveneno deve ser manipulado e utilizado de maneira adequada por profissionais capacitados tornando-se assim a maneira mais eficiente de neutralizar a peçonha da serpente causadora do acidente. Devido a isso, torna-se fundamental a disponibilização do antiveneno

em quantidade suficiente e em locais oportunos, objetivando diminuir ao máximo o tempo decorrente entre o acidente e o atendimento médico especializado (BRASIL, 2019).

A partir de 1986, o Ministério da Saúde passou a adquirir toda a produção de antiveneno dos quatro produtores nacionais, Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil, Fundação Ezequiel Dias e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, distribuindo mensalmente cotas do antiveneno aos estados. Isto ocorre levando em consideração critérios epidemiológicos pré-definidos por meio das notificações de acidentes por animais peçonhentos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2019).

Desde 2016 a produção e distribuição de antiveneno vem ocorrendo de forma reduzida, devido as normas exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) referentes a implementação e certificação de Boas Práticas de Fabricação nos laboratórios. Devido a redução na produção dos antivenenos os quantitativos que foram entregues ao Ministério da Saúde vêm ao longo dos anos sofrendo uma diminuição impactando diretamente no abastecimento da rede de atenção à saúde de todo país (BRASIL, 2019).

Apesar do sucesso do antiveneno, ainda é ineficaz para mitigar o dano local induzido pela peçonha da serpente (ALVES *et al.*, 2019) tornando-se necessário procurar diferentes inibidores de peçonhas, sintéticos ou naturais. Sabe-se que o único tratamento oficialmente eficaz para neutralizar a peçonha é a utilização do antiveneno, entretanto o uso de plantas medicinais para cura desses acidentes é comumente empregado por diversas populações como forma complementar à soroterapia tradicional (UPASANI *et al.*, 2017).

2.3 TRATAMENTO COMPLEMENTAR À SOROTERAPIA TRADICIONAL

A busca por um antídoto eficaz contra os venenos de serpentes tem sido longa. Com a distribuição precária e as dificuldades de acesso encontradas, as populações se veem obrigadas a buscar alternativas terapêuticas para curar as enfermidades provenientes de envenenamento por serpente, geralmente buscando o campo da fitoterapia (CARDOSO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2018).

Estudos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PDI) motivados, em parte, pela descoberta de potentes substâncias mais eficazes derivadas de plantas, constitui em um dos grandes interesses da indústria farmacêutica, principalmente aqueles que se detém em buscar substâncias com estruturas moleculares mais complexas e difíceis de serem obtidas por processos sintéticos (WANDERLEY, 2012).

Plantas medicinais são bastante utilizadas em acidentes ofídicos (VILAR; FERRI; CHEN-CHEN, 2011), incluindo aplicação tópica de folhas de plantas – suco, pasta, etc. –, mastigação de folhas e partes de plantas; e beber extratos ou decocções de plantas, principalmente por populações de regiões onde o acesso à soroterapia é deficitário ou inexistente (UPASANI *et al.*, 2017).

Somente na década de 1970, do século XX, o tema mereceu devida atenção nos meios científicos (MORS, 1991; MARTZ, 1992). Neste sentido, várias espécies de plantas consideradas popularmente como antiofídicas têm sido estudadas com o intuito de validar o conhecimento tradicional: *Anacardium humile* A.St.-Hil. (COSTA, 2010); *Annona crassiflora* Mart. (VILAR; FERRI; CHEN-CHEN, 2011); *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (FERREIRA, 2011); *Aniba fragrans* Ducke (MOURA *et al.*, 2018); *Bredemeyera floribunda* Willd (TSCHINKEL *et al.*, 2019); entre outras e caracterizar substâncias biologicamente ativas capazes de inibir diversos efeitos locais e sistêmicos provocados pelos venenos de serpentes.

Os extratos vegetais podem apresentar diferentes componentes químicos, como por exemplo alcaloides, flavonoides, ligninas, taninos, triterpenos os quais têm a capacidade de promover a inibição da peçonha de serpentes, dessa forma atuam como inibidores enzimáticos ou inativadores químicos interagindo diretamente com macromoléculas alvo (MORS *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2019).

Neste sentido, um grande número de extratos e seus compostos isolados têm sido testados, demonstrando, pelo menos em estudos *in vitro*, sua capacidade de inibir frente às atividades biológicas induzidas pelos envenenamentos (MOURA *et al.*, 2018).

De um modo geral, com raras exceções, a fitoterapia antiveneno no meio científico está baseada em dados que superestimam a capacidade antiofídica presente nos extratos vegetais (MOURA, 2016), havendo necessidade de uma avaliação crítica de sua real eficácia, formulando e utilizando protocolos que simulem o uso tradicional, o que se torna de extrema importância quando se pensa na produção de um fitoterápico que possa ser utilizado como um coadjuvante à soroterapia convencional (MOURA; MOURÃO, 2012).

Inúmeros são os trabalhos em que são atribuídos aos vegetais, atividades de antiveneno, mas estudos bem conduzidos, que fundamentem essas indicações, ainda continuam extremamente escassos na literatura (VILAR *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2018).

Dentre as plantas medicinais utilizadas como antiofídicas, destacam-se algumas espécies da família Cannabaceae (THOMAS, 2001).

2.4 FAMÍLIA CANNABACEAE Martinov

A família Cannabaceae Martinov compreende plantas de hábito arbóreo, arbustivo ereto ou escandentes ou herbáceo. Apresentam ramos armados ou inermes, retos ou em zigue-zague. As folhas são alternas ou raramente opostas com margens crenadas, crenuladas, denteadas, serreadas, serrilhadas ou raramente inteiras. Possui inflorescências ou flores pistiladas isoladas. Os frutos são do tipo drupas, sâmaras ou aquênios (MACHADO *et al.*, 2019).

A família encontra-se inserida na ordem Rosales e historicamente seus representantes estiveram associados as famílias Moraceae, Urticaceae e Ulmaceae (APG IV, 2016). Os gêneros *Cannabis* L. e *Humulus* L. foram incluídos em Cannabaceae por Kubitzki (1993) devido ao fato de serem ervas com frutos do tipo aquênio, esses gêneros estão distribuídos nas regiões temperadas do hemisfério norte. Todzia (1993) incluiu na família Ulmaceae 18 gêneros e cerca de 100 espécies de árvores ou arbustos com frutos do tipo drupa ou sâmara. Posteriormente, baseando-se em estudos filogenéticos, morfológicos e químicos, foram transferidos oito gêneros da subfamília Celtidoideae (Ulmaceae) para Cannabaceae (GIANNASI, 1978; WIEGREFE *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 2013).

Cannabaceae, na atual circunscrição, inclui 109 espécies em 10 gêneros: *Aphananthe* Planch., *Cannabis* L., *Celtis* L., *Chaetachme* Planch., *Gironniera* Gaudich., *Humulus* L., *Lozanella* Greenm., *Parasponia* Miq., *Pteroceltis* Maxim. e *Trema* Lour. distribuídos nas regiões tropicais e temperadas do mundo (YANG *et al.*, 2013; STEVENS, 2015).

Na família destacam-se economicamente a maconha (*Cannabis sativa* L.), é uma das primeiras e mais importantes culturas domésticas de alimentos e fibras, e uma matéria prima cada vez mais importante usada por suas propriedades anestésicas e antipsicóticas (ZUARDI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2018), bem como o lúpulo (*Humulus lupulus* L.) que apresenta inflorescências utilizadas na fabricação de cervejas (ZANOLI; ZAVATTI, 2008) e a fibra do floema de *Pteroceltis tatarinowii* Maxim. única matéria-prima para a fabricação de papel tradicional chinês Xuan (CAO, 1993; ZHANG *et al.*, 2018).

Cannabis e *Humulus* são gêneros exóticos no Brasil, para a família Cannabaceae no país são listados a ocorrência de dois gêneros (*Celtis* e *Trema*) representando seis espécies (*C. brasiliensis* (Gardner) Planch., *C. chichape* (Wedd.) Miq., *C. ehrenbergiana* (Klotzsch) Liebm., *C. iguanaea* (Jacq.) Sarg., *C. orthacanthos* Planch., e *T. micrantha* (L.) Blume), com distribuição em todos os biomas brasileiros. (MACHADO *et al.*, 2019).

2.5 GÊNERO *Trema* Lour.

Trema Lour são plantas de hábito arbóreo ou arbustivo ereto com ramos retos a recurvados, inermes. Apresentam folhas alternas, com bordas serreadas, serrilhadas ou denteadas, da base ao ápice. As inflorescências apresentam brácteas inconspícuas, caducas. Seus representantes apresentam flores estaminadas pediceladas ou pistiladas pediceladas. Os frutos são do tipo drupas, pouco carnosos, arredondados, glabros, alaranjados a vermelhos na maturidade (MACHADO *et al.*, 2019).

O gênero inclui cerca de 14 espécies (*T. cannabina* Lour.; *T. cubense* Urb.; *T. discolor* (Brongniart) Blume; *T. domingensis* Urb.; *T. guineensis* (Schum. et Thonn.) Ficalho; *T. integerrima* (Beurl.) Standl.; *T. lamarckiana* (Roem. & Schult.) Blume; *T. micrantha* (L.) Blume; *T. mollis* (Willd.) Blume; *T. orientalis* (L.) Blume; *T. philippinensis* Elme; *T. strigillosa* Lundell; *T. tomentosa* (Roxb.) H. Hara; *T. tomentosa* var. *viridis* (Planch.) Hewson), seis das quais são citadas para as Américas com distribuição pantropical (YANG *et al.*, 2013; VIANA, GIL, 2018).

Tradicionalmente a única espécie registrada para o Brasil é *Trema micrantha* (L.) Blume (CARAUTA, 1974; VIANA; GIL, 2018; MACHADO; SILVA, 2019), entretanto, Miquel (1853) já havia evidenciado a ocorrência de outra espécie *T. mollis* além de *T. micrantha*.

2.5.1 Estudos Farmacológicos

Cyril *et al.* (2017) analisaram o efeito protetor dos extratos aquosos e etanólicos de *T. guineensis* no fígado de ratos albinos Wistar e mostraram que alterações induzidas por tetracloreto de carbono (CCl₄) em parâmetros bioquímicos como transaminases (aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT), proteínas totais, albumina e gammaglobulinas foram restauradas por pré-tratamento com extratos aquosos e etanólicos de *T. guineensis* e silimarina. Os autores concluíram que o extrato aquoso na dose 200 mg/kg de peso corporal possui uma proteção hepática eficaz idêntica à silimarina.

Kadissoli *et al.* (2019) sugeriram que o extrato de *T. guineensis* impediu significativamente o aumento do peso corporal, pressão arterial, superóxido dismutase (SOD), malondialdeído (MDA), glutatona reduzida (GSH) e óxido nítrico (NO). O extrato também normalizou parâmetros hematológicos, confirmando suas propriedades anti-hipertensivas que protegem contra a hipertensão induzida pelo etanol.

Adjileye *et al.* (2019), em estudo realizado com *T. orientalis* utilizada para controlar a hipertensão, sugeriram que o extrato etanólico de *T. orientalis* exibiu interessante atividade antioxidante, neutralizando ou inibindo a formação de radicais livres e que a presença de ácidos fenólicos e flavonoides contribuiu para a atividade antioxidante dessa planta.

2.5.2 Aspectos químicos

Diversas substâncias têm sido isoladas e identificadas em espécies do gênero. Hemayet *et al.* (2013) em análise fitoquímica do extrato bruto de folhas de *Trema cannabina* Lour., utilizada como antinociceptiva, indicaram a presença de açúcares redutores, taninos, esteroides e alcaloides e demonstraram que os resultados obtidos tendem a sugerir essa atividade antinociceptiva.

Koffi *et al.* (2014), em estudo fitoquímico da planta *T. guineensis*, identificaram polifenóis, alcaloides, esteroides e terpenos presentes nos extratos aquoso e etanólico e flavonoides, saponinas e taninos apenas no extrato aquoso.

Kuo *et al.* (2007) isolaram do extrato metanólico dos galhos de *T. orientalis* oito substâncias: o (-)-ampelopsina F, (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-siringaresinol, trans-N-p-coumaroiltramina, trans-N-pcoumariloctopamina, o ácido trans-4-hidroxicinâmico e 3,5-dimetoxi-4- hidroxifenil-1-O-D-glicopiranosídeo.

