



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

RAFAELA DAMASCENO SÁ

**CARACTERIZAÇÃO QUALI-QUANTITATIVA DE ÁCIDO OXÁLICO EM
ESPÉCIES MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE
DIABETES**

RECIFE

2018

RAFAELA DAMASCENO SÁ

**CARACTERIZAÇÃO QUALI-QUANTITATIVA DE ÁCIDO OXÁLICO EM
ESPÉCIES MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE
DIABETES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Perrelli
Randau

RECIFE
2018

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Sá, Rafaela Damasceno

Caracterização quali-quantitativa de ácido oxálico em espécies medicinais utilizadas no tratamento de diabetes / Rafaela Damasceno Sá-2018.

144 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Karina Perrelli Randau

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices

1. Diabetes 2. Oxalato de cálcio 3. Plantas medicinais I. Randau, Karina Perrelli (orient.) II. Título

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-204

FOLHA DE APROVAÇÃO

Recife, 07 de março de 2018

Tese de Doutorado deendida e **APROVADA** em 07 de março de 2018, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Karina Perrelli Randau
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMERIA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Flávia Carolina Lins da Silva
(Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Evani de Lemos Araújo
(Faculdade Pernambucana de Saúde)

Assinatura: _____

TERCEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel (Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Assinatura: _____

QUARTA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

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

REITOR(A)

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE-DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. João Policarpo Rodrigues Lima

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luís Vieira de Sá e Francisca
Rodrigues Damasceno Sá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, por me conceder força e determinação para superar os obstáculos que apareceram ao longo da realização desse trabalho.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau, por esses bons anos de convivência diária, pela confiança, amizade, apoio, pelas oportunidades que me deu e por todos os ensinamentos que contribuíram tanto para a minha vida profissional, quanto para a vida pessoal.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca examinadora, por suas valiosas contribuições.

Aos amigos e colegas do grupo de Farmacobotânica do Laboratório de Farmacognosia, pelos bons momentos de convivência, pelas experiências compartilhadas e pela ajuda em alguns experimentos.

Aos amigos de Pernambuco e do PiauÍ pelo incentivo, apoio e pela presença nos bons e maus momentos.

Ao meu namorado Helton, pelo seu amor e cuidado comigo, pelo apoio e por entender os momentos que precisei me afastar para me dedicar a esse trabalho.

A minha família, que me apoia e torce por mim, em especial ao meu irmão Jarbas, que é o melhor irmão do mundo e um ser humano de um coração tão grande e admirável, e aos meus pais, Luís e Francisca, que são meu porto seguro, que nunca pouparam esforços para me proporcionar uma boa educação e uma vida melhor. Obrigada por serem tão presentes, apesar da distância física, por tanto amor e cuidado comigo e por acreditarem que eu conseguiria.

"Entre a raiz e a flor há o tempo."

(Jorge de Lima)

RESUMO

Na busca de aumentar o êxito no tratamento de uma Doença Crônica Não Transmissível, como diabetes, muitos portadores acabam optando pelo uso indiscriminado de plantas medicinais. Muitas destas espécies vegetais são ricas em ácido oxálico, podendo favorecer o comprometimento renal, acentuando, assim, o desajuste metabólico destes pacientes. Este estudo objetivou descrever os caracteres anatômicos das lâminas foliares de oito espécies vegetais utilizadas no Brasil para o tratamento de diabetes e caracterizar a morfologia, a morfometria, identificar os locais de acúmulo dos cristais e a sua composição química elementar, além de quantificar o teor de ácido oxálico. As espécies foram coletadas na Região Metropolitana do Recife. Para o estudo anatômico, foram realizados cortes transversais e paradérmicos, os quais foram analisados em microscopia óptica de luz, de polarização e eletrônica de varredura. Na histoquímica foram empregados diferentes reagentes para evidenciar os metabólitos. A análise microquímica dos cristais foi realizada através de espectroscopia de energia dispersiva com detector de raios-X acoplado a um microscópio eletrônico de varredura. O ácido oxálico foi determinado através de titulometria. A análise microscópica permitiu a identificação dos principais caracteres anatômicos para a diagnose das espécies. Os principais tipos de cristais identificados foram drusas e cristais prismáticos. A histoquímica e a análise microquímica evidenciaram que, nas oito espécies, os cristais são de oxalato de cálcio. O teor médio de oxalato total nas oito espécies variou de 3,67 a 6,35 g/100 g de matéria seca, que é muito maior que o teor de oxalato de alimentos diários. Os resultados obtidos contribuem para a padronização farmacobotânica dessas espécies e trazem novos dados na literatura sobre o teor de ácido oxálico em espécies vegetais de uso medicinal.

Palavras-chave: Doenças Crônicas Não Transmissíveis. Diabetes. Plantas medicinais. Ácido oxálico. Cristais. Oxalato de cálcio.

ABSTRACT

In the search to increase the success in the treatment of Chronic Noncommunicable Diseases (NCDs), such as diabetes, many patients opt for the indiscriminate use of medicinal plants. Many of these vegetal species are rich in oxalic acid, which can promote renal compromise, accentuating, thus, the metabolic imbalance in these patients. This study aimed to describe the anatomical characteristics of leaf blades of eight plant species used in Brazil for the treatment of diabetes and characterize the morphology, morphometry, identify the sites of accumulation of crystals and their elemental chemical composition, besides to quantify the content of oxalic acid. The species were collected in the metropolitan region of Recife. For the anatomical study, transversal and paraderaml sections were performed, which were analyzed in optical light microscopy, polarization microscopy and scanning electron microscopy. In the histochemistry, different reagents were used to show the metabolites. The microchemical analysis of the crystals was performed by dispersive energy spectroscopy with X-ray detector coupled to a scanning electron microscope. Oxalic acid was determined by titration. The microscopic analysis allowed the identification of the main anatomical characters for the diagnosis of the species. The main types of crystals identified were druses and prismatic crystals. Histochemistry and microchemical analysis showed that, in the eight species, the crystals are of calcium oxalate. The average total oxalate content in the eight species ranged from 3.67 to 6.35 g/100 g dry matter, which is much higher than the oxalate content of daily food. The results obtained contribute to the pharmacobotanical standardization of these species and bring new data in the literature about the oxalic acid content in medicinal plants.

Keywords: Chronic Noncommunicable Diseases. Diabetes. Medicinal plants. Oxalic acid. Crystals. Calcium oxalate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L.....	33
Figura 2 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização.....	35
Figura 3 – Secções paradérmicas sob microscopias óptica de luz e de polarização da lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg.....	37
Figura 4 – Secções paradérmicas sob microscopias óptica de luz e de polarização da lâmina foliar de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	38
Figura 5 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização.....	40
Figura 6 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	42
Figura 7 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Averrhoa bilimbi</i> L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização.....	44
Figura 8 – Secções paradérmicas da lâmina foliar de <i>Mangifera indica</i> L. sob microscopia óptica de luz.....	45
Figura 9 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Mangifera indica</i> L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização.....	47
Figura 10 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de <i>Momordica charantia</i> L..	49
Figura 11 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Momordica charantia</i> L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização.....	50
Figura 12 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	52
Figura 13 – Secções transversais da lâmina foliar de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização	54
Figura 14 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L. – parte 1.....	58
Figura 15 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L. – parte 2.....	59

Figura 16 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam. – parte 1.....	60
Figura 17 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam. – parte 2.....	61
Figura 18 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Averrhoa bilimbi</i> L...	63
Figura 19 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Mangifera indica</i> L..	65
Figura 20 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Momordica charantia</i> L.....	67
Figura 21 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	69
Figura 22 – Caracterização histoquímica dos cristais nas lâminas foliares de <i>Annona muricata</i> L., <i>Annona squamosa</i> L., <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam. sob MOL.....	71
Figura 23 – Caracterização histoquímica dos cristais nas lâminas foliares de <i>Averrhoa bilimbi</i> L., <i>Mangifera indica</i> L., <i>Momordica charantia</i> L. e <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels sob MOL.....	72
Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Annona muricata</i> L.....	74
Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Annona squamosa</i> L.....	74
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg.	75
Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.....	75
Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	76
Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Mangifera indica</i> L.....	76
Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Momordica charantia</i> L.....	77
Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies vegetais tombadas no herbário Dárdano de Andrade Lima.....	29
Quadro 2 – Metodologia utilizada para a análise histoquímica de lâminas foliares de espécies utilizadas para o tratamento de diabetes.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização e tamanho dos cristais nas lâminas foliares das espécies <i>Annona muricata</i> L., <i>Annona squamosa</i> L., <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg, <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam., <i>Averrhoa bilimbi</i> L., <i>Mangifera indica</i> L., <i>Momordica charantia</i> L. e <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	56
Tabela 2 – Concentrações médias (g/100 g de matéria seca) de oxalatos nas lâminas foliares das espécies <i>Annona muricata</i> L., <i>Annona squamosa</i> L., <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg, <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam., <i>Averrhoa bilimbi</i> L., <i>Mangifera indica</i> L., <i>Momordica charantia</i> L. e <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOL	Microscopia Óptica de Luz
MP	Microscopia de Polarização
OMS	Organização Mundial de Saúde
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
m	Metro
M	Molaridade
°	Grau
h	Hora
g	Gramma
mL	Mililitro
N	Normalidade
min	Minuto
µm	Micrômetro
L	Litro
s	Segundo
mg	Miligramma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 OXALATO DE CÁLCIO	21
3.2 PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE DIABETES..	22
3.2.1 <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L.	23
3.2.2 <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam....	24
3.2.3 <i>Averrhoa bilimbi</i> L.	25
3.2.4 <i>Mangifera indica</i> L.	26
3.2.5 <i>Momordica charantia</i> L.	27
3.2.6 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES	29
4.2 COLETA E TOMBAMENTO	29
4.3 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA	30
4.3.1 Microscopia Óptica de Luz (MOL)	30
4.3.2 Microscopia de Polarização (MP)	30
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	30
4.4 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA	31
4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS.....	32
4.6 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO	32
4.6.1 Determinação de oxalato total e solúvel	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA	33
5.1.1 <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L.	33
5.1.2 <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam....	36
5.1.3 <i>Averrhoa bilimbi</i> L.	40
5.1.4 <i>Mangifera indica</i> L.	45
5.1.5 <i>Momordica charantia</i> L.	48
5.1.6 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA	57
5.2.1 <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annona squamosa</i> L.	57
5.2.2 <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg e <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam....	60