Patel e Panchal (2017), em estudo visando o isolamento e identificação de compostos flavonoides por cromatografia em camada delgada (CCD) e outras técnicas espectroscópicas, identificaram nas folhas de *T. orientalis* fitosteroides, triterpenoides, flavonoides, óleo fixo, taninos e carboidratos.

Geetha *et al.* (2019), em análise da planta inteira de *T. orientalis*, observaram que o extrato etéreo de petróleo mostrou a presença de fitoesteróis, triterpenóides, óleos fixos e gorduras, enquanto o extrato metanólico mostrou a presença de taninos e fenólicos, flavonóides e carboidratos, entretanto o extrato de clorofórmio não apresentou fitoconstituintes.

Adjileye *et al.* (2019), em estudo realizado com *T. orientalis* utilizada para controlar a hipertensão, realizaram estudo fitoquímico e avaliaram a atividade antioxidante e identificaram em extratos foliares a presença de flavonoides, taninos, saponinas, óleos essenciais, lignina e glicosídeos cardíacos.

2.6 ESPÉCIE *Trema micrantha* (L.) Blume

2.6.1 Informações Botânicas e Ecológicas

O enquadramento taxonômico da espécie *Trema micrantha* (L.) Blume de acordo com Carl (Karl) Ludwig von Blume, está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Enquadramento taxonômico da espécie *Trema micrantha* (L.) Blume.

ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO	
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht
Ordem	Rosales Bercht. & J. Presl
Família	Cannabaceae Martinov
Gênero	<i>Trema</i> Lour.
Espécie	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume

Fonte: *T. micrantha*, Trópicos, 2016.

T. micrantha é popularmente conhecida como candiúba, candiúva, crindiúva, grandiúva, pau-pólvora, pau-de-bugre, pau-de-vaca, periquiteira, dentre outros (SOUZA; LORENZI, 2008; BRITO; SENNA-VALLE, 2011; GOMES *et al.*, 2019), possui hábito arbóreo, apresenta ramos esverdeados e tricomas geralmente esparsos. As folhas apresentam pecíolo glabro com lâmina foliar membranácea a cartácea, margens serreadas com face adaxial áspera e tricomas curtos esparsos e face abaxial áspera com tricomas curtos. As inflorescências com brácteas e bractéolas acuminadas, pedicelos e flores glabrescentes (MACHADO *et al.*, 2019).

T. micrantha está amplamente distribuída nas Américas (MACHADO *et al.*, 2019). No Brasil, ocorre em todas as regiões e encontra-se distribuída nas matas secundárias da floresta ombrófila densa Atlântica e Amazônica, floresta ombrófila aberta, estacional semidecidual e decidual, cerrado e caatinga (PEDERNEIRAS *et al.*, 2011; MACHADO; SILVA, 2019).

Esta planta é uma das primeiras espécies arbóreas a ocorrer em áreas abandonadas, sobrevivendo a todos os estágios da sucessão secundária e apresentando uma boa adaptação a solos de baixa fertilidade e em terrenos desnudos (PEDERNEIRAS *et al.*, 2011).

2.6.2 Uso Popular

T. micrantha é comumente empregada na recuperação de solos degradados ou após queimadas (VENTURIN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2018). Derivam de sua madeira produtos como celulose e papel, carvão, lenha, além disso esta espécie é utilizada na alimentação animal (forragem), como recurso para fauna, bem como na medicina tradicional (LORENZI, 2000; LORENZI, 2002; MORESSI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

Na medicina tradicional suas cascas são utilizadas para combater aftas (FENNER et al., 2006) e as folhas são utilizadas em chás indicados para o tratamento de sífilis (LORENZI, 2000), reumatismo (LORENZI, 2000; MESSIAS et al., 2015), diabetes (SCHOENFELDER et al., 2006), em lavagens externas indicadas para cicatrização de feridas (ALVES et al., 2008) e para combater o envenenamento ocasionado por picadas de serpentes (THOMAS, 2001).

2.6.3 Estudos Farmacológicos

Estudos *in vivo* utilizando extrato da casca de *T. micrantha* demonstrou a atividade antimalárica (MUÑOZ et al., 2000). Extratos de folhas de *T. micrantha* testados em animais demonstraram atividades analgésicas, antiinflamatórias (BARBERA et al., 1992) e hipoglicêmicas (SCHOENFELDER et al., 2006).

Guzzo (2013), testou os extratos brutos e substâncias puras foliares em ensaios *in vitro* para determinação da atividade citotóxica frente a linhagens tumorais de células leucêmicas U937 e THP-1, obtendo resultados favoráveis.

2.6.4 Estudos Toxicológicos

A toxidez de *T. micrantha* foi caracterizada em intoxicações experimentais em bovinos (TRAVERSO et al., 2004), caprinos (TRAVERSO et al. 2002) e equinos (BANDARRA et al., 2011).

Traverso et al. (2004), em seu experimento caracterizaram as folhas de *Trema micrantha* como tóxicas para bovinos, ocasionando morte em doses a partir de 54g/kg. Quando manipuladas doses iguais ou superiores, quando a planta foi fracionada ou dessecada, não demonstraram toxicidade. A dose tóxica foi superior àquela observada na intoxicação pela mesma planta para caprinos, de 30g/kg (MATOS et al., 2000; TRAVERSO et al., 2002).

No experimento de Bandarra *et al.*, (2011), a dose letal mínima de folhas de *T. micrantha* estabelecida foi de 20g/kg para equinos.

Experimentalmente foi comprovado que um princípio tóxico isolado denominado trematoxina foi citado em *T. tomentosa* e correlacionado também a *T. micrantha*, entretanto sem estrutura química determinada. A trematoxina age principalmente como uma toxina para o fígado e sistema nervoso central (MATOS *et al.*, 2000).

Neste sentido, considerando-se a semelhança dos sinais clínicos em bovinos, caprinos e equinos decorrentes de intoxicações por *T. tomentosa* e *T. micrantha*, é possível que o mesmo princípio tóxico ou semelhante seja comum entre essas espécies (TRAVERSO; DRIEMEIER, 2000; TRAVERSO *et al.*, 2004). Entretanto, nenhum estudo foi encontrado sobre a correlação estrutural de qualquer constituinte químico isolado ou mesmo alguma atividade tóxica relatada em *Trema* ssp (MATOS *et al.*, 2000).

2.6.5 Aspectos Químicos

Frimmel *et al.*, (2000) isolaram vitexina, paprazina, sitosterol e o ácido ursacólico dos ramos e folhas de *T. micrantha*. De acordo com estes autores o isolamento de vitexina indica que este composto, bem como seus derivados são marcadores químicos do gênero *Trema*, enquanto paprazina foi identificada pela primeira vez no gênero.

Guzzo (2013), em estudo fitoquímico, isolou os flavonoides C-glicosilados 2''-O-xilosilvitexina e 2'''-oxilosilorientina da fração hidrometanólica das folhas e o ácido palmítico, palmitato de etila e estearato de etila foram obtidos predominantemente dos extratos hexânico e em acetato de etila.

Investigação recente abordou, principalmente, testes de histolocalização em tricomas de *T. micrantha*, nos quais foram identificados compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, lipídios e polissacarídeos (NASCIMENTO, 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na comunidade Tururu, Janga – PE. Para a coleta do material botânico foram seguidas as especificações de Albuquerque *et al.* (2010) que recomendam coletar amostras vegetais floridas e/ou frutificadas, sem danos mecânicos ou causados por insetos e fungos.

A identificação da espécie por sua vez foi realizada mediante procedimentos usuais da botânica, registro fotográfico da espécie, utilização de chave de identificação (SOUZA; LORENZI, 2008) consultas a sites, banco de dados e bibliografias especializadas. Posteriormente a esta etapa, as exsicatas foram encaminhadas ao herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA para herborização e identificação, sob o número de tombamento 91800.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR

3.2.1 Microscopia Óptica de Luz (MOL)

Para a caracterização anatômica foliar, o material botânico foi fixado em FAA50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940). Foram obtidas à mão livre secções transversais de lâminas foliares e de pecíolos utilizando lâminas de aço e como suporte a medula do embaúba (*Cecropia* sp.). Além das secções transversais, foram realizadas secções paradérmicas, tanto da face adaxial como abaxial da lâmina foliar. Posteriormente, para clarificação, as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Em seguida os cortes foram lavados com água destilada, as secções transversais foram coradas com safranina e azul de Astra (BUKATSCH, 1972) e as secções paradérmicas foram coradas segundo técnica descrita por Krauter, (1985), com azul de metileno. Após estes procedimentos foram montadas lâminas semipermanentes, de acordo com os procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951).

A análise de todas as lâminas foi realizada em imagens processadas em software (LAS EZ), obtidas por câmera digital (Leica ICC50 W) acoplada a um microscópio de luz (Leica DM750M).

3.2.2 Microscopia de Polarização (MP)

Lâminas histológicas semipermanentes foram preparadas com secções transversais de lâminas foliares obtidas de modo semelhante ao destinado para a análise em MOL. Para a análise das lâminas foi utilizado microscópio de polarização (Leica DM750M), acoplado com câmera digital (Leica ICC50W), através da qual foram obtidas imagens processadas em software (LAS EZ).

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de lâminas foliares foram fixadas em solução Karnovsky por no mínimo 2h. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com tampão de sódio 1M, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 0,5% e novamente lavadas com tampão cacodilato 1 M e em seguida lavadas com água destilada. Após desidratação em série etílica (30,70, 90, e 100%), o material foi submetido à secagem no ponto crítico (Bal-Tec CPD 030). Em seguida, as amostras foram montadas em stubbs, metalizadas com ouro (HADDAD *et al.*, 1998) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN – Mira 3) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Física - UFPE.

3.3 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR

Foram realizados testes histoquímicos em secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, usando lâmina comum de barbear e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como suporte (JOHANSEN, 1940). Em seguida foram utilizados reagentes específicos, listados no Quadro 1, para localização dos metabólitos secundários na lâmina foliar.

Quadro 1 – Metodologia utilizada para a análise histoquímica de lâminas foliares.

SUBSTÂNCIAS	REAGENTE	COLORAÇÃO/ REAÇÃO	REFERÊNCIAS
Alcaloides	Dragendorff	Laranja	BRASIL, 2010
Amido	Lugol	Azul negro/ Marrom escuro	JOHANSEN, 1940
Compostos fenólicos	cloreto férrico (10%)	Vermelho	JOHANSEN, 1940
Compostos lipofílicos	Sudan III	Vermelho alaranjado	SASS, 1951
Cristais de oxalato de cálcio ou carbonato de cálcio	ácido clorídrico (10%)	Dissolução ou não dos cristais	JENSEN, 1962
Lignina	floroglucinol	Vermelho	JOHANSEN, 1940
Óleos essenciais e oleoresinas	Nadi	Azul / Rosa	DAVID; CARDE, 1964
Taninos	vanilina clorídrica	Rosa/ Vermelho	MACE; HOWELL, 1974
Triterpenos e esteroides	tricloreto de antimônio	Vermelho alaranjado	MACE; BELL; STIPANOVIC, 1974

Fonte: Autor próprio.

Foram realizados controles em paralelo aos testes histoquímicos e preparadas lâminas semipermanentes contendo secções transversais (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951). As lâminas contendo os cortes histológicos para a caracterização histoquímica foram analisadas em imagens utilizando o software Toup View Image, obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (Alltion).

3.4 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS FOLIARES

Para o perfil fitoquímico o material vegetal foi caracterizado através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a partir de extratos metanólicos por decocção. As análises foram efetuadas empregando-se como fase estacionária placas prontas de gel de sílica (Macherey-Nagel) e fases móveis variadas e reveladores adequados obedecendo a um protocolo desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPE apoiado em estudos de Harborne (1984) e Wagner (1996) com modificações (RANDAU, 2004) (QUADRO 1). Além disso, foram utilizados alguns reagentes cromogênicos, também apresentados no quadro 2, para evidenciar a presença de metabólitos secundários.

Quadro 2 – Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados na prospecção fitoquímica.

METABÓLITOS	SISTEMA ELUENTE	PROPORÇÃO	REVELADOR	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO	PADRÃO
Alcaloides	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:11:11:27	Dragendorff	Visível	Atropina
Mono Sesquiterpenos	Tol ⁴ : AcOEt ¹	97:3	Vanilina sulfúrica + Δ	Visível	Carvacrol
Triterpenos e Esteroides	Tol ⁴ : AcOEt ¹	90:10	Liebermann/Burchard + Δ	Visível	β-sitosterol
Saponinas	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:11:11:27	Vanilina sulfúrica + Δ	Visível	Saponina
Antraquinonas	AcOEt ¹ : Metanol: H ₂ O	100:13,5:10	KOH 10%	Visível e Ultra-violeta (365nm)	Senosídeo
Cumarinas	Tol ⁴ : Éter ¹ saturado com A.Ac ³ 10%	1:1	KOH 5%	Ultra-violeta (365nm)	Cumarina
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:11:11:27	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Verbacosídeo
Derivados cinâmicos	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:3:3:3	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Ácido clorogênico
Flavonoides	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:3:3:3	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Rutina
Taninos condensados	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:3:3:3	Vanilina clorídrica	Visível	Catequina
Taninos hidrolisáveis	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:3:3:3	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Ácido elágico
Açúcares redutores	AcOEt ¹ : A. F:A.Ac ³ : H ₂ O	100:11:11:27	Timol 0,5% EtOH ⁵ + Δ	Visível	Glicose

A.Ac³: Ácido acético; Ac⁶: acetona; AcOEt¹: acetato de etila; AF²: ácido fórmico; EtOH⁵: etanol; NEU: ácido etilborilaminoéster 1% em álcool metílico; Tol⁴: Tolueno.

3.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS

Secções transversais de lâminas foliares foram processadas de acordo com a metodologia descrita para as análises em MEV. Microanálises químicas por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) foram realizadas com detector de raios-X acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (TESCAN – Mira 3).

3.6 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO EM LÂMINAS FOLIARES

Lâminas foliares foram secas em estufa a 60°C, por 48 h, e trituradas em liquidificador. Em seguida foram pesados 0,5 g do pó das lâminas foliares em erlenmeyers de 100 mL e acrescentados 50 mL de ácido clorídrico 2 M (oxalato total) ou água destilada (oxalato solúvel). Os erlenmeyers foram colocados em banho-maria com agitação, a 80°C, por 30 min.

Posteriormente os extratos foram filtrados e diluídos com 50 mL de água destilada (AL-WAHSH; WU; LIEBMAN, 2012). De cada extrato foram tomadas alíquotas de 25 mL para titulações com solução de permanganato de potássio 0,02 M padronizado contra oxalato de sódio. Para acidular o meio dos extratos preparados com água destilada (oxalato solúvel), foram usados 20 mL de ácido sulfúrico 2 M. As titulações (em triplicata) foram realizadas sob aquecimento, a 50°C, e a viragem foi de incolor para róseo persistente, por mais de 30s. As concentrações de oxalato foram expressas em g/100 g de matéria seca.

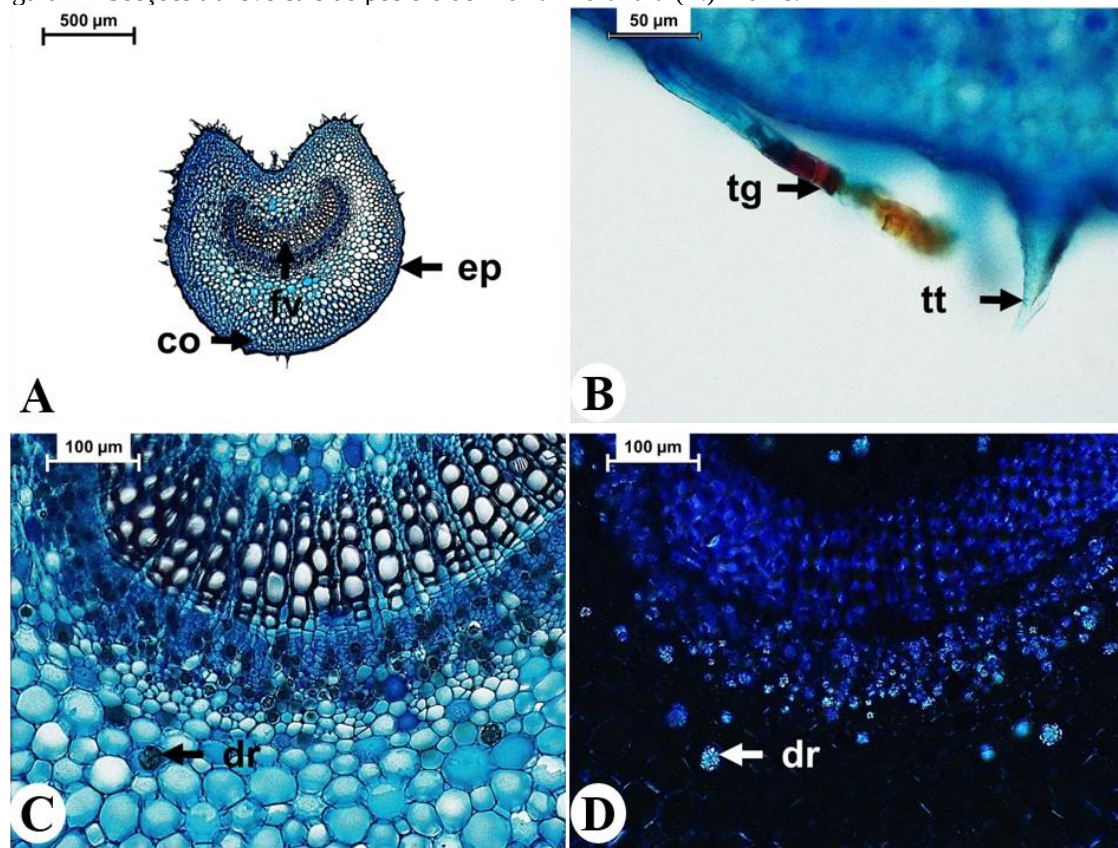
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR DE *Trema micrantha* (L.) Blume

4.1.1 Pecíolo

O pecíolo de *T. micrantha*, em secção transversal, apresenta formato côncavo-convexo, com duas projeções na face adaxial (FIGURA 1A). A epiderme é unisseriada e recoberta por uma camada de cutícula levemente espessa (FIGURA 1A). Observam-se dois tipos de tricomas: tectores cônicos e glandulares filiformes (FIGURA 1B). Adjacente à epiderme situa-se o colênquima angular, com cerca de duas a cinco camadas (FIGURA 1A). Na região central parenquimática encontra-se um feixe vascular colateral, disposto na forma de arco (FIGURA 1A). Drusas são encontradas no parênquima e no floema (FIGURAS 1C e 1D).

Figura 1 – Secções transversais do pecíolo de *Trema micrantha* (L.) Blume.



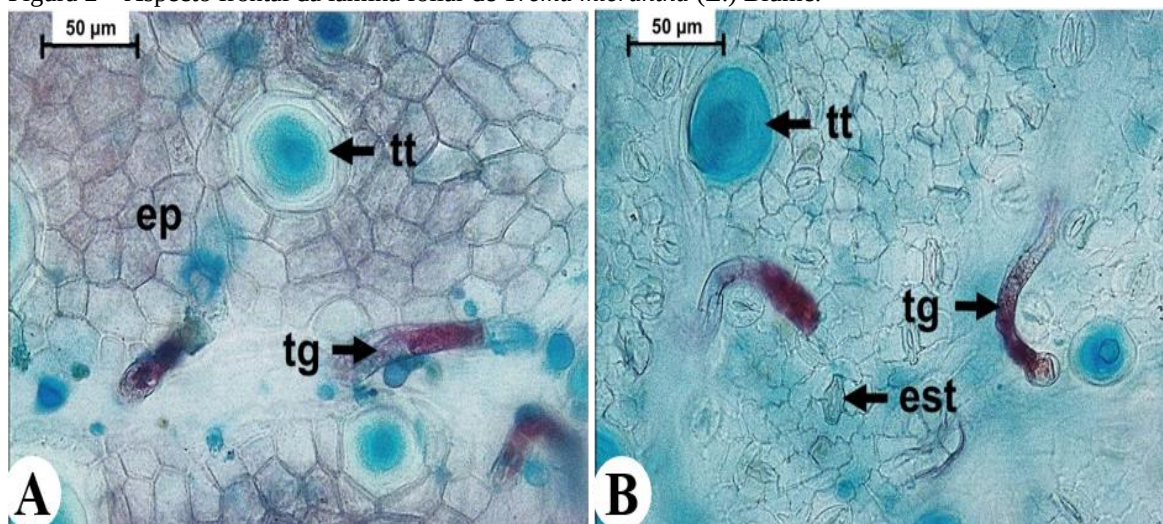
Aspecto geral; B. tricomas; C: detalhe do feixe vascular e drusas; D: detalhe das drusas na microscopia de polarização. co: colênquima; dr: drusa; ep: epiderme; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; fv: feixe vascular. Fonte: Autor próprio.

4.1.2 Lâmina Foliar

A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta células de contorno reto na face adaxial (FIGURA 2A) e de contorno sinuoso na face abaxial (FIGURA 2B). É classificada como hipoestomática, com estômatos anomocíticos (FIGURA 2B). No gênero *Celtis* L. ocorrem folhas anfiestomáticas, como em *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (PILATI; SOUZA, 2006).

Em ambas as faces observam-se tricomas tectores e glandulares (FIGURAS 2A e 2B), semelhantes aos encontrados no pecíolo. Nascimento (2017) demonstrou diferentes tipos de tricomas glandulares em espécies de Cannabaceae e Ulmaceae e afirmou que essas diferenças apoiam os estudos que alteraram a circunscrição de *Celtis* e *Trema*, incluindo-os em Cannabaceae.

Figura 2 – Aspecto frontal da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume.



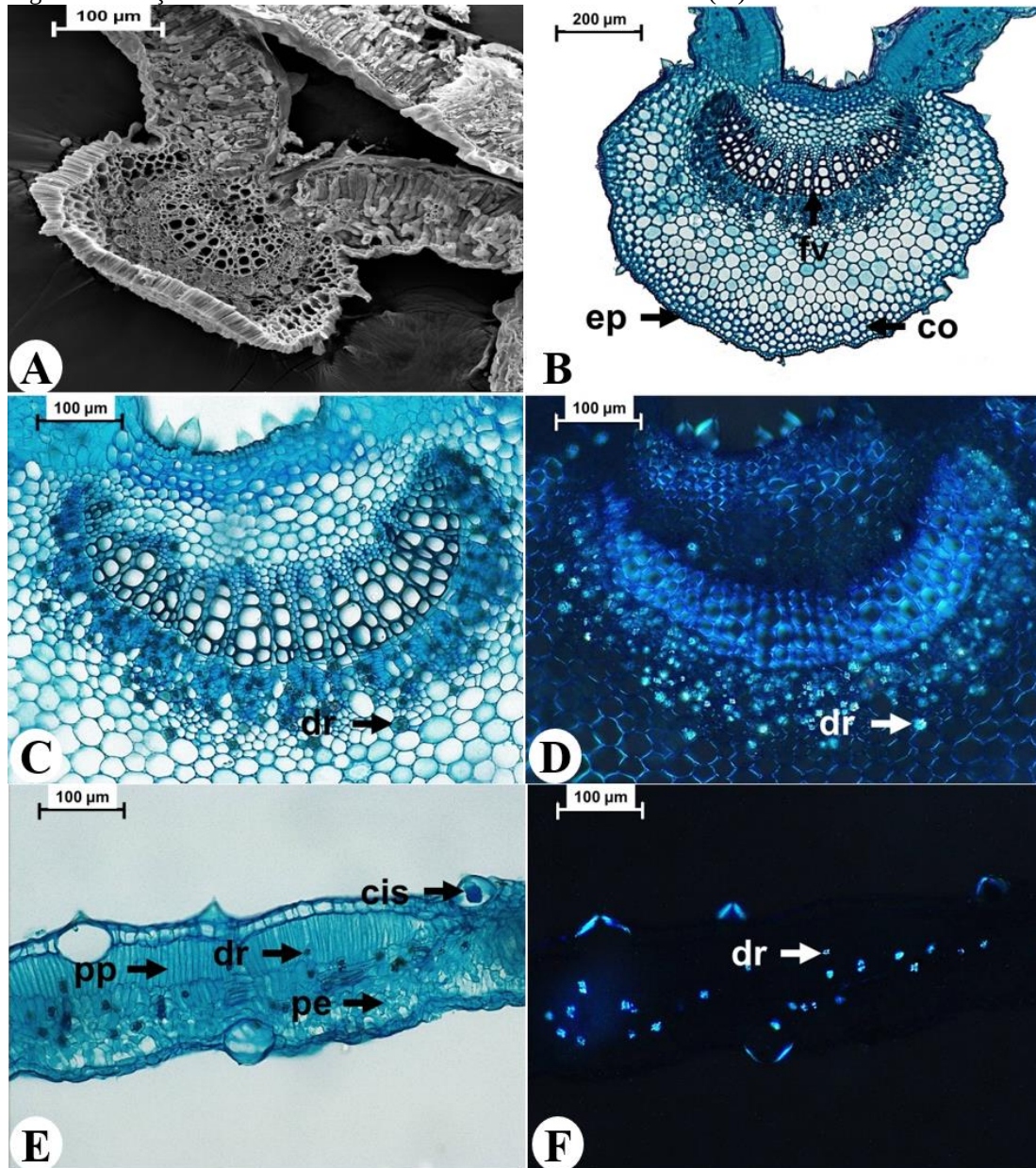
A: face adaxial; B: face abaxial. ep: epiderme; est: estomas, tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.
Fonte: Autor próprio.