5.2.3 <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	62
5.2.4 <i>Mangifera indica</i> L.....	64
5.2.5 <i>Momordica charantia</i> L.....	66
5.2.6 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	68
5.2.7 Cristais.....	70
5.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS.....	73
5.4 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO.....	78
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A – ARTIGO 1 ACEITO NA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	105
APÊNDICE B – ARTIGO 2 SUBMETIDO PARA REVISTA PHARMACOGNOSY JOURNAL.....	127

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) constituem o maior problema global de saúde, gerando um elevado número de mortes prematuras. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), das 56 milhões de mortes que ocorreram em todo o mundo em 2015, cerca de 40 milhões foram devido às DCNT (WHO, 2017). Indivíduos pertencentes a grupos vulneráveis, como os idosos e os de baixa escolaridade e renda, são os atingidos de forma mais intensa (ALWAN et al., 2010). Cerca de 28 milhões de todas as mortes por DCNT ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2014).

No Brasil, as DCNT também são a principal causa de mortalidade (DUNCAN et al., 2012). Em 2011, de um total de 1.170.498 óbitos registrados no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) disponibilizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), 800.118 deles foram atribuídos às DCNT, correspondendo a 68,3% do total. Doenças cardiovasculares, cânceres, doenças respiratórias e diabetes responderam pela grande maioria desses óbitos (MALTA et al., 2014).

O diabetes, quando comparado a outras DCNT (cardiovasculares, câncer e respiratórias crônicas) não tem mortalidade elevada (1.6 milhões das mortes por DCNT em 2015 no mundo), mas constitui um importante fator de risco e de comorbidade para outras condições mais graves, como as doenças cardiovasculares, insuficiência renal e a cegueira (GOULART, 2011; WHO, 2017). No Brasil, a terapia medicamentosa para o diabetes tem sido utilizada na população atendida nas unidades de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), inclusive com a disponibilidade de medicamentos gratuitos (MALTA; MORAIS NETO; SILVA JUNIOR, 2011; MALTA; SILVA JUNIOR, 2013).

O uso de plantas medicinais é comumente relatado na literatura como adjuvante no tratamento do diabetes (FEIJÓ et al., 2012; ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012; SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012). Alguns desses vegetais utilizados apresentam ação medicinal comprovada através de estudos científicos, a exemplo de Barbosa-Filho et al. (2005), Dornas et al. (2009), Dallaqua e Damasceno (2011), Ghorbani (2013), Simão (2013), Eddouks et al. (2014), Buchholz e Melzig (2015) e Kooti et al. (2016).

Porém, nem sempre o seu uso popular é feito de maneira correta com relação à indicação, à qualidade da matéria-prima vegetal e ao preparo das formulações caseiras, o que pode acarretar danos ao paciente. Isso ocorre por falta de informações dos usuários e também porque ainda é pequeno o número de profissionais de saúde com conhecimento adequado para prescrever plantas medicinais e fitoterápicos (FRANÇA et al., 2008; NICOLETTI, 2009; FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014; MOREIRA et al., 2014; VARELA; AZEVEDO, 2014).

Apesar da utilização de plantas medicinais ser uma das mais antigas práticas da humanidade, o seu uso descontrolado pode representar um risco grave para a saúde da população, pois elas são constituídas de misturas complexas de substâncias (LEAL; TELLIS, 2015). Algumas espécies podem conter, por exemplo, cristais de oxalato de cálcio (FRANCESCHI; HORNER, 1980) e ainda há poucos estudos sobre o teor de ácido oxálico presente nelas, o que pode trazer risco no seu uso quando existe predisposição de indivíduos com redução da atividade renal, como é o caso dos portadores de diabetes (NAKATA, 2012). Estes cristais encontram-se nos tecidos das plantas e são ingeridos juntamente com a água utilizada para a preparação do chá ou decocto (SCARDELATO; LEGRAMANDI; SACRAMENTO, 2013).

Os oxalatos podem ser encontrados em quantidades que variam de 3 a 80% do peso seco das plantas (NGUYEN; SAVAGE, 2013). Os cristais de oxalato de cálcio são classificados em solúveis ou insolúveis e o grau de toxicidade varia de acordo com o tipo e a quantidade (SILVA; TAKEMURA, 2006).

Quando absorvido em sua forma solúvel, o ácido oxálico irrita as mucosas do estômago e do intestino. Em seguida, é rapidamente absorvido pela mucosa intestinal e reage com o cálcio sérico, formando o oxalato de cálcio insolúvel, que não é metabolizado pelo organismo humano, sendo excretado na urina. Por ser pouco solúvel nesta, aumenta o risco da formação de cálculos nos rins, depositando-se e obstruindo os néfrons, ocasionando sérias lesões renais e causando desajuste metabólico (MANDEL, 1996).

Alguns estudos evidenciaram que a absorção e a excreção de uma dieta rica em oxalato podem ser consideradas como um fator importante no desenvolvimento de cálculos renais (SIENER et al., 2003; HOLMES; ASSIMOS, 2004). Segundo Lewandowski e Rodgers (2004) e Massey (2007), para que se tenha uma dieta

consciente com redução do consumo de oxalato presente na alimentação e prevenir a formação de cálculos renais é necessário, inicialmente, o conhecimento dos teores presentes nas espécies.

Diante do exposto, este estudo visa identificar a presença e o teor de ácido oxálico em espécies utilizadas para o tratamento de diabetes no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a presença de ácido oxálico e determinar seu teor em lâminas foliares de espécies vegetais utilizadas para o tratamento de diabetes no Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever os caracteres anatômicos das lâminas foliares das espécies selecionadas;
- ✓ Caracterizar a morfologia e a morfometria dos cristais de oxalato;
- ✓ Identificar os locais de acúmulo dos cristais e de outros metabólitos presentes nas espécies;
- ✓ Determinar a composição química elementar dos cristais;
- ✓ Quantificar o teor de ácido oxálico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 OXALATO DE CÁLCIO

A biomineralização é um processo comum nas plantas e ocorre no interior dos vacúolos dos idioblastos cristalíferos (FRANCESCHI; NAKATA, 2005). Os minerais de cálcio compreendem cerca de 50% dos biominerais conhecidos. Cristais de oxalato e carbonato de cálcio estão entre os biominerais mais abundantes nos vegetais (WEINER; DOVE, 2003). Entretanto, os cristais de oxalato de cálcio ocorrem mais comumente do que os de carbonato de cálcio, os quais estão presentes apenas em algumas famílias, como Moraceae, Urticaceae e Acanthaceae (PENTECOST, 1980).

Cristais de oxalato de cálcio têm sido observados em todos os membros dos cinco reinos de seres vivos (NAKATA, 2003). Nas plantas, ocorrem em mais de 215 famílias de plantas superiores, estando presentes na maioria dos tecidos e órgãos (FRANCESCHI; HORNER, 1980; LERSTEN; HORNER, 2006).

Algumas funções são atribuídas aos cristais de oxalato de cálcio nas plantas, tais como balanço iônico celular, regulação osmótica, defesa vegetal contra herbivoria, suporte mecânico tissular, detoxificação de alumínio e metais pesados, além da captação e reflexão da energia solar (FRANCESCHI; HORNER, 1980; FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

As formas dos cristais de oxalato de cálcio diferem e são descritas, frequentemente, como cristais prismáticos, drusas, estiloides, ráfides e areia cristalina (FRANCESCHI; NAKATA, 2005). O tipo, presença ou ausência de cristais pode ser caracterizado como uma característica taxonômica (HORNER et al., 2015). Diferentes técnicas de microscopia, como a óptica de luz, a de polarização e a eletrônica de varredura permitem a visualização das formas cristalinas do oxalato de cálcio na célula vegetal (VASCONCELOS et al., 2017).

O oxalato está presente na dieta humana, sendo encontrado em diversos vegetais, como espinafre, ruibarbo, acelga, tomate, beterraba, nozes e cacau (MASSEY, 2007). É considerado um fator antinutricional, pois, antes da absorção no organismo, ele reage com o cálcio da dieta, diminuindo sua assimilação (SANTOS, 2006). O oxalato também afeta a saúde humana quando é absorvido pelo

organismo, pois produz sais insolúveis de cálcio que podem precipitar nos rins e contribuir para a formação de cálculos renais (MANDEL, 1996).

A literatura relata casos de intoxicação por oxalato após ingestão de sucos dos frutos de *Averrhoa bilimbi* L. e *A. carambola* L., com sintomas que variam de soluços e confusão mental até coma e morte (NAIR et al., 2014; PASCHOALIN et al., 2014; SCARANELLO et al., 2014; VANELLI; CORRÊA; CORRÊA, 2014; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015; BARMAN et al., 2016; CAETANO et al., 2017; MOLINA et al., 2017). Por isso, existe a recomendação para evitar o consumo desses frutos, principalmente por pacientes com redução da atividade renal, como os diabéticos (PASCHOALIN et al., 2014). Estudos mostraram que os teores de oxalato variam nas diferentes partes da planta, mas que, geralmente, as maiores concentrações são encontradas nas folhas (SIENER et al., 2006; HUANG; HUANG; LIEBMAN, 2015).