Em secção transversal, a nervura central, sob MEV e MOL, exhibe um contorno plano-convexo (3A e 3B). A epiderme unisseriada, recoberta por cutícula levemente espessa (FIGURA 3B). O colênquima angular possui cerca de quatro camadas (FIGURA 3B). Assim como no pecíolo, o feixe vascular é colateral, disposto na forma de um arco (FIGURA 3B). Drusas são encontradas no parênquima e no floema (FIGURAS 3C e 3D).

O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico composto de uma a duas camadas de células e parênquima esponjoso com pequenos espaços intercelulares (FIGURA 3E). Fermino Junior *et al.* (2004) encontraram duas a três camadas de parênquima paliçádico em *T. micrantha*. Observa-se a presença de cristólitos na base dos tricomas tectores, tanto na face

adaxial quanto na face abaxial (FIGURA 3E). Drusas são encontradas em todo o mesofilo (FIGURAS 3 E e 3F). Cristais de oxalato de cálcio são o tipo mais comum em plantas, enquanto que os cristais de carbonato de cálcio são encontrados em poucas famílias, como Moraceae, Urticaceae e Acanthaceae (FRANCESCHI; HORNER, 1980). Poucos estudos descrevem a presença dos dois tipos de cristais em uma mesma espécie (FAHN, 1990), como verificado no presente estudo para *T. micrantha*.

Figura 3 – Secções transversais da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume.



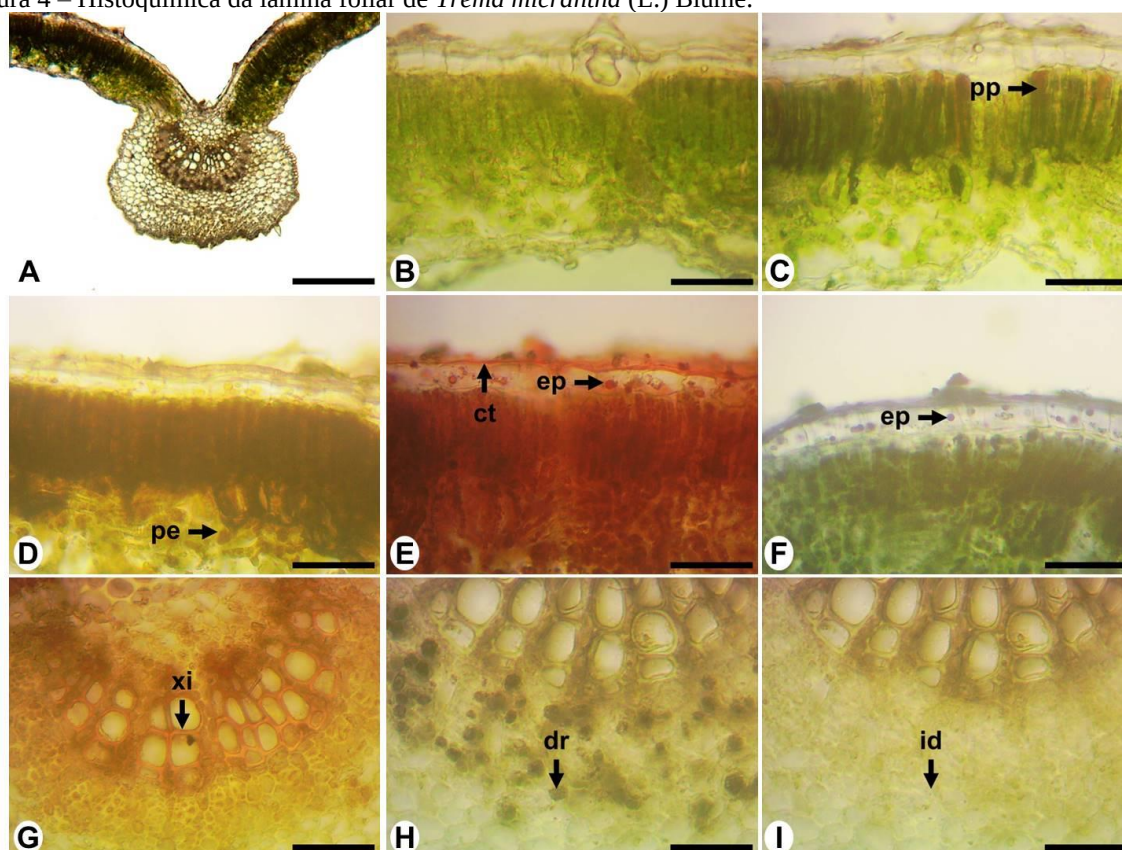
A: microscopia eletrônica de varredura; A, B e E: microscopia óptica de luz; D e F: microscopia de polarização. A e B: nervura central; C: detalhe do feixe vascular e drusas; D: detalhe de drusas na nervura central em microscopia de polarização; E: mesofilo; F: detalhe de drusas no mesofilo em microscopia de polarização. co: colênquima; cis: cistólito; dr: drusa; ep: epiderme; est: estomas; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçada; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

Fonte: Autor próprio.

4.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DA LÂMINA FOLIAR DE *Trema micrantha* (L.) Blume

A Figura 4 apresenta os resultados da histoquímica, mostrando em secção transversal a lâmina foliar sem adição de nenhum reagente nas Figuras 4A e 4B. Compostos fenólicos foram encontrados no parênquima paliçádico (FIGURA 4C) e alcaloides no parênquima esponjoso (FIGURA 4D). Compostos lipofílicos foram observados na cutícula e na epiderme (FIGURA 4E). Possivelmente os compostos lipofílicos são óleos essenciais, os quais foram encontrados também na epiderme (FIGURA 4F). A lignina foi evidenciada no xilema (FIGURA 4G). O teste com ácido clorídrico (10%) demonstrou que as drusas são de oxalato de cálcio, após a dissolução das mesmas, sem ocorrer formação de bolhas (FIGURAS 4H e 4I). Os testes para amido, taninos, triptenos e esteroides foram negativos. Flavonoides e terpenos têm sido identificados nas folhas de *T. orientalis* (PATEL; PANCHAL, 2017).

Figura 4 – Histoquímica da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume.



A, B: controle; C: Dicromato de potássio (10%); D: Dragendorff; E: SudanIII; F: Nadi; G: Floroglucinol; H, I: Ácido clorídrico (10%). ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; id: idioblast; pp: parênquima paliçada; pe: parênquima esponjoso; xi: xilema.

Fonte: Autor próprio.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS FOLIARES DE *Trema micrantha* (L.) Blume

O Quadro 3 mostra os resultados obtidos após a prospecção fitoquímica de extratos foliares de *Trema micrantha* (L.) Blume.

Quadro 3 – Resultados da prospecção fitoquímica de *Trema micrantha* (L.) Blume a partir de extratos metanólicos foliares.

METABÓLITOS	Extrato foliar
Alcaloides	-
Mono Sesquiterpenos	++
Triterpenos e Esteroides	++
Saponinas	+
Antraquinonas	-
Cumarinas	-
Fenilpropanoglicosídeos	-
Derivados cinâmicos	+
Flavonoides	+++
Taninos condensados	-
Taninos hidrolisáveis	+
Açúcares redutores	+

:- ausência de bandas; +: até duas bandas evidenciadas; ++: duas a cinco bandas evidenciadas; +++: acima de cinco bandas evidenciadas.

Fonte: Autor próprio.

Para *T. micrantha* já foi citado previamente na literatura a presença de flavonoides em estudo fitoquímico da fração hidrometanólica das folhas (GUZZO, 2013). No presente estudo foram evidenciados mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, saponinas, derivados cinâmicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e açúcares redutores.

Hemavet *et al.* (2013), em análise fitoquímica do extrato bruto de folhas de *Trema cannabina* Lour. indicaram a presença de açúcares redutores, taninos, esteróides e alcaloides.

Koffi *et al.* (2014), em análise do extrato aquoso e etanólico de *T. guineensis*, identificaram polifenóis, alcaloides, esteróis e terpenos e evidenciaram apenas no extrato aquoso flavonoides, saponinas e taninos.

Patel e Panchal (2017), identificaram nas folhas de *T. orientalis* fitosteróis, triterpenoides, flavonoides, óleo fixo, taninos e carboidratos.

Geetha *et al.* (2019), em análise da planta inteira de *T. orientalis*, demonstraram que o extrato etéreo de petróleo mostrou a presença de fitoesteróis, triterpenoides, óleos fixos e gorduras, enquanto o extrato metanólico mostrou a presença de taninos e fenólicos, flavonoides e carboidratos, entretanto o extrato de clorofórmio não apresentou fitoconstituintes.

Adjileye *et al.* (2019), em estudo realizado com *T. orientalis* identificaram em extratos foliares a presença de flavonoides, taninos, saponinas, óleos essenciais, lignina e glicosídeos cardíacos.

Alcaloides foram evidenciados na histolocalização desse estudo, entretanto, não foi evidenciado na caracterização fitoquímica. A ausência de alcaloides no extrato metanólico de *T. micrantha* pode ser explicado devido ao tipo de extração, pois, normalmente os alcaloides se encontram em frações ácidas. Embora outros estudos relatem a presença dos alcaloides no gênero, fitoquimicamente ainda não foi relatado para *Trema micrantha*.

4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS EM LÂMINAS FOLIARES DE *Trema micrantha* (L.) Blume

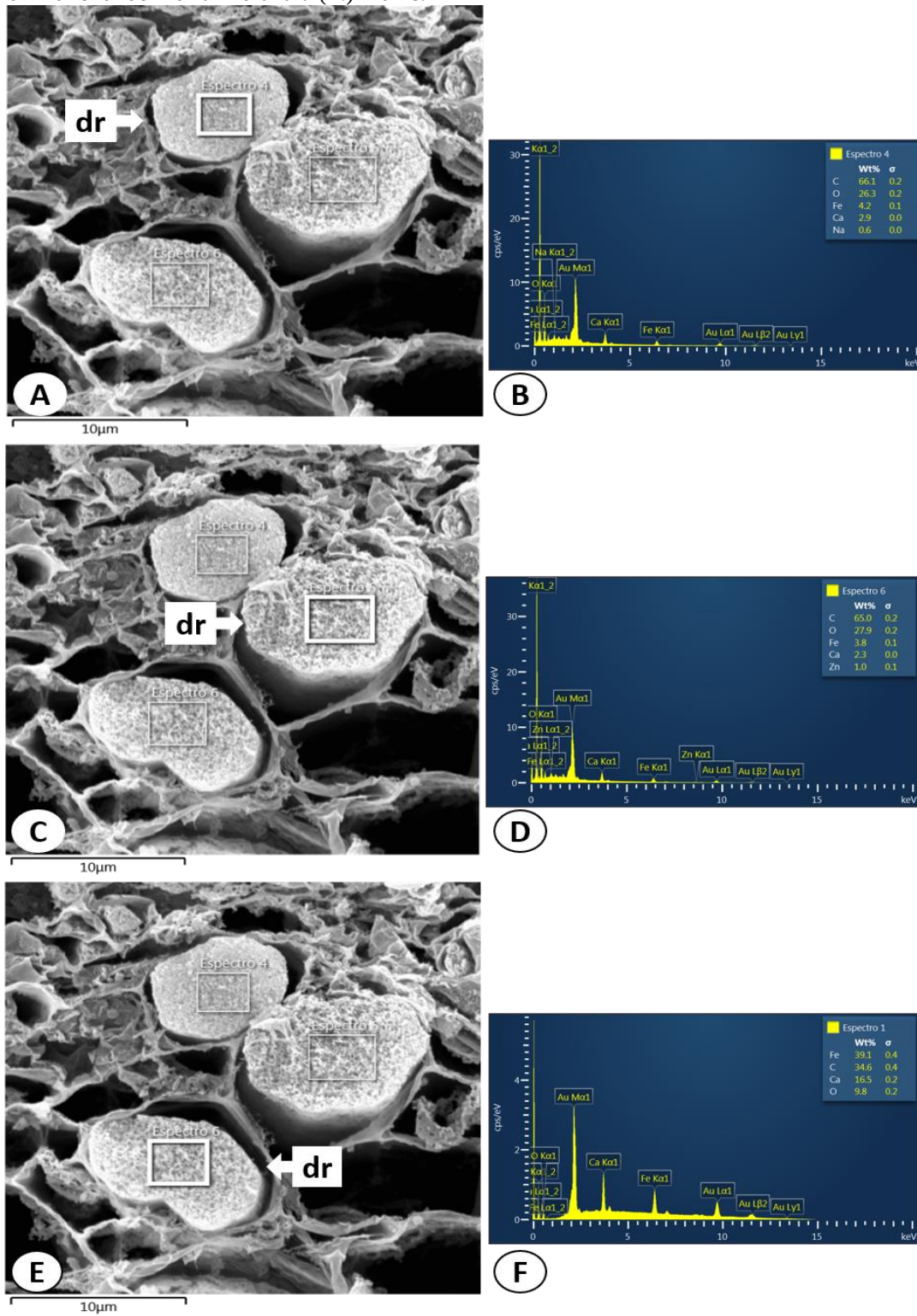
Através das microanálises químicas realizadas por MEV-EDS as drusas estavam presentes na nervura central e no mesofilo de *Trema micrantha* (L.) Blume foi possível identificar picos de absorvância em maioria para cálcio, carbono e oxigênio, confirmando que são formados de oxalato de cálcio (Figuras 5 e 6). Não foram encontradas na literatura microanálises químicas realizadas por MEV-EDS para demonstrar a natureza química dos cristais da espécie estudada.

Os cristais de oxalato de cálcio foram encontrados em todos os organismos dos cinco reinos vivos (NAKATA, 2003). Nas plantas, encontra-se amplamente distribuído na maioria dos tecidos e órgãos (LERSTEN; HORNER, 2006; SÁ *et al.*, 2019a) e pode ser caracterizado como uma característica taxonômica (HORNER *et al.*, 2015).

O ácido oxálico ocorre como ácido livre, como sais solúveis de potássio e de sódio e como sais insolúveis de cálcio, magnésio e ferro (NOONAN; SAVAGE, 1999). Predominantemente, a fração insolúvel é composta por oxalato de cálcio e, em algumas plantas, formam cristais (NAKATA, 2003).

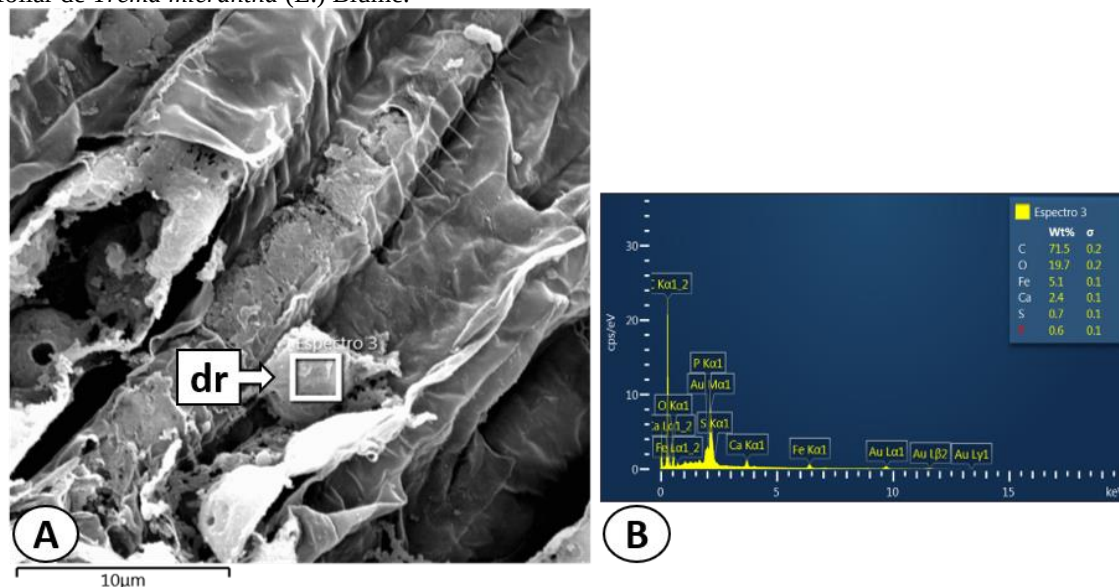
Alguns estudos mostraram que o ácido oxálico é sintetizado em resposta ao aumento de cálcio (ÇALIŞKAN, 2000; KEATES *et al.*, 2000). São atribuídas aos cristais de oxalato de cálcio as funções de captura e reflexão da energia solar, defesa vegetal contra herbivoria, desintoxicação de metais, equilíbrio de íons celulares, regulação osmótica e suporte mecânico de tecidos (FRANCESCHI; HORNER, 1980, FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elemental dos cristais na nervura central da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume.



A, C e E: drusa; B, D e F: difratograma. Abreviaturas: dr: drusa. Fonte: Autor próprio.
Fonte: Autor próprio.

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais no mesofilo da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume.



A, C e E: drusa; B, D e F: difratograma. Abreviaturas: dr: drusa. Fonte: Autor próprio.
Fonte: Autor próprio.

4.5 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO EM LÂMINAS FOLIARES DE *Trema micrantha* (L.) Blume

As concentrações médias de oxalato determinadas nas lâminas foliares de *Trema micrantha* (L.) Blume encontram-se na Tabela 5. As concentrações de oxalatos podem ser encontradas em quantidades que variam de 3 a 80% do peso seco das plantas (NGUYEN; SAVAGE, 2013).

Tabela 6 – Concentrações médias (g/100 g de matéria seca) de oxalato nas lâminas foliares de *Trema micrantha* (L.) Blume.

ESPÉCIE	OXALATO TOTAL	OXALATO SOLÚVEL	OXALATO INSOLÚVEL
<i>Trema micrantha</i>	16,05±0,11	12,57±0,04	3,48

Fonte: Autor próprio.

Os valores encontrados neste estudo são maiores que os teores de oxalato de alimentos diários, como biscoitos (23,7 a 384 mg/100 g de matéria seca), pães (16,5 a 45,9 mg/100 g de matéria seca) (OKOMBO; LIEBMAN, 2010) e massas (20 a 30 mg/100 g de matéria seca) (LIEBMAN; OKOMBO, 2009).

Nguyen e Savage (2013) em estudo determinaram o teor de oxalato total em frutas consumidas na Nova Zelândia e verificaram as maiores concentrações em *Averrhoa carambola* L. (0,4361 g/100 g de matéria seca), *Phyllanthus emblica* L. (7,566 g/100 g de matéria seca) e *Rheum rhabarbarum* L. (0,6402 g/100 g de matéria seca).

Siener *et al.* (2006) analisaram os teores de oxalato total e oxalato solúvel em diferentes partes de espécies de *Amaranthaceae* A. Juss., *Chenopodiaceae* L. e *Polygonaceae* A. Juss. (folhas, caules, raiz e nozes) e determinaram que o maior teor de oxalato foi evidenciado em folhas e caules dessas famílias. Nessas partes, o teor de oxalato total variou de 874 a 1959 mg/100 g de matéria seca e o teor de oxalato solúvel variou de 258 a 1029 mg/100 g de matéria seca.

Sá *et al.* (2019a) realizaram a determinação de oxalato em lâminas foliares através de titulação de duas espécies da família *Annonaceae* Juss e verificaram uma variação no teor de oxalato, sendo que *Annona squamosa* L. ($6,27 \pm 0,24$ g/100 g de matéria seca) apresentou o maior valor de oxalato total e *Annona muricata* L. ($4,65 \pm 0,09$ g/100 g de matéria seca) apresentou o maior valor de oxalato solúvel.

Em estudo realizado com duas espécies da família *Oxalidaceae* R. Br. foi determinado o teor de oxalato através da titulação, onde evidenciaram que *Averrhoa carambola* L. (valor total $5,92 \pm 0,47$ g/100 g de matéria seca e valor solúvel $4,87 \pm 0,11$ g/100 g de matéria seca) apresentou o maior valor de oxalato total e solúvel se comparado *Averrhoa bilimbi* L. (valor total $5,45 \pm 0,28$ g/100 g de matéria seca e valor solúvel $3,38 \pm 0,11$ g/100 g de matéria seca) (SÁ *et al.*, 2019b).

Poucos são os estudos que realizaram a determinação de oxalato através de titulação. Na literatura não há trabalhos que evidenciam a concentração de ácido oxálico em lâminas foliares de plantas utilizadas no tratamento do envenenamento por serpente, bem como sobre o teor de ácido oxálico em lâminas foliares de *T. micrantha*.

5 CONCLUSÃO

Esse estudo possibilitou a identificação de parâmetros anatômicos, histoquímicos e fitoquímicos para a diagnose de *Trema micrantha* (L.) Blume. O estudo histoquímico evidenciou o local de acúmulo de metabólitos nas lâminas foliares da espécie investigada os quais ainda não tinham sido descritos para a espécie.

A análise fitoquímica possibilitou a identificação de componentes químicos da espécie, como mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteroides, saponinas, derivados cinâmicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e açúcares redutores. As análises microquímicas confirmaram que os cristais evidenciados na histoquímica são de oxalato de cálcio. O teor médio de oxalato total na espécie é considerado muito maior que o teor de oxalato de alimentos diários.

Portanto, esse estudo contribuiu com a padronização farmacobotânica da espécie estudada e trouxe dados inéditos sobre o conteúdo das lâminas foliares de *T. micrantha*.

REFERÊNCIAS

- ADJILEYE, R. A. A.; AMOUSSA, A. M. O.; LAGNIKA, L. *Trema orientalis* L. and *Dialium guineense* Wild. used to manage hypertension in Bénin: phytochemical study and antioxidant activity. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v.7, n.3, p.43-48, 2019.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L. **Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica**. In.: Métodos e técnicas na pesquisa etnobotânica, Recife, NUPEA, 2010. 559p.
- ALVES, E. M. *et al.* Levantamento Etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.32, n.2, p.651-658, 2008.
- ALVES, N. T. Q. *et al.* Antiophidian activity of *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) root extract on the local effects induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.52, n.1, p.1-8, 2019.
- AL-WAHSH, I. A.; WU, Y.; LIEBMAN, M. A comparison of two extraction methods for food oxalate assessment. **J. Food Res.**, v.1, n.2, p.233-239, 2012.
- APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.181, n.1, p.1-20, 2016.
- BARBERA, R. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineense* (Schum. et Thonn.) Ficalho and *Trema micrantha* Blume extracts in rodents. **Phytotherapy Research**, v.6, n.3, p.146-48, 1992.
- BARBOSA, I. R.; MEDEIROS, W. R.; COSTA, I. C. C. Distribuição espacial dos acidentes por animais peçonhentos no estado do Rio Grande do Norte-Brasil no período de 2001-2010. **Caminhos de Geografia Uberlândia**, v.16, n.53, p.55-64, 2015.
- BARBOSA, I. R. Clinical and epidemiological aspects of accidents caused by venomous animals in the Rio Grande do Norte State. **Rev Ciência Plural**, v.1, n.3, p.2-13, 2015.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, p.1085-1113, 2015.
- BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.
- BRASIL. (2019) **Acidentes por animais peçonhentos**: o que fazer e como evitar. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos> . Acesso em: 12.12.2019.
- BRITO, M. R.; SENNA-VALLE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras**, v.25, n.2, p.363-372, 2011.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.