O oxalato pode ser extraído das plantas utilizando água (oxalato solúvel) e ácidos diluídos (oxalato total, incluindo a fração insolúvel) (SAVAGE; MÁRTENSSON, 2010). Os principais métodos utilizados para quantificar o oxalato são espectrofotometria (NAIK et al., 2014), amperometria (LEON et al., 1990), polarografia (RODRIGUES; BARROS, 1993), cromatografia líquida (SAVAGE et al., 2000), cromatografia gasosa (CHEN et al., 1989), titulometria e métodos enzimáticos (NAIK et al., 2014).

A titulação com solução padronizada de permanganato de potássio é um dos procedimentos mais comuns para a determinação de ácido oxálico (NAPPI et al., 2006). Apesar de ser uma técnica relativamente antiga, a titulação é uma técnica econômica para o laboratório e confiável (BACCAN et al., 2001). Os outros métodos citados requerem instrumentação especial e envolvem altos custos de análise (NAIK et al., 2014).

Naik et al. (2014) testaram onze métodos diferentes para determinação de ácido oxálico em plantas e demonstraram que os resultados obtidos por titulação com permanganato de potássio eram consistentes e precisos.

3.2 PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE DIABETES

No tratamento do diabetes, além da prática de dieta e exercícios físicos, também são empregados medicamentos, como insulina e hipoglicemiantes orais

(BRASIL, 2002). Diversas plantas vêm sendo citadas na literatura como adjuvantes no tratamento do diabetes (FEIJÓ et al., 2012; ROSA; BARCELOS; BAMPI, 2012; SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012) e muitos estudos estão sendo desenvolvidos para comprovar os efeitos dessas espécies vegetais (BUCHHOLZ; MELZIG, 2015; KOOTI et al., 2016). Entretanto, são necessárias também investigações sobre os possíveis compostos químicos tóxicos que estão presentes nessas espécies.

A seguir estão informações sobre as espécies que foram selecionadas para essa pesquisa, as quais apresentam estudos etnobotânicos que demonstram seu uso popular para o tratamento de diabetes e investigações farmacológicas que confirmam seu potencial antidiabético. Além disso, encontram-se também dados farmacobotânicos que indicam a presença de cristais (METCALFE; CHALK, 1950).

3.2.1 *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L.

A família Annonaceae possui cerca de 2.500 espécies e 135 gêneros, sendo, a maioria, nativa de regiões tropicais (CHATROU et al., 2012). No Brasil são encontrados 29 gêneros e cerca de 392 espécies (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2015). A maioria das espécies dessa família são frutíferas e apresentam valor econômico devido às propriedades nutricionais de seus frutos, que são consumidos *in natura* e amplamente utilizados no preparo de sucos, sorvetes e sobremesas (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015).

O gênero *Annona* é um dos mais representativos da família, com 82 espécies encontradas no Brasil (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2015). Dentre seus representantes, tem-se *Annona muricata* e *A. squamosa*. *Annona muricata*, conhecida popularmente como graviola (ALMEIDA et al., 2014), é uma árvore de copa densa, com 4-6 m de altura, com frutos de polpa branca, sabor ácido e aromático, contendo poucas sementes de cor negra (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015). *Annona squamosa*, conhecida popularmente como pinha ou ata (ALMEIDA et al., 2014; BAPTISTEL et al., 2014), é uma arvoreta de copa rala, com 3-6 m de altura, frutos geralmente verdes, de polpa branca e succulenta, de sabor doce e agradável, contendo 40-60 sementes (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015).

As folhas das duas espécies são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diabetes (MARTINS et al., 2005; OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010), colesterol (MARTINS et al., 2005; COSTA; MARINHO, 2016), problemas

renais (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010), hipertensão (ALBUQUERQUE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2014), dor de estômago (BAPTISTEL et al., 2014), dor de coluna (ALBUQUERQUE et al., 2007; COSTA; MARINHO, 2016), enxaqueca (ALBUQUERQUE et al., 2007), febre (BAPTISTEL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014), câncer (FERRÃO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2017), diarreia (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010; RIBEIRO et al., 2014) e para emagrecer (MARTINS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2014).

Existem, na literatura, vários estudos que comprovaram as atividades farmacológicas das duas espécies, como antidiabética (SHIRWAIKAR et al., 2004; GUPTA et al., 2005; ARROYO et al., 2009; JUSTINO et al., 2018), antioxidante (RABÊLO et al., 2014; ALKHAWALIDY; HOSSAIN, 2015; SIQUEIRA et al., 2015), anticâncer (GAVAMUKULYA et al., 2014), anti-inflamatória (FOONG; HAMID, 2012), antinociceptiva (HAMID et al., 2012), antiulcerogênica (BENTO et al., 2018), antibacteriana (VIEIRA et al., 2010; RABÊLO et al., 2014; DHOLVITAYAKHUN et al., 2017; PINTO et al., 2017), antifúngica (KALIDINDI et al., 2015) e leishmanicida (VILA-NOVA et al., 2011).

3.2.2 *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam.

A família Moraceae compreende 40 gêneros e cerca de 1.217 espécies de ocorrência em regiões tropicais do mundo (THE PLANT LIST, 2013), estando cerca de 50% dos gêneros distribuídos entre as regiões do México e da Argentina (BERG, 2001). No Brasil, a família está representada por 19 gêneros e 208 espécies (ROMANIUC NETO et al., 2015), que possuem importância medicinal e valor econômico, conhecidas por apresentar metabólitos secundários bioativos e por serem exploradas pela indústria da madeira (ROYER et al., 2010; LIMA et al., 2011).

O gênero *Artocarpus* compreende 61 espécies nativas da Ásia e da Índia, conhecidas por seus frutos muito apreciados (RAGONE, 2011; STEVENS, 2012). No Brasil, foram introduzidas duas espécies: *Artocarpus altilis*, conhecida como fruta-pão e *A. heterophyllus*, conhecida como jaca (FALCÃO et al., 2001; PEREIRA; KAPLAN, 2013).

Ambas são árvores perenes que produzem látex, muito cultivadas em pomares domésticos nas regiões tropicais do Brasil. Seus frutos são consumidos *in natura*, assados ou cozidos, ou em forma de doces e compotas (LORENZI;

LACERDA; BACHER, 2015). Diferentes partes das plantas também são usadas na medicina tradicional para tratar diabetes, lesões, furúnculos, dor nas costas, reumatismos e problemas respiratórios (RODRIGUES, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008; AGUIAR; BARROS, 2012; SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

Estudos com extratos, frações e componentes isolados das folhas das duas espécies demonstraram que elas previnem a aterosclerose (MOZEF et al., 2015), possuem funções cardio-protetoras (NWOKOCHA et al., 2017), ação antiviral (HAFID et al., 2017) e efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos (CHANDRIKA et al., 2006; CHACKREWARTHY et al., 2010).

3.2.3 *Averrhoa bilimbi* L.

A família Oxalidaceae está representada no Brasil pelos gêneros *Averrhoa*, *Biophytum* e *Oxalis*, compreendendo 103 espécies distribuídas em todo o país (ABREU; FIASCHI, 2016). *Averrhoa bilimbi* e *A. carambola* são as únicas espécies do gênero encontradas no Brasil e ambas possuem interesse econômico devido aos seus frutos, que podem ser consumidos *in natura*, como sucos, compotas, geleias ou ainda utilizados na produção de vinagre, vinhos e pickles (LIMA; MÉLO; LIMA, 2001; JOLY, 1985; SOUZA; LORENZI, 2005; RIBEIRO et al., 2010).

Averrhoa bilimbi é uma espécie arbórea frutífera de 5 a 9 m de altura, originária da Ásia e amplamente cultivada em países tropicais (LIMA; MÉLO; LIMA, 2001; LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015). Conhecida popularmente como azedinho, bilimbi, bilimbino, biri-biri, caramboleira amarela, limão caiena, limão caiano, piripiri e piri piri, *A. bilimbi* é tradicionalmente usada na medicina popular para o tratamento de diabetes no Brasil (MILLER; NAIR, 2006; OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA et al., 2014; ROCHA, 2014; RODRIGUES; ANDRADE, 2014; MORO; CASTRO, 2015).

Estudos científicos têm comprovado o potencial antidiabético de extratos das folhas da planta (PUSHPARAJ; TAN; TAN, 2000; PUSHPARAJ; TAN; TAN, 2001; TAN; TAN; PUSHPARAJ, 2005; PUTRA; AULIA; WAHYUNI, 2017). Além do efeito antihiperlipidêmico, Daud; Hashim e Samsulrizal (2013) também apontaram o efeito anticoagulante do extrato das folhas da espécie administrado em ratos diabéticos por 14 dias consecutivos. Os autores ressaltaram que *A. bilimbi* pode, então, mostrar

potencial para reduzir o risco de acidente vascular cerebral, trombose venosa, ataque cardíaco e outras síndromes metabólicas associadas com a formação de coágulos.

Nagmoti et al. (2010) realizaram um estudo com o extrato metanólico das folhas de *A. bilimbi* e observaram seu efeito hepatoprotetor em ratos intoxicados com tetracloreto de carbono. Outras atividades também reportadas na literatura para extratos de folhas da planta são antimicrobiana, anti-hiperlipidêmica e citotóxica (ZAKARIA et al., 2007; KARON et al., 2011; AZEEM; VRUSHABENDRASWAMI, 2015).

3.2.4 *Mangifera indica* L.

A família Anacardiaceae possui, aproximadamente, 80 gêneros e 873 espécies, presentes em ambientes secos a úmidos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, estendendo-se até regiões temperadas (PELL et al., 2011). É uma família muito estudada por incluir espécies com frutos de importância econômica, como manga, caju, pistache, cajá, umbu e seriguela, dentre outras (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015).