ÇALIŞKAN, M. The metabolism of oxalic acid. **Turk. J. Zool.**, v.24, p.103-106, 2000.

CAO, T. S. **Xuan Paper of Chin.** China Light Industry, Beijing, 1993, pp. 20-34.

CARDOSO, J. L. C. *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo, Sarvier, 2009. 468p.

CHIPPAUX, J. P. O envenenamento por picada de cobra torna-se novamente uma doença tropical negligenciada! **Toxinas de Veneno Anim Incl Trop Dis**, v.23, n.1, p.38, 2017.

COSTA, T. R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico.** 2010. 80f. Dissertação (mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, RIBEIRÃO PRETO/SP, 2010.

COSTA, M. K. B. *et al.* Snakebite accidents in Rio Grande do Norte state, Brazil: **Epidemiology, health management and influence of the environmental scenario**, v.24, n.4, p.432–441, 2019.

CYRIL, D. G. *et al.* Protective effect of *Trema guineensis* extracts on CCl₄-induced hepatotoxicity. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v.3, Issue 2, p.5-9, 2017.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. **C. R. Acad. Sci. Paris**, v.258, p.1338-1340, 1964.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. 4. ed. Pergamon Press, Oxford, 1990.

FENNER, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.3, 2006.

FERMINO JUNIOR, P. C. P. *et al.* **Espécies pioneiras e climáticas da Floresta Ombrófila Densa: anatomia foliar comparada.** **Insula**, Florianópolis, v.33, p.21-37, 2004.

FERNANDES, F. F. A. *et al.* Counteraction of Bothrops snake venoms by *Combretum leprosum* root extract and arjunolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, n.1, p.552-562, 2014.

FERREIRA, T. L. **Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica.** 2011. 99f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

FEUCHT, W.; SCHMID, P. P. S. Selektiver histochemischer nachweis von flavanen (catechinen) mit *p*-dimethylamino-zimtaldehyd in sprossen einiger obstgeholzi. **Gartenbauwissenschaft**, v.48, p.119-124, 1983.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER JUNIOR H. T. Calcium oxalate crystals in plants. **Botanical Review**, v.46, n.4, p.361-427, 1980.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu Rev. Plant Biol.**, v.56, n.1, p.41-71, 2005.

FRIMMEL, A. E. *et al.* Vitexin, paprazine and terpenoids from *Trema micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.28, p.495-496, 2000.

GEETHA, K. M. *et al.* Preliminary phytochemical investigations and antiepileptic activity of *Trema orientalis* (linn.) extracts. **IJPSR**, v.10, n.8, p.3957-3962, 2019.

GIANNASI, D. E. Generic relationships in the Ulmaceae based on flavonoid chemistry. **Taxon**, v.27, p.331-344, 1978.

GOMEZ, M. A. M.; DIAZ, G. M. G. Accidente ofídico em el departamento de Sucre, Colombia. **NOVA**, v.13, p.39-46, 2015.

GOMES, G. C. *et al.* Environmental and Ecosystem Services, Tree Diversity and Knowledge of Family Farmers. **Floresta e Ambiente**, v.26, n.1, p.2-12, 2019.

GUZZO, R.N. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica de Trema micrantha Blume (Cannabaceae)**. 2013. 70f. Dissertação (mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2013.

HADDAD, A. *et al.* **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

HEMAYET, H. *et al.* Phytochemical Screening and Anti-nociceptive Properties of the Ethanolic Leaf Extract of *Trema cannabina* Lour. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.3, n.1, p.103-108, 2013.

HORNER, H. T. *et al.* Towards uncovering evolution of lineage-specific calcium oxalate crystal patterns in Piperales. **Botany**, v.93, p. 159-169, 2015.

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

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.

KADISSOLI, B. *et al.* Effect of *Trema guineensis* (Celtidaceae) on ethanol-induced hypertension in Wistar rats. **Progress in Medical Sciences**, v.4, n.1, p.9-16, 2019.

KEATES, S. E. *et al.* L-ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**, v.53, p.433-440, 2000.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico em métodos de morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.

KRAUTER, D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. **Mikrokosmos**, v.74, p.231-233, 1985.

KUBITZKI, K. **Cannabaceae**. In: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich (eds), The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering plants. Dicotyledons Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. vol. 7. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993. p. 204–206.

LEMOIS, J. C. *et al.* Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev bras epidemiol.**, v.12, n.1, p.50-59, 2009.

LERSTEN, N. R.; HORNER, H. T. Crystal macropattern development in *Prunus serotina* (Rosaceae, Prunoideae) leaves. **Ann. Bot.**, v.97, p.723-729, 2006.

LIEBMAN, M.; OKOMBO, J. Oxalate content of selected pasta products. **J. Food Comp. Anal.**, v.22, n.3, p.254-256, 2009.

LIMA, A. C. S. F.; CAMPOS, C. E. C.; RIBEIRO, J. R. Perfil epidemiológico de acidentes ofídicos do Estado do Amapá. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.3, p.329-335, 2009.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.1, 368 p.

MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. **Phytophatol.**, v.64, p.1297-1302, 1974.

MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tanin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v.52, p.2423-2426, 1974.

MACHADO, A. F. P.; SILVA, M. F. O. (2019). **Cannabaceae**. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB106894>. Acesso em: 01/fev/2020.

MACHADO, A. F. P. *et al.* Flora da Bahia: Cannabaceae. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.19, p.1-14, 2019.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, p.1131- 1142, 1992.

MATOS, F. J. A. **Plantas Tóxicas** – Estudo de Fitotoxicologia Química de Plantas Brasileiras. Instituto Plantarum, 2000. 256p.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JL, Haddad-Jr V, França FOS, Wen FH, Malaque CMS. **Animais peçonhentos do Brasil**: biologia, clínica e

terapêutica. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 42-70.

MESSIAS, M. C. T. B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MIQUEL, F. A. G. **Ulmaceae**. In: C.F.P. Martius, A.W. Eichler & I. Urban (eds), Flora Brasiliensis. Vol. 4, pars 1. Fleisher, Leipzig, 1853. p. 170–182.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)** [Internet]. [Citado 10 de abril de 2018]. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2007 a 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)** [Internet]. [Citado 03 de fevereiro de 2020]. Casos de acidentes por serpentes em 2019. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas.

MORESSI, M.; PADOVAN, M. P.; PEREIRA, Z. V. Seed bank as indicator of restoration in multistrata agroforestry systems in southwestern of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Árvore**, v.38, n.6, p.1073-1083, 2014.

MORS, W. B. Plants against snake-bites. **Memória Instituto Oswaldo Cruz.**, v.2, p.193, 1991.

MORS, W. B. *et al.* Plant natural products active against snakebite the molecular approach. **Phytochemistry**, v.55, p. 627- 642, 2000.

MOURA, V. M.; MOURÃO, R. H. V. Aspectos do ofidismo no Brasil e plantas medicinais utilizadas como complemento à soroterapia. **Scientia Amazonia**, v.1, n.3, p.17-26, 2012.

MOURA, V. M. *et al.* The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathyenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.183, p.136-142, 2016.

MOURA, V. M. *et al.* Assessment of the anti-snakebite properties of extracts of *Aniba fragrans* Ducke (Lauraceae) used in folk medicine as complementary treatment in cases of envenomation by *Bothrops atrox*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.213, p.350–358, 2018.

MUÑOZ, V. *et al.* The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene Indian. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, issue 2, p.139-155, 2000.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Sci.**, v.164, p.901-909, 2003.

NASCIMENTO, I. C. **Tricomas secretores em espécies de Cannabaceae e Ulmaceae**. 2017. 79f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

NGUYEN, H. V. H.; SAVAGE, G. P. Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. **J. Food Compost. Anal.**, v.31, p.180-184, 2013.

NOONAN, S.C.; SAVAGE, G.P. Oxalate Content of Foods and Its Effect on Humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.8, p.64-74, 1999.

OKOMBO, J.; LIEBMAN, M. Oxalate content of selected breads and crackers. **J. Food Comp. Anal.**, v.23, n.1, p.118-121, 2010.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos**. In: Cardoso JL, Haddad-Jr V, França FOS, Wen FH, Malaque CMS, editors. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 6-21.

OLIVEIRA, H. F. A. *et al.* Snakebite cases the municipalities of the State of Paraíba, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.46, n.5, p.617-624, 2013.

OLIVEIRA, T. J. F. *et al.* Banco de dementes do solo para uso na recuperação de matas ciliares degradadas na Região Noroeste Fluminense. **Ciência Florestal**, v.28, n.1, p.206-217, 2018.

PATEL, M. R.; PANCHAL, H. S. Isolation and Identification of Flavonoid Compounds in *Trema orientalis* Leaves by Preparative TLC and Various Spectroscopic Techniques. **International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry**, v.6, n.1, p.238-244, 2017.

PEDERNEIRAS, L. C. *et al.* Ulmaceae, Cannabaceae e Urticaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v.62, n.2, p. 299-313, 2011.

PICANÇO, L. C. S. *et al.* Pharmacological activity of *Costus spicatus* in experimental *Bothrops atrox* envenomation. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.10, p.2103-2110, 2016.

PILATI, R.; SOUZA, L. A. D. Morfoanatomia da plântula de *Morfoanatomia da plântula de Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Jacq.) Sarg. (Ulmaceae) (Ulmaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.28, n.1, p.1-6, 2006.

PRADO, N. D. R. **Nanocorpos de Camelídeos como estratégia farmacológica para neutralização de toxinas de *Bothrops jararacussu***. 2017. 87f Tese (doutorado em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017.

RANDAU, K.P. *et al.* Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p.89-96, 2004.

Reflora. (2020). ***Trema mollis***. Disponível em:

<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/BemVindoConsultaPublicaHVConsultar.do?modoConsulta=LISTAGEM&quantidadeResultado=20&d-16544-t=testemunhos&d-16544-p=1&genero=Trema&especie=mollis>. Acesso em: 04/02/2020.

RORIS, K. R. P. S. *et al.* Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. **Rer Soc Bras Med Trop.**, v.51, n.3, p.338-346, 2018.

SÁ, R. D. *et al.* Oxalic acid content and pharmacobotany study of the leaf blades of two species of *Annona* (Annonaceae). **Flora**, v.253, p.10–16, 2019a.

SÁ, R. D. *et al.* Anatomy, histochemistry and oxalic acid content of the leaflets of *Averrhoa bilimbi* and *Averrhoa carambola*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, p.11–16, 2019b.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391p.

SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, T.M.; CITADINI-ZANETTE, V. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **J. Journal of Ethnopharmacology**, v.107, n.3, p.456-59, 2006.

SIENER, R. *et al.* Oxalate contents of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families. **Food Chem.**, v.98, p.220-224, 2006.

SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; SILVA, J. H. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.81, n.3, p.446-452, 2015.

SILVA, T. P. *et al.* Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp.: uma revisão da literatura. **Scientia Amazonia**, v.6, n.2, p.36-57, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Instituto Plantarum. São Paulo, Nova Odessa, 2008

STEVENS, P. F. (2015). **Cannabaceae**. In: Angiosperm Phylogeny Website. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso: 02/02/2020.

THOMAS, M. B. **An analysis of the Pataxó pharmacopoeia of Bahia, Brazil, using an object oriented DATABASE Model**. 2001. 148f. Dissertação (mestrado) – Graduate School of the University of Florida In Partial, 2001.

TODZIA, C. A. **Ulmaceae**. In: K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich (eds), The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering plants. Dicotyledons Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Vol. 7. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993. p. 603–611.

TRAVERSO, S. D.; DRIEMEIER, D. Experimental *Trema micrantha* (Ulmaceae) poisoning in rabbits. **Vet. Human Toxicol**, v.42, n.5, p.301-302, 2000.

TRAVERSO, S. D. *et al.* Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.22, n.4, p.141-147, 2002.

TRAVERSO, S. D. *et al.* Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, n.4, p.211-216, 2004.

TRÓPICOS. (2016). Tropicos.org. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/33300067>. Acesso: 29/01/2020

TSCHINKEL, P. F. S. *et al.* Data on ICP OES and emulsion stability of Bredemeyera floribunda root extract: Medicinal plant used by the Brazilian rural population to treat snakebites. **Data in brief.**, v.24, p.1-9, 2019.