Mangifera indica, popularmente conhecida como mangueira, é uma árvore frondosa e perenifólia, de 8-18m de altura, originária da Índia e de Myanmar. É uma das frutíferas mais plantadas no Brasil, com quase uma centena de cultivares no país (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015). Diferentes partes da planta, como raiz, casca, folhas, flores, frutos e sementes, são utilizadas na medicina popular para o tratamento de enfermidades, como diabetes, anemia, diarreia, hemorroidas, indigestão, asma, bronquite, gripe, hipertensão, reumatismo, desordens do fígado e para tumores (SHAH et al., 2010; SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012; RIBEIRO et al., 2017).

A espécie é muito estudada pela presença de compostos bioativos, encontrando-se, na literatura, vários estudos de revisão apontando os metabólitos presentes na planta e as atividades farmacológicas comprovadas, como antidiabética, anticâncer, analgésica, antipirética, anti-inflamatória, anti-úlceras e antibacteriana (SHAH et al., 2010; GHUNIYAL, 2015; JAHURUL et al., 2015; PARVEZ, 2016; EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2017; LAURICELLA et al., 2017).

3.2.5 *Momordica charantia* L.

A família Cucurbitaceae reúne espécies de importância econômica no Brasil, especialmente as que pertencem aos gêneros *Cucurbita*, *Momordica*, *Fevillea* e *Sechium* (SOUZA; LORENZI, 2005). Dentre elas destaca-se *Momordica charantia*, uma herbácea anual, trepadeira, de 3-4 m de comprimento, conhecida popularmente como melão-de-são-caetano (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015). É uma erva daninha bastante frequente em pomares, cafezais, sobre cercas e em terrenos baldios (LORENZI, 2008).

A espécie é empregada na medicina popular, onde é muito utilizada como antidiabética (LORENZI; MATOS; 2002; LORENZI, 2008; RIBEIRO et al., 2017), contra malária (SANTOS; LIMA; OLIVEIRA, 2014), vermes (AGUIAR; BARROS, 2012; MESSIAS et al., 2015), para prurido cutâneo (ALBUQUERQUE et al., 2007; LIPORACCI; SIMÃO, 2013), inflamações externas (CORDEIRO; FÉLIX, 2014) e reumatismo (OLIVEIRA; BARROS; MOITA NETO, 2010; MESSIAS et al., 2015).

De acordo com Mentreddy (2007), *M. charantia* é, provavelmente, a planta mais pesquisada entre aquelas conhecidas por suas atividades antidiabéticas. Há vários estudos de revisão sobre o potencial antidiabético da espécie e também sobre outras atividades, como antioxidante, antimicrobiana, antineoplásica, antiulcerativa e imunomoduladora (GROVER; YADAV, 2004; GUPTA et al., 2011; JOSEPH; JINI, 2013; PANDAY; RAUNIAR; PANDAY, 2015; UPADHYAY; AGRAHARI; SINGH, 2015; AHMAD et al., 2016; TAN et al., 2016; BEIDOKHT; JÄGER, 2017).

3.2.6 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A família Myrtaceae é representada por, aproximadamente, 3.500 espécies, distribuídas em cerca de 140 gêneros (APG III, 2009). No Brasil, a família aparece entre as famílias mais comuns nas formações vegetais (SOUZA; LORENZI, 2005). O gênero *Syzygium* compreende espécies frutíferas e é encontrado, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012). Um de seus representantes é *Syzygium cumini*, uma árvore de copa frondosa e densa, de 12-20 m de altura (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015). No Brasil, é encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, onde é muito cultivada

como ornamental e seus frutos são muito apreciados por algumas pessoas, sendo consumidos frescos (LORENZI; LACERDA; BACHER, 2015; SOBRAL et al., 2016).

É conhecida, popularmente, por azeitona roxa (AGRA et al., 2008; RODRIGUES; ANDRADE, 2014), azeitona preta (SANTOS et al., 2012; LOZANO et al., 2014), jamelão (ALMEIDA et al., 2014) e jambolão (FEIJÓ et al., 2012).

As folhas da espécie têm sido utilizadas pela população para o tratamento de diabetes (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008; SANTOS; LIMA, 2008; FEIJÓ et al., 2012; LOZANO et al., 2014), problemas renais (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008), colesterol alto (RODRIGUES; ANDRADE, 2014) e problemas de pressão (SANTOS et al., 2012).

A planta foi uma das mais citadas em um estudo realizado com idosos assistidos em uma Unidade Básica de Saúde em Pelotas, Rio Grande do Sul, sobre as plantas medicinais usadas como terapia complementar no tratamento dos sintomas do diabetes (FEIJÓ et al., 2012). Nesse estudo foi identificada, ainda, que a folha é a parte mais utilizada para este fim medicinal, sendo preparada, principalmente, por infusão. Entretanto, também há relatos de uso da decocção das folhas (AGRA et al., 2008; SANTOS; LIMA, 2008; RODRIGUES; ANDRADE, 2014).

Estudos de revisão da literatura a respeito da propriedade antidiabética das folhas de *S. cumini* mostraram que essa atividade está relacionada, principalmente, à presença de flavonoides (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013; CHAGAS et al., 2015). Outras atividades encontradas na literatura para as folhas da planta são antimicrobiana (BONA et al., 2014), anti-inflamatória (CHANUDOM; TANGPONG, 2015) e antioxidante (VEBER et al., 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES

Foi realizada uma pré-seleção dentre as principais plantas medicinais utilizadas no Brasil para o tratamento de diabetes, através de um levantamento bibliográfico utilizando bases de dados eletrônicas, como ScienceDirect, Scielo e PubMed. Para cada espécie foram utilizados como descritores: anatomia foliar, cristais, histoquímica, microscopia óptica de luz, microscopia de polarização, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e doseamento de ácido oxálico. Dessa forma, foram selecionadas oito espécies vegetais que apresentavam estudos que indicavam a presença de cristais, mas que não tinham estudos aprofundados utilizando diferentes técnicas microscópicas e analíticas para caracterizar a presença de ácido oxálico.

4.2 COLETA E TOMBAMENTO

Amostras das oito espécies vegetais foram coletadas na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Exsicatas foram depositadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), cujos números de tombamento estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Espécies vegetais tombadas no herbário Dárdano de Andrade Lima

ESPÉCIE	FAMÍLIA	NÚMERO DE TOMBAMENTO
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	88147
<i>Annona squamosa</i> L.	Annonaceae	88146
<i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg	Moraceae	91180
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Moraceae	91181
<i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae	89750
<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	91429
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	89980
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Myrtaceae	88151

Fonte: Autor próprio.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA

4.3.1 Microscopia Óptica de Luz (MOL)

No estudo foi utilizado material vegetal fresco e fixado (FAA 50% – formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (KRAUS; ARDUIN, 1997), coletado entre o terceiro e o quinto nó de três espécimens adultos. Secções transversais e paradérmicas da região mediana das lâminas foliares foram obtidas, à mão livre, com uso de lâmina comum de barbear e medula do pecíolo de embaúba como suporte (JOHANSEN, 1940; OLIVEIRA; AKISUE, 2009). Posteriormente, as secções foram clareadas com hipoclorito de sódio (50%) (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 e as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (KRAUTER, 1985). Lâminas semipermanentes foram montadas, seguindo 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). Medidas de comprimento, largura e diâmetro dos cristais foram determinadas através do programa LAS EZ e a média e desvio padrão foram calculados.

4.3.2 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).

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de lâminas foliares foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixadas em solução de ósmio

2% e tampão cacodilato 0,1 M. Após desidratação em série etílica, 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 (Quanta 200 FEG) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.4 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA

Testes histoquímicos foram realizados em secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, usando lâmina comum de barbear e medula do pecíolo de embaúba como suporte (JOHANSEN, 1940; OLIVEIRA; AKISUE, 2009), utilizando os reagentes listados no Quadro 2. Imagens digitais foram capturadas por câmera digital, acoplada a microscópio óptico (Alltion), e processadas no programa Toup View Image.

Quadro 2 – Metodologia utilizada para a análise histoquímica de lâminas foliares de espécies utilizadas para o tratamento de diabetes

SUBSTÂNCIAS	REAGENTES	COLORAÇÃO/ REAÇÃO	REFERÊNCIA
Alcaloides	Dragendorff	Laranja	YODER; MAHLBERG, 1976
Amido	Lugol	Azul negro/ Marrom escuro	JOHANSEN, 1940
Compostos fenólicos	Dicromato de potássio 10%	Vermelho	GABE, 1968
Compostos lipofílicos	Sudan III	Vermelho alaranjado	SASS, 1951
Cristais de oxalato de cálcio	Ácido clorídrico 10%	Dissolução dos cristais	JENSEN, 1962
Lignina	Floroglucinol	Vermelho	JOHANSEN, 1940
Taninos	Vanilina clorídrica	Rosa/ Vermelho	MACE; HOWELL, 1974
Triterpenos e esteroides	Tricloreto de antimônio	Vermelho alaranjado	MACE; BELL; STIPANOVIC, 1974

Fonte: Autor próprio.

4.5 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 (Zeiss EVO-LS15).

4.6 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO

Lâminas foliares das espécies selecionadas foram secas em estufa a 60°C, por 48 h, e trituradas em liquidificador.

4.6.1 Determinação de oxalato total e solúvel

Foram pesados 0,5 g do pó das lâminas foliares em erlenmeyers de 100 mL e acrescentados 50 mL de ácido clorídrico 2 N (oxalato total) ou água destilada (oxalato solúvel). Os erlenmeyers foram colocados em banho-maria com agitação, a 80°C, por 30 min. Os extratos foram, posteriormente, 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 mol.L⁻¹ 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 mol.L⁻¹. As titulações (em triplicata) foram realizadas sob aquecimento, a 50°C, e a viragem foi de incolor para róseo persistente, por mais de 30 s. As concentrações de oxalato foram expressas em g/100 g de matéria seca.

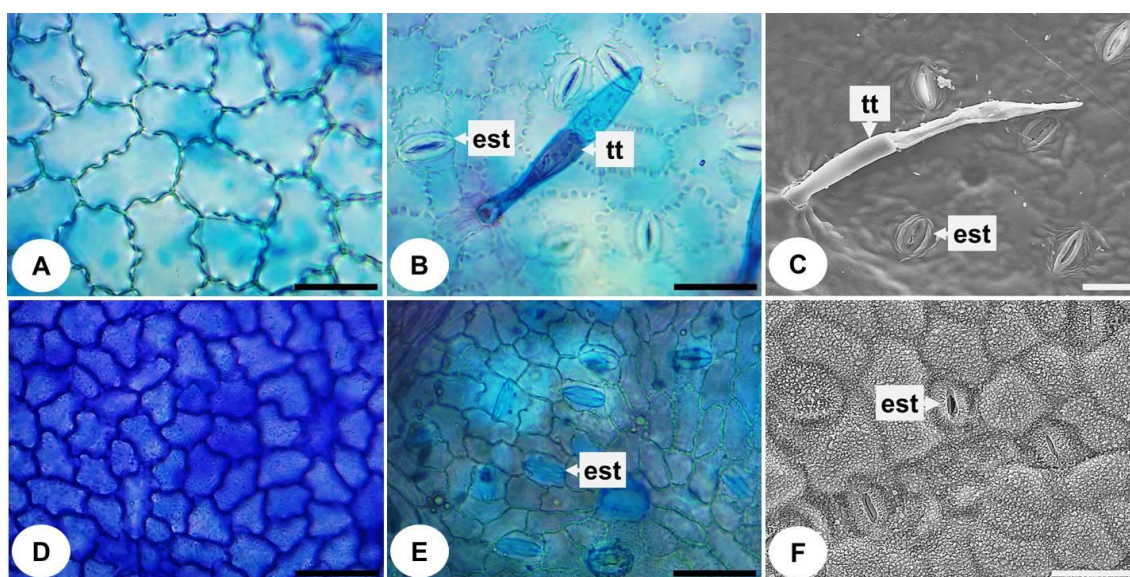
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA

5.1.1 *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L.

Em vista frontal sob MOL, as lâminas foliares de *A. muricata* e *A. squamosa* apresentam células epidérmicas de paredes sinuosas em ambas as faces (Figuras 1A, 1B, 1D e 1E). As lâminas foliares, em ambas as espécies, são hipoestomáticas, com estômatos paracíticos (Figuras 1B e 1D). Esse tipo de estômato é característico da família Annonaceae (METCALFE; CHALK, 1950). Sob MEV, observa-se que a cutícula em *A. muricata* é lisa (Figura 1C) e em *A. squamosa* é granulosa (Figura 1F). *Annona muricata* possui tricomas tectores simples na face abaxial, visualizados sob MOL (Figura 1B) e MEV (Figura 1C). Tricomas tectores simples também foram encontrados na lâmina foliar de *A. crassiflora* (CORRÊA; CHAGAS; PIMENTEL, 2007). Em *A. mucosa* e *A. rugulosa* foram encontrados tricomas tectores pluricelulares (DUARTE; OLIVEIRA; SOUZA, 2015).

Figura 1 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L.

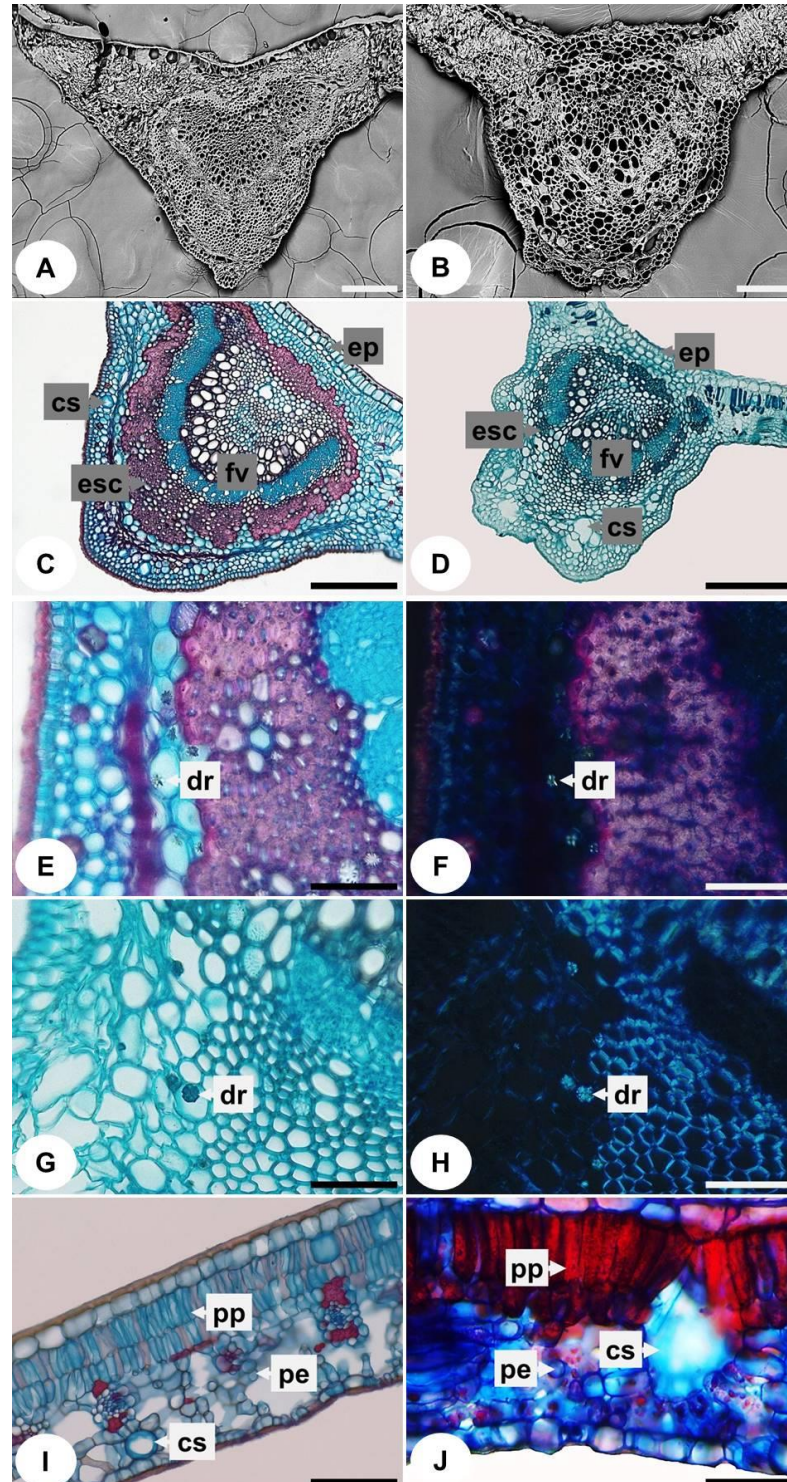


A, B, D e E: microscopia óptica de luz; C e F: microscopia eletrônica de varredura. A – C: *Annona muricata*; D – F: *Annona squamosa*. A e D: face adaxial da epiderme; B, C, E e F: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: est: estômato; tt: tricoma tector. Barras: A, B, D e E = 50 µm; C e F = 25 µm. Fonte: Autor próprio.

Em secção transversal, sob MEV, a nervura central de *A. muricata* e de *A. squamosa* apresenta uma convexidade pronunciada na face adaxial (Figuras 2A e 2B). Sob MOL, a epiderme nas duas espécies é unisseriada, recoberta por cutícula espessa (Figuras 2C e 2D). Ambas também possuem um feixe vascular colateral, circundado por esclerênquima (Figuras 2C e 2D). Na região parenquimática são visualizadas cavidades secretoras (Figuras 2C e 2D) e drusas (Figuras 2E e 2G), sendo estas últimas também observadas em MP (Figuras 2F e 2H).

O mesofilo, nas duas espécies, sob MOL, é dorsiventral, consistindo de duas camadas de parênquima paliçádico e parênquima esponjoso multisseriado (Figuras 2I e 2J). Porém, no parênquima esponjoso de *A. muricata* os espaços intercelulares são maiores do que em *A. squamosa*. *Annona mucosa* e *A. rugulosa* também possuem duas camadas de parênquima paliçádico (DUARTE; OLIVEIRA; SOUZA, 2015), enquanto *A. crassiflora* possui apenas uma camada (CORRÊA; CHAGAS; PIMENTEL, 2007). Agrawal et al. (2011) observaram apenas uma camada de parênquima paliçádico no mesofilo de *A. squamosa*. Cavidades secretoras estão presentes também no mesofilo de *A. muricata* e *A. squamosa* (Figuras 2I e 2J).

Figura 2 – Secções transversais da lâmina foliar de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização



A e B: microscopia eletrônica de varredura; C, D, E, G, I e J: microscopia óptica de luz; F e H: microscopia de polarização. A, C, E, G e H: *Annona muricata*; B, D, F, H e J: *Annona squamosa*. A – H: nervura central; I e J: mesofilo. Abreviaturas: cs: cavidade secretora; dr: drusa; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, C e D = 200 µm; B, I e J = 100 µm; E – H = 50 µm. Fonte: Autor próprio.

5.1.2 *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam.