UETZ, P.; HOSEK, J. (2018). The reptile database. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>. Acesso: 02/02/2020.

UPASANI, S. V. *et al.* Ethnomedicinal plants used for snakebite in India: a brief overview. **Integrative Medicine Research**, v.6, p.114-130, 2017.

VENTURIN, N. *et al.* Avaliação nutricional da candiúva (*Trema micrantha* (L.) Blume) em casa de vegetação. **Floresta**, v.29, p.15-26, 1999.

VIANA, P. L.; GIL, A. S. B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Cannabaceae. **Rodriguésia**, v.69, n.1, p.49-51, 2018.

VILAR, J. C.; CARVALHO, C. M. de; FURTADO, M. de F. D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**, v.6, n.1, p.3-36, 2005.

VILAR, J. B.; FERREI, P. H.; CHEN- CHEN, L. Investigação sobre a genotoxicidade de araticum (*Annona crassiflora* Mart. Annonaceae) usando SOS induteste e teste de Ames. **Braz. J. Biol.**, v.71, n.1, 2011.

WANDERLEY, B. M. S. **Atividade antiplasmódica e toxicológica de plantas medicinais usadas popularmente no Brasil: Uma abordagem Etnobotânica**. 2012. 93f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

WIEGREFFE, S. J.; SYSTMA, K. J.; GURIES, R. P. The Ulmaceae, one family or two? Evidence from chloroplast DNA restriction site mapping. **Plant Systematics and Evolution**, v.210, p.249–270, 1998.

WHO. World Health Organization. Rabies and envenomings: a neglected public health issue. Geneva: World Health Organization; Report of a Consultative Meeting, 2007.

YANG, M. *et al.* Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae. *Taxon*, v.62, n.3, p.473–485, 2013.

ZHANG, H. *et al.* Plastome characteristics of Cannabaceae. **Plant Diversity**, v.40, p.127-137, 2018.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.383–396, 2008.

ZUARDI A.W. *et al.* Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.421–429, 2006.

APÊNDICE A – ARTIGO ACEITO NA REVISTA ACTA BRASILIENSIS

Caracterização anatômica e histoquímica de folhas de *Trema micrantha* (L.) Blume

Análise farmacobotânica de *Trema micrantha*

Cledson dos Santos Magalhães^a, Rafaela Damasceno Sá^b, Solma Lúcia Souto Maior de Araújo Baltar^c,

Karina Perrelli Randau^{d*}

a Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, CDU, 50740-521, Recife, PE, Brazil.

<https://orcid.org/0000-0002-2398-4036>

b Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, CDU, 50740-521, Recife, PE, Brazil.

<http://orcid.org/0000-0001-6049-0425>

c Universidade Federal de Alagoas, Av. Manoel Severino Barbosa, S/N, 57309-005, Arapiraca, AL, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-7774-2059>

d Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, CDU, 50740-521, Recife, PE, Brazil.

<http://orcid.org/0000-0002-4486-4420> *krandau@hotmail.com

Resumo

Trema micrantha (L.) Blume, popularmente conhecida como candiúba, pau-pólvora, dentre outros, possui importante utilização na medicina tradicional brasileira. Com o intuito de expandir as informações farmacobotânicas desta espécie, esta pesquisa teve como objetivo realizar a caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *T. micrantha*. Foram realizadas secções transversais de pecíolo e lâmina foliar, além de secções paradérmicas da lâmina foliar. As análises foram conduzidas em microscópico de luz e de polarização. Para a análise histoquímica, foram utilizados diferentes reagentes, de acordo com o metabólito pesquisado. Mediante análise microscópica foi possível identificar as estruturas anatômicas (tricomatos tectores e glandulares, estômatos anomocíticos, drusas, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colaterais) que conferem a diagnose minuciosa da espécie estudada. Através da histoquímica evidenciou-se na lâmina foliar a presença de compostos fenólicos, alcaloides,

compostos lipofílicos, óleos essenciais, lignina e cristais de oxalato de cálcio. Assim sendo, o estudo trouxe dados inéditos sobre a espécie, ampliando os conhecimentos sobre a família Cannabaceae.

Palavras-chave: Cannabaceae, Farmacobotânica, Microscopia.

Anatomic and histochemical characterization of leaves on *Trema micrantha* (L.) Blume

Abstract

Trema micrantha (L.) Blume, popularly known as candiúba, pau-pólvora, among others, has important use in traditional Brazilian medicine. In order to expand the pharmacobotanical information of this species, this research aimed to perform the anatomical and histochemical characterization of *T. micrantha* leaves. Transverse sections of petiole and leaf blade were made, as well as paradermic sections of the leaf blade. The studies were conducted under light and polarized microscopy. For the histochemical analysis, different reagents were used, according to the researched metabolite. Anatomical structures (glandular and non-glandular trichomes, anomocytic stomata, druses, dorsiventral mesophyll, collateral vascular bundles) that provide the detailed diagnosis of the studied species were described. The histochemistry showed the presence of phenolic compounds, alkaloids, lipophilic compounds, essential oils, lignin and calcium oxalate crystals on the leaf blade. Thus, the study brought unpublished data about the species, expanding the knowledge about the Cannabaceae family.

Keywords: Cannabaceae, Microscopy, Pharmacobotany.

Introdução

Trema micrantha (L.) Blume, popularmente conhecida como grandiúva, candiúba, candiúva, crindiúva, pau-pólvora, pau-de-bugre, dentre outros, é uma árvore da família Cannabaceae (Moressi, Padovan, & Pereira, 2014).

A circunscrição desta família tinha sido bastante contestável, já que tradicionalmente seus gêneros eram incluídos em Urticaceae ou Moraceae, ou, mesmo delimitada, confundia-se com o complexo Ulmaceae-Celtidaceae-Cannabaceae (Martins & Pirani, 2009). Entretanto, devido ao acúmulo

de estudos em filogenia (Yang et al., 2013), a circunscrição antes utilizada de Cannabaceae foi ampliada, sendo incluídos na família os gêneros *Celtis* L. e *Trema* Lour., tradicionalmente reconhecidos como membros de Ulmaceae (Martins & Pirani, 2009). Assim, a família Cannabaceae apresenta 10 gêneros e estimativas incluem cerca de 110 espécies (APG IV, 2016). No Brasil ocorrem apenas os gêneros *Celtis*, com cinco espécies, e *Trema*, com uma espécie (Flora do Brasil, 2020).

Nativa do Brasil, *T. micrantha* pode atingir de 1,5-10 m de altura (Viana & Gil, 2018), habitando diferentes comunidades vegetacionais (florestas estacionais, matas ciliares, cerrados e carrascos, bem como em vegetação xerófila, como a Caatinga) (Martins & Pirani, 2009; Flora do Brasil, 2020).

No Brasil, *T. micrantha* é comumente empregada na recuperação de solos degradados ou após queimadas, bem como na medicina tradicional (Lorenzi, 2000; Moressi et al., 2014; Oliveira, Barroso, Andrade, Freitas, & Amim, 2018). Suas folhas são tradicionalmente utilizadas em chás indicados para o tratamento de sífilis, reumatismo (Lorenzi, 2000) e diabetes (Schoenfelder, Cirimbelli, & Citadini-Zanette, 2006). Extratos de folhas de *T. micrantha* testados em animais demonstraram atividades analgésicas, antiinflamatórias (Barbera, Trovato, Rapisarda, & Ragua, 1992) e hipoglicêmicas (Schoenfelder et al., 2006).

Uma investigação mais recente abordou, principalmente, testes de histolocalização em tricomas de *T. micrantha*, nos quais foram identificados compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, lipídios e polissacarídeos (Nascimento, 2017). Estes dados caracterizam que *T. micrantha* tem um grande potencial para exploração medicinal. Desta forma, este estudo objetivou ampliar as informações científicas pouco encontradas na literatura através da caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *T. micrantha*.

Material e Métodos

Folhas expandidas de espécimes adultos de *Trema micrantha* (L.) Blume, situadas entre o terceiro e o quinto nó, foram coletadas na cidade do Janga, precisamente na comunidade do Tururu, Pernambuco, Brasil. Também foi coletado material botânico para confecção de uma exsicata, que foi

depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob número de tombamento nº 88149.

Para a caracterização anatômica, o material foi fixado em FAA50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940). Secções transversais de pecíolo e lâmina foliar foram obtidas à mão livre, usando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material de suporte. Para a lâmina foliar também foram realizadas secções paradérmicas, nas faces adaxial e abaxial. Em seguida, as secções foram submetidas a uma solução de hipoclorito de sódio (50%) para descoloração (Kraus, & Arduin, 1997). Após lavagem em água destilada, as secções transversais foram coradas segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de Astra; as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (Krauter, 1985). Posteriormente, todas as secções foram montadas em lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (Johansen, 1940; Sass, 1951). Para a análise das lâminas foi utilizado microscópio óptico de luz e de polarização (Leica DM750M), acoplado com câmera digital (Leica ICC50W), através da qual foram obtidas imagens processadas em software (LAS EZ).

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas pelo mesmo método usado para a caracterização anatômica. Os seguintes reagentes foram utilizados para indicar a presença dos metabólitos: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos (Johansen, 1940); Dragendorff para alcaloides (Yoder, & Mahlberg, 1976), vanilina clorídrica para taninos (Mace & Howell, 1974); Sudan III para compostos lipofílicos (Sass, 1951); tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides (Mace, Bell, & Stipanovic, 1974); reagente de Nadi para óleos essenciais (David & Carde, 1964), Lugol para amido (Johansen, 1940); floroglucinol para lignina (Johansen, 1940) e ácido clorídrico (10%) para estabelecer a natureza dos cristais (Jensen, 1962). Controles foram realizados em paralelo aos testes histoquímicos e lâminas semipermanentes foram preparadas contendo secções transversais (Johansen, 1940; Sass, 1951). A análise foi conduzida em imagens, usando o software Toup View Image, obtidas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (Alltion).

Resultados e Discussão

O pecíolo de *T. micrantha*, em secção transversal, apresenta formato côncavo-convexo, com duas projeções na face adaxial (Fig. 1A). A epiderme é unisseriada e recoberta por uma camada de cutícula levemente espessa (Fig. 1A). Observam-se dois tipos de tricomas: tectores cônicos com cystólitos na base e glandulares filiformes multicelulares unisseriados (Fig. 1B). Estes tipos de tricomas já foram previamente descritos por Sweitzer (1971) e Adamski e Coelho (2014). Adjacente à epiderme situa-se o colênquima angular, com cerca de duas a cinco camadas (Fig. 1A). Na região central parenquimática encontra-se um feixe vascular colateral, disposto na forma de arco aberto voltado para a face adaxial (Fig. 1A). Drusas são encontradas no parênquima e no floema (Figs 1 C e 1D).

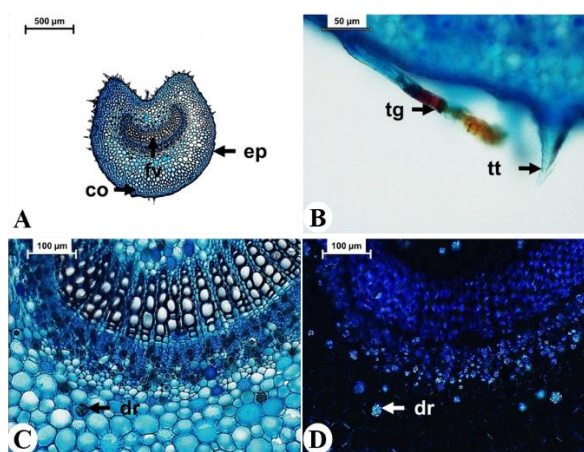


Figura 1 – Secções transversais do pecíolo de *Trema micrantha* (L.) Blume. A: visão geral; B: Detalhe dos tricomas; C-D: detalhe do feixe vascular e drusas em microscopia de luz e de polarização. co: colênquima; dr: drusa; ep: epiderme; fv: feixe vascular; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

A lâmina foliar, em vista frontal, apresenta células de contorno reto a ligeiramente sinuoso na face adaxial (Fig. 2A) e de contorno sinuoso na face abaxial (Fig. 2B). É classificada como hipostomática, com estômatos anomocíticos (Fig. 2B). No gênero *Celtis* ocorrem folhas anfiestomáticas, como em *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Pilati & Souza, 2006). Em ambas as faces observam-se tricomas tectores e glandulares (Figs. 2A and 2B), semelhantes aos encontrados no pecíolo. Nascimento (2017) demonstrou diferentes tipos de tricomas glandulares em espécies de Cannabaceae e

Ulmaceae e afirmou que essas diferenças apoiam os estudos que alteraram a circunscrição de *Celtis* e *Trema*, incluindo-os em Cannabaceae.