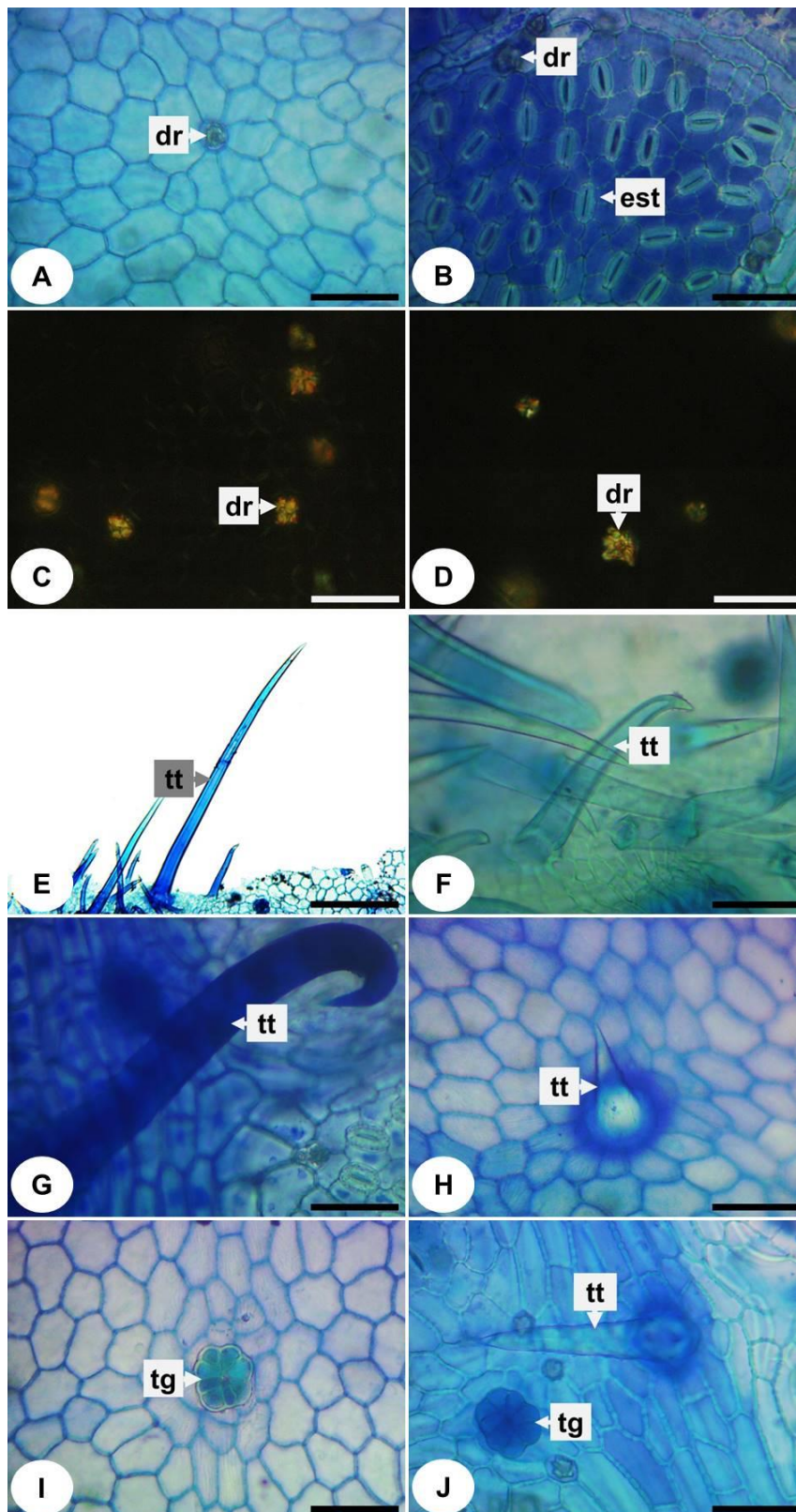
A lâmina foliar de *A. altilis*, em vista frontal, sob MOL, exibe células epidérmicas de paredes retas ou levemente sinuosas em ambas as faces (Figuras 3A e 3B). A lâmina foliar é hipoestomática, com estômatos anomocíticos e actinocíticos na face abaxial (Figura 3B). Drusas são visualizadas sob MOL e MP em ambas as faces da lâmina foliar (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D). Observa-se, sob MOL tricomas tectores e glandulares. Os tricomas tectores podem ser de três tipos: simples (Figura 3E), em formato de gancho (Figuras 3F e 3G) e cônico (Figuras 3H e 3J). Os tricomas glandulares são multicelulares, com oito ou mais células (Figuras 3I e 3J). Todos os tricomas são encontrados em ambas as faces da lâmina foliar, com exceção do tricoma tector simples, o qual está presente apenas na face adaxial.

A lâmina foliar de *A. heterophyllus*, em vista frontal, sob MOL, apresenta células epidérmicas com paredes sinuosas em ambas as faces (Figuras 4A e 4B). Assim como foi visualizado em *A. altilis*, a lâmina foliar de *A. heterophyllus* é hipoestomática, com estômatos anomocíticos e actinocíticos na face abaxial (Figura 4B) e também apresenta drusas em ambas as faces, sob MOL e MP (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D). Em *A. heterophyllus* existe apenas um tipo de tricoma tector, que é o cônico, e ele está restrito à face abaxial (Figura 4E). Os tricomas glandulares são multicelulares, encontrados em ambas as faces da lâmina foliar e possuem seis ou mais células (Figuras 4F e 4G).

Segundo Metcalfe e Chalk (1950), em Moraceae podem ser encontrados estômatos anomocíticos e anisocíticos. Gangadhara e Inamdar (1977) encontraram estômatos anomocíticos nas duas espécies e actinocíticos apenas em *A. altilis*.

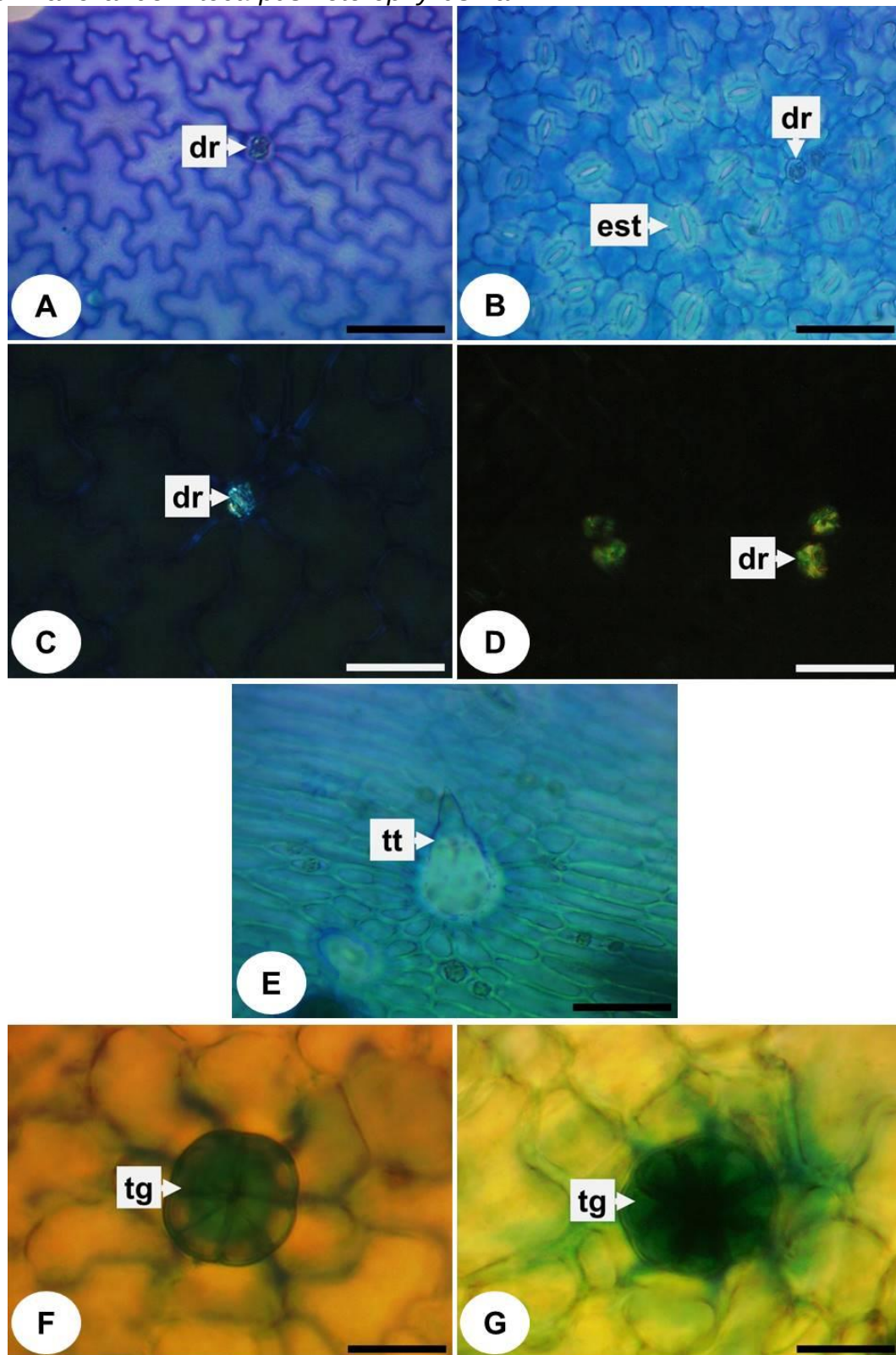
Há controvérsias na literatura com relação aos tipos de tricomas visualizados nas duas espécies estudadas. Martínez (2008) afirmou que a lâmina foliar de *A. heterophyllus* é glabra na face adaxial. Entretanto, no presente estudo foram encontrados tricomas glandulares nesta face da lâmina foliar de *A. heterophyllus*, assim como também foi encontrado por Gangadhara e Inamdar (1977) e Schnetzler; Teixeira e Marinho (2017). Os tipos de tricomas tectores simples, em formato de gancho e cônico, também foram descritos por Gangadhara e Inamdar (1977) para espécies de *Artocarpus*. Estudando tricomas de 25 taxa de Urticales, estes autores enfatizaram que a presença de tricomas glandulares localizados em depressões é um caractere de diagnose para *Artocarpus*.