Em secção transversal, a nervura central exibe um contorno plano-convexo, apresentando epiderme unisseriada, recoberta por cutícula levemente espessa (Fig. 2C). O colênquima angular subepidérmico possui cerca de quatro camadas (Fig. 2C). Assim como no pecíolo, o feixe vascular é colateral, disposto na forma de um arco (Fig. 2C). Drusas são encontradas no parênquima e no floema (Figs 2D and 2E).

O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico composto de uma a duas camadas de células e parênquima esponjoso com pequenos espaços intercelulares (Fig. 2F). Adamski e Coelho (2014) também reportaram uma a duas camadas de células de parênquima paliçádico, enquanto Fermino Junior, Paulilo, Reis e Santos (2004) encontraram duas a três camadas de parênquima paliçádico em *T. micrantha*. De acordo com Sweitzer (1971), essa diferença pode ocorrer devido à adaptações ambientais. Observa-se a presença de cystólitos na base dos tricomas tectores, tanto na face adaxial quanto na face abaxial (Fig. 2F). Drusas são encontradas em todo o mesofilo (Figs. 2F e 2G). Sweitzer (1971) observaram drusas e cristais prismáticos no mesofilo de *T. micrantha*. Cristais de oxalato de cálcio são o tipo mais comum em plantas, enquanto que os cristais de carbonato de cálcio são encontrados em poucas famílias, como Moraceae, Urticaceae e Acanthaceae (Franceschi & Horner, 1980). Poucos estudos descrevem a presença dos dois tipos de cristais em uma mesma espécie (Fahn, 1990), como verificado no presente estudo para *T. micrantha*.

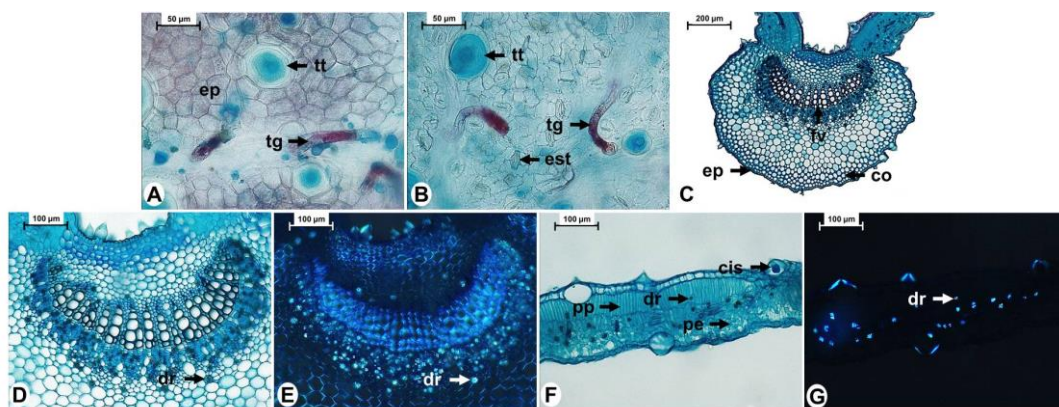


Figure 2 – Secções paradérmicas e transversais da lâmina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume. A: face adaxial; B: face abaxial; C: nervura central; D-E: detalhe do feixe vascular e das drusas em microscopia de luz e de polarização; F: mesofilo; G: detalhe das drusas no mesofilo em microscopia de polarização. co: colênquima; cis: cristólito; dr: drusa; ep: epiderme; est: estômato; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

A Figura apresenta os resultados da histoquímica, mostrando em secção transversal a lâmina foliar sem adição de nenhum reagente nas Figuras 3A e 3B. Compostos fenólicos foram encontrados no parênquima paliçádico (Fig. 3C) e alcaloides no parênquima esponjoso (Fig. 3D). Compostos lipofílicos foram observados na cutícula e na epiderme (Fig. 3E). Possivelmente os compostos lipofílicos são óleos essenciais, os quais foram encontrados também na epiderme (Fig. 3F). A lignina foi evidenciada no xilema (Fig. 3G). O teste com ácido clorídrico (10%) demonstrou que as drusas são de oxalato de cálcio, após a dissolução das mesmas, sem ocorrer formação de bolhas (Figs. 3H and 3I). Os testes para amido, taninos, triptenos e esteroides foram negativos. Flavonoides e terpenos têm sido identificados nas folhas de *T. orientalis* (Patel & Panchal, 2017).

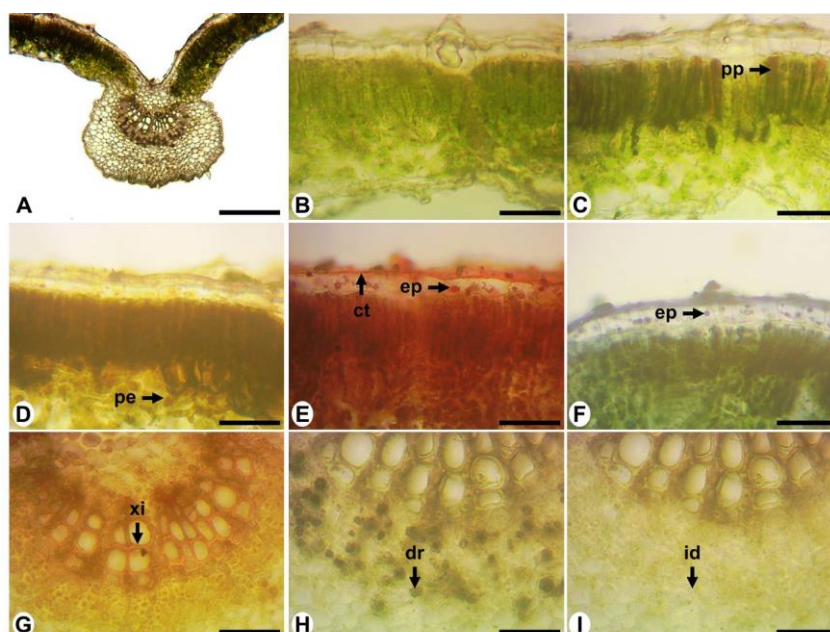


Figure 3 – Histoquímica da lamina foliar de *Trema micrantha* (L.) Blume. A,B: controle; C: dicromato de potássio (10%) (compostos fenólicos); D: Dragendorff (alcaloides); E: Sudan III (compostos

lipofílicos); F. Nadi (óleos essenciais); G: floroglucinol (lignina); H,I: ácido clorídrico (10%) (natureza dos cristais). ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; id: idioblasto; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema; setas indicam reação positiva. Barras: A = 200 µm; B-I = 50 µm.

Conclusões

Os estudos referentes à *Trema micranta* são escassos, mesmo se comparando a espécies de outros gêneros da família Cannabaceae, mostrando a importância do estudo apresentado. As análises microscópicas forneceram importantes informações anatômicas úteis para a padronização farmacobotânica, uma vez que existe uma variabilidade nos caracteres de diagnose. A histoquímica realizada possibilitou a caracterização dos locais de acúmulo dos metabólitos presentes na lâmina foliar da espécie, assim como determinou a natureza dos cristais.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Adamski, J.M. & Coelho G.C. (2008). Biomass, Mineral Accumulation, and Calcium Crystals in *Trema micrantha* (L.) Blume as a Function of Calcium Carbonate Addition. *Journal of Plant Nutrition*, 31:(2), 205-217. doi: 10.1080/01904160701853639
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of Linnean Society*, 181(1), 1-20. doi: 10.1111/boj.12385
- Barbera, R., Trovato, A., Rapisarda, A. & Ragusa, S. (1992). Analgesic and antiinflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineense* (Schum. et Thonn.) Ficalho and *Trema*

- micrantha* Blume extracts in rodents. *Phytotherapy Research*, 6(3), 146-48.
doi.org/10.1002/ptr.2650060309
- Bukatsch, F. (1972). Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, 61, 255.
- David, R. & Carde, J.P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences*, 258, 1338-1340.
- Fahn, A. (1990). Plant Anatomy. (4a ed.). Oxford: Pergamon Press.
- Fermino Junior, P.C.P., Paulilo, M.T.S., Reis, A. & Santos, M. (2004). Espécies pioneiras e climáticas da Floresta Ombrófila Densa: anatomia foliar comparada. *Insula*, Florianópolis, 33, 21-37.
Recuperado de <https://periodicos.ufsc.br/index.php/insula/article/viewFile/20586/18819>
- Franceschi, V.R. & Horner Junior H.T. (1980). Calcium oxalate crystals in plants. *Botanical Review*, 46(4), 361-427. Recuperado de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBBF02860532.pdf>
- Jensen, W.A. (1962). Botanical histochemistry, principles and practice. San Francisco: Freeman.
- Johansen, D.A. (1940). Plant microtechnique. (1a ed.). New York: Mc: Graw Hill.
- Kraus, J.E. & Arduin, M. (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR.
- Krauter, D. (1985). Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für Pflanzenschnitte. *Mikrokosmos*, 74(8), 231-233.
- Lorenzi, H. (2000). Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas (3a ed.). Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum.
- Mace, M.E. & Howell, C.R. (1974). Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 52(11), 2423-2426. doi.org/10.1139/b74-314
- Mace, M.E., Bell, A.A. & Stipanovic, R.D. (1974). Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology*, 64, 1297-1302. doi: 10.1094/Phyto-64-1297

- Machado, A.F.P. & Silva, M.F.O. *Cannabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Recuperado de <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB106887>.
- Martins, E.G.A. & Pirani, J.R. (2009). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Cannabaceae. *Boletim de Botânica*, 27(2), 247-251. doi: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9052.v27i2p247-251>
- Moressi, M., Padovan, M.P. & Pereira, Z.V. (2014). Seed bank as indicator of restoration in multistrata agroforestry systems in southwestern of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Árvore*, 38(6), 1073-1083. doi.org/10.1590/S0100-67622014000600012
- Nascimento, I.C. (2017). *Tricomas secretores em espécies de Cannabaceae e Ulmaceae* (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Oliveira, T.J.F., Barroso, D.G., Andrade, A.G., Freitas, I.L.J. & Amim, R.T. (2018). Banco de dementes do solo para uso na recuperação de matas ciliares degradadas na Região Noroeste Fluminense. *Ciência Florestal*, 28(1), 206-17. doi: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509831653>
- Patel, M.R. & Panchal, H.S. (2017). Isolation and Identification of Flavonoid Compounds in *Trema orientalis* Leaves by Preparative TLC and Various Spectroscopic Techniques. *International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry*. 6(1), 238-244. Recuperado de <http://ijapc.com/volume6-first-issue/v6-i1-32-p-238-244.pdf>
- Pilati, R. & Souza, L.A.D. (2006). Morfoanatomia da plântula de morfoanatomia da plântula de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sarg. (Jacq.) Sarg. (Ulmaceae) (Ulmaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(1), 1-6. doi: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v28i1.1051>
- Sass, J.E. (1951). *Botanical microtechnique*, (2a ed.). Ames: The Iowa State College Press.
- Schoenfelder, T., Cirimbelli, T.M. & Citadini-Zanette, V. (2006). Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 456-59. doi: [10.1016/j.jep.2006.07.027](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.027)
- Sweitzer, E.M. (1971). Comparative anatomy of Ulmaceae. *Journal of the Arnold Arboretum*, 52(4), 523-585. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/pdf/43781743.pdf?seq=1>

- Viana, P.L. & Gil, A.S.B. (2018). Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Cannabaceae. *Rodriguésia*, 69(1), 49-51. doi: 10.1590/2175-7860201869105
- Yang, M.Q., van Velzen, R., Bakker, F.T., Sattariam, A., Li, D.Z. & Yi, T.S. (2013). Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae. *Taxon*, 62(3), 473-85. doi: <https://doi.org/10.12705/623.9>
- Yoder, L.R. & Mahlberg, P.G. (1976). Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *American Journal of Botany*, 63, 1167-73. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1976.tb13202.x>