Figura 3 – Secções paradérmicas sob microscopias óptica de luz e de polarização da lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg



A, B, E, F, G, H, I e J: microscopia óptica de luz; C e D: microscopia de polarização. A, C, E, F, H e I: face adaxial da epiderme; B, D, G e J: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: dr: drusa; est: estômato; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector. Barras: A, B, E, F, G, H, I e J = 50 µm; C e D = 20 µm. Fonte: Autor próprio.

Figura 4 – Secções paradérmicas sob microscopias óptica de luz e de polarização da lâmina foliar de *Artocarpus heterophyllus* Lam.



A, B, E, F e G: microscopia óptica de luz; C e D: microscopia de polarização. A e C: face adaxial da epiderme; B, D, E, F e G: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: dr: drusa; est: estômato; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector. Barras: A, B e E = 50 µm; C, D, F e G = 20 µm. Fonte: Autor próprio.

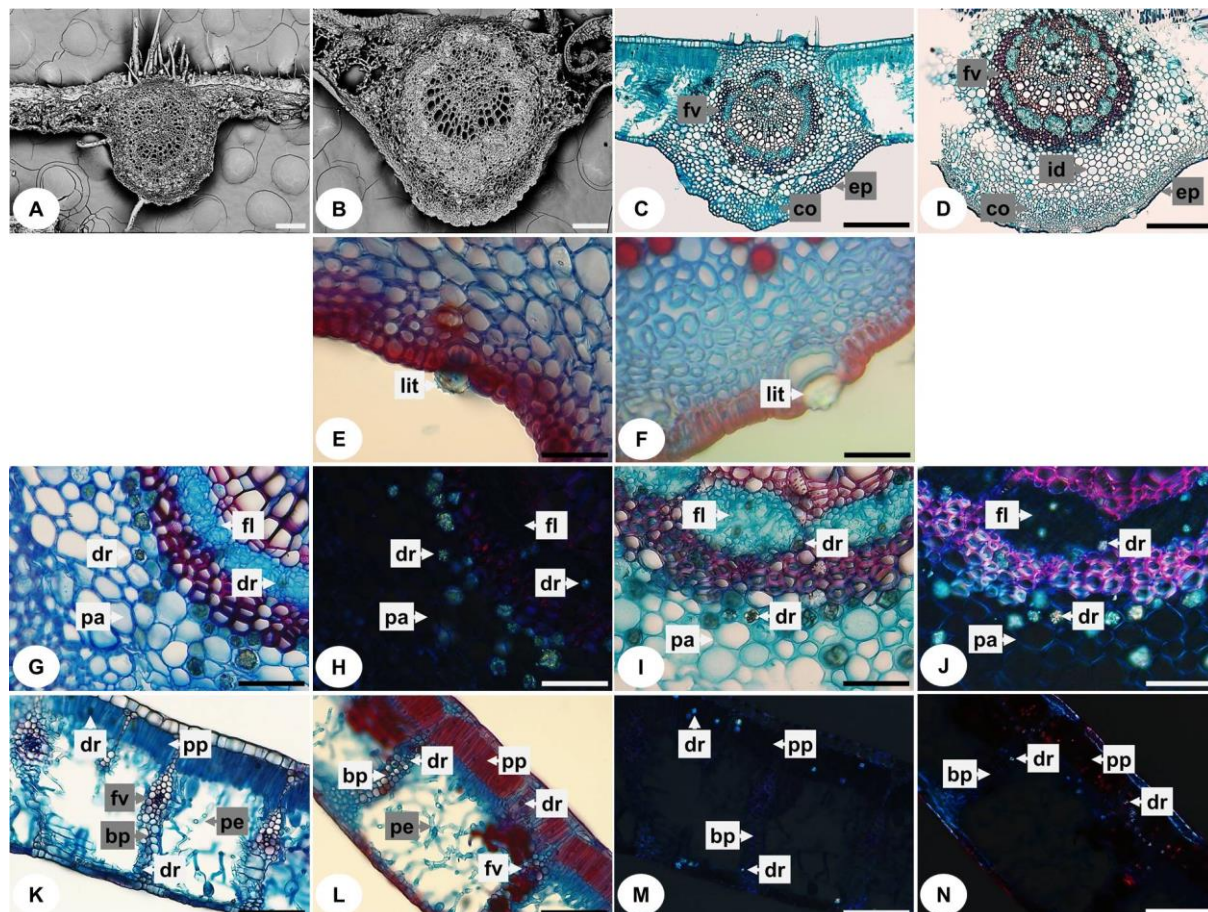
Em secção transversal, sob MEV, a nervura central de *A. altilis* mostra um contorno biconvexo (Figura 5A) e *A. heterophyllus* mostra um contorno que varia de plano-convexo a ligeiramente biconvexo (Figura 5B). Sob MOL, a epiderme nas duas espécies é unisseriada, recoberta por cutícula fina (Figuras 5C e 5D). Em ambas as espécies existem litocistos localizados principalmente nas regiões de nervuras (Figuras 5E e 5F). A família Moraceae é conhecida por apresentar cistólitos. Metcalfe e Chalk (1950) afirmaram que cistólitos verdadeiros ocorrem em *Broussonetia*, *Chlorophora*, *Conocephalus*, *Dammaropsis*, *Fatoua*, *Ficus*, *Malaisia*, *Morus*, *Poulsenia* e *Sparattosyce*, principalmente na epiderme da lâmina foliar. Em espécies de *Antiaris*, *Artocarpus*, *Broussonetia*, *Cecropia* e *Parartocarpus* ocorrem estruturas que lembram cistólitos nos tricomas. Em *A. altilis*, o colênquima é formado por duas a quatro camadas de células (Figura 5C) e em *A. heterophyllus* o colênquima é formado por três a sete camadas de células (Figura 5D).

As duas espécies estudadas possuem um feixe vascular colateral na nervura central, o qual está associado com esclerênquima (Figuras 5C e 5D). *Artocarpus heterophyllus* apresenta uma região medular de parênquima mais desenvolvida do que *A. altilis* (Figuras 5C e 5D) e possui, também, idioblastos no parênquima (Figura 5D). Drusas são observadas sob MOL e MP no parênquima da nervura central e no floema das duas espécies (Figuras 5G, 5H, 5I e 5J).

O mesofilo nas duas espécies, analisado sob MOL, é dorsiventral, consistindo de uma a duas camadas de parênquima paliçádico em *A. altilis* (Figura 5K) e de cerca de três camadas de parênquima paliçádico em *A. heterophyllus* (Figura 5L). O parênquima esponjoso apresenta vários espaços intercelulares (Figuras 5K e 5L). Feixes vasculares pequenos estão distribuídos no mesofilo e são circundados por uma bainha irregular de parênquima. Essa bainha parenquimática possui extensões que sempre conectam as duas faces da epiderme em *A. altilis*, o que não ocorre em *A. heterophyllus* (Figuras 5K e 5L). Drusas são observadas sob MOL e MP no parênquima paliçádico e na bainha parenquimática (Figuras 5K, 5L, 5M e 5N).

Periyanayagam e Karthikeyan (2013) e Akinloye et al. (2015) observaram drusas nos mesmos tecidos encontrados no presente estudo. A presença de cristais prismáticos na bainha parenquimática de *A. altilis* foi descrita por Wu e Kuo-Huang (1997), o que não foi observado neste estudo.

Figura 5 – Secções transversais da lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização



A e B: microscopia eletrônica de varredura; C, D, E, F, G, I, K e L: microscopia óptica de luz; H, J, M e N: microscopia de polarização. A, C, E, G, H, K e M: *Artocarpus altilis*; B, D, F, I, J, L e N: *Artocarpus heterophyllus*. A – J: nervura central; K – N: mesofilo. Abreviaturas: bp: bainha parenquimática; co: colênquima; dr: drusa; ep: epiderme; fl: floema; fv: feixe vascular; id: idioblasto; lit: litocisto; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, C, K, L, M e N = 100 μ m; B e D = 200 μ m; E, F, G, H, I e J = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

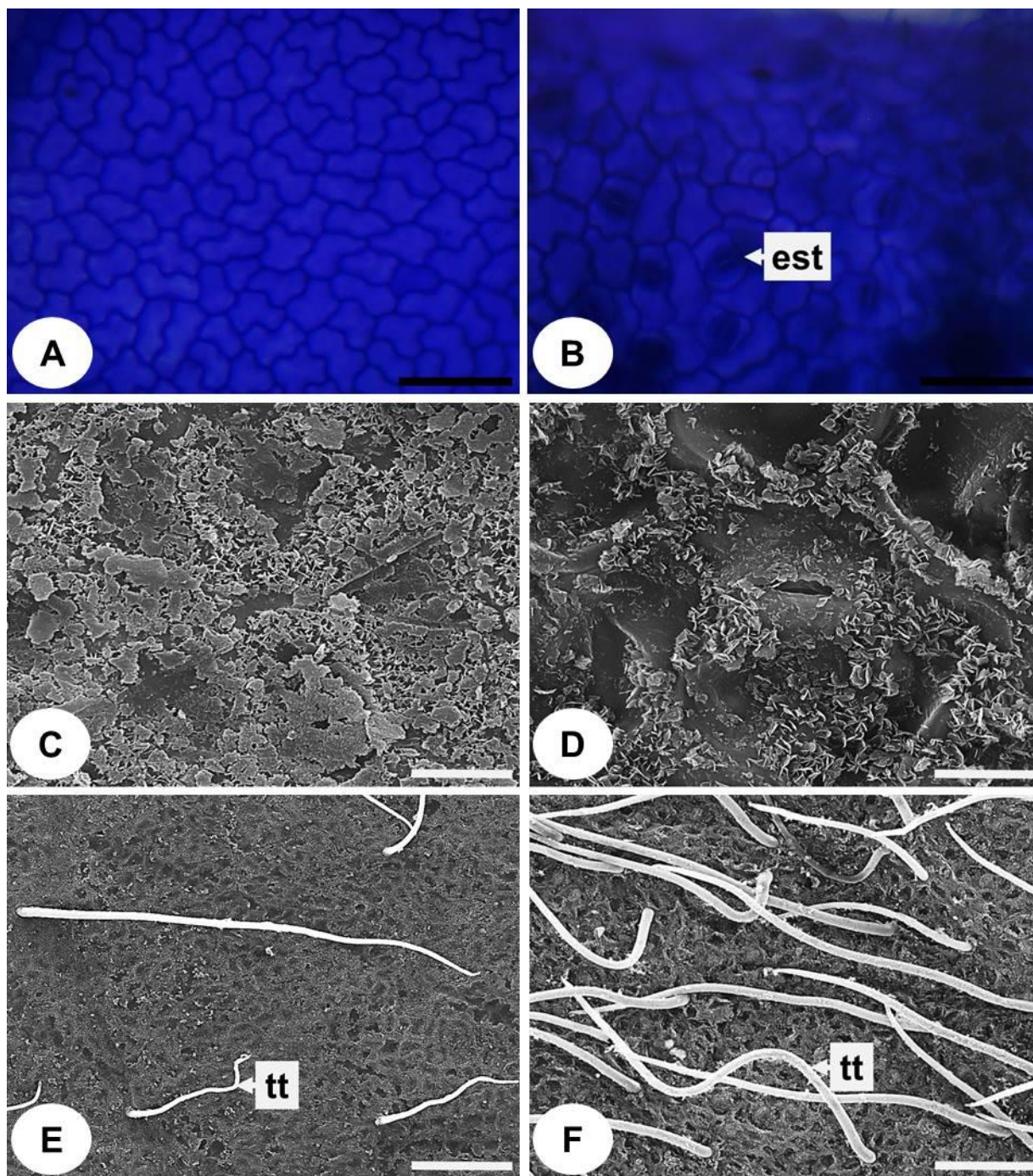
5.1.3 *Averrhoa bilimbi* L.

Observada sob MOL, a lâmina foliar de *A. bilimbi*, em vista frontal, é hipoestomática, com estômatos paracíticos (Figuras 6A e 6B). De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), esse tipo de estômato é comum nos gêneros *Averrhoa*, *Biophytum* e *Eichleria* (Oxalidaceae). No gênero *Oxalis*, Jooste; Dreyer e Oberlander (2016) encontraram quatro tipos de estômatos: anomocítico, anisocítico, actinocítico e um tipo incomum de estômato anisocítico com quatro células. O tipo de lâmina foliar hipoestomática foi descrita por Sunarti e Tihurua (2008) em espécies de

Averrhoa. Em *Oxalis*, existem espécies com lâminas foliares epiestomáticas, hipoestomáticas e anfiestomáticas (JOOSTE; DREYER; OBERLANDER, 2016).

As células epidérmicas possuem paredes sinuosas em ambas as faces (Figuras 6A e 6B). Sob MEV, pode-se visualizar que a cera epicuticular é do tipo escamosa, com cristaloides arranjados em rosetas (Figuras 6C e 6D). A cera epicuticular, com cristaloides dispostos em rosetas, também é encontrada nas famílias Asteraceae, Connaraceae, Erythroxylaceae, Fabales e Malpighiaceae (DITSCH; BARTHLOTT, 1997). Segundo Barthlott et al. (1998), os tipos de ceras epicuticulares são de grande importância sistemática. Observa-se, também, sob MEV tricomas tectores simples filiformes nas duas faces da lâmina foliar (Figuras 6E e 6F), porém, são mais frequentes na face abaxial. Jorge et al. (2005) determinaram que, na lâmina foliar de *A. carambola*, os tricomas tectores também estão presentes com maior frequência na face abaxial. Sunarti e Tihurua (2008) observaram tricomas tectores em ambas as faces da lâmina foliar de *A. bilimbi* e apenas na face adaxial da lâmina foliar de *A. carambola*.

Figura 6 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de *Averrhoa bilimbi* L.



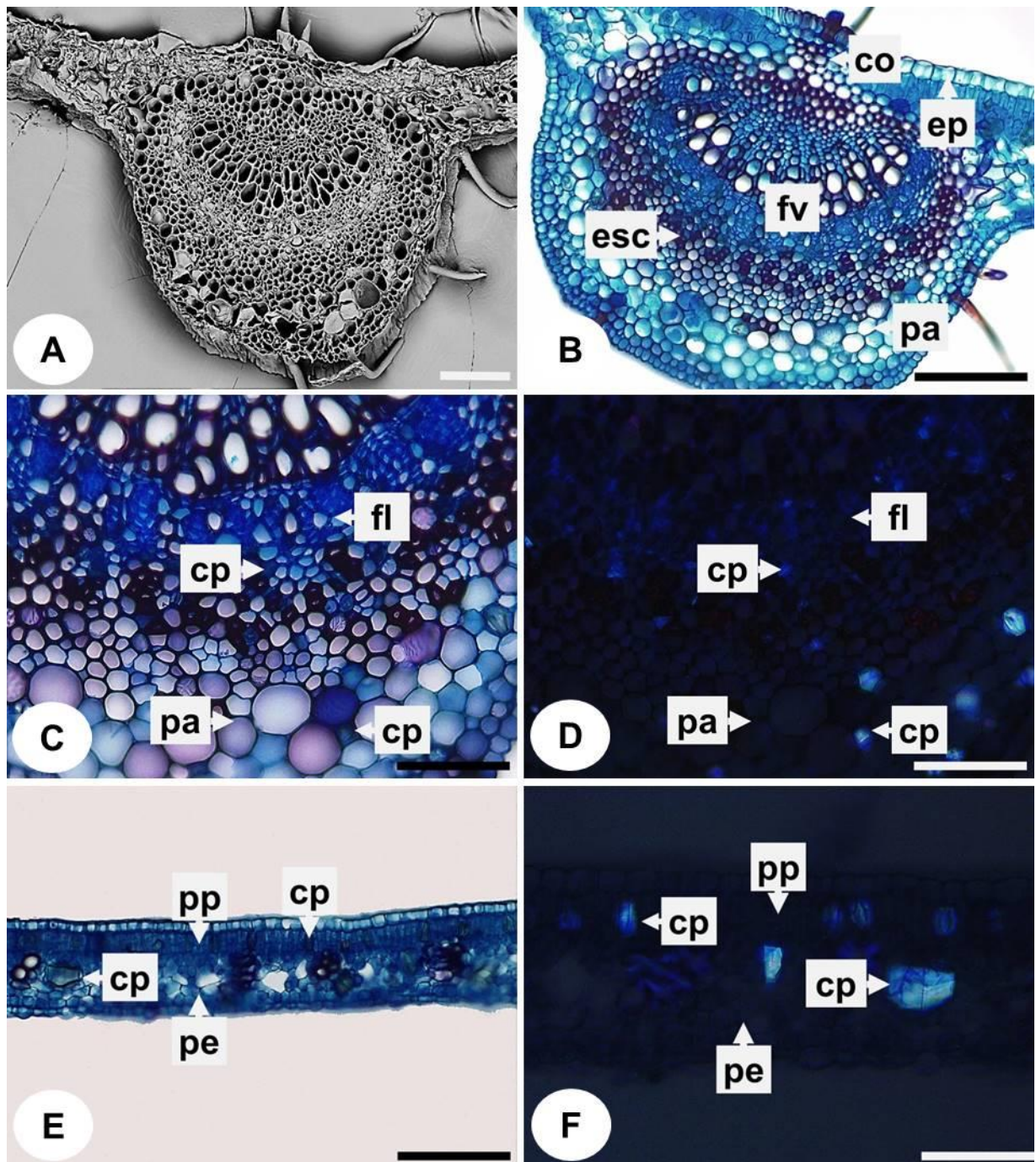
A e B: microscopia óptica de luz; C – F: microscopia eletrônica de varredura. A, C e E: face adaxial da epiderme; B, D e F: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: est: estômato; tt: tricoma tector. Barras: A e B = 50 μm ; C e D = 10 μm ; E e F = 100 μm . Fonte: Autor próprio.

Em secção transversal, sob MEV, a nervura central da lâmina foliar de *A. bilimbi* exibe um contorno plano-convexo (Figura 7A). Guedes (2009) também descreveu este mesmo formato da nervura central para *A. bilimbi*. Sob MOL, a epiderme é unisseriada e revestida por cutícula espessa (Figura 7B). Abaixo da epiderme, na face adaxial, encontram-se cerca de duas camadas de colênquima, seguidas por um feixe vascular colateral, em formato de arco, circundado por esclerênquima (Figura 7B). Feixes vasculares colaterais são comuns na família Oxalidaceae (METCALFE; CHALK, 1950). Valsan e Raphael (2016) reportaram que o colênquima na espécie é composto por cinco a seis camadas de células.

Cristais prismáticos são visualizados no floema e no parênquima da nervura central sob MOL e MP (Figuras 7C e 7D). A presença de cristais prismáticos é comum na família Oxalidaceae e, de acordo com Metcalfe e Chalk (1950), eles são geralmente cúbicos e solitários. Sunarti e Tihurua (2008) observaram cristais prismáticos em *A. bilimbi*, *A. carambola*, *A. dolichocarpa* e *A. leucopetala*. Guedes (2009) mencionou a presença de drusas na lâmina foliar de *A. bilimbi*, o que não foi evidenciado no presente estudo.

O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído por duas camadas de células e parênquima esponjoso com grandes espaços intercelulares (Figura 7E). Reis e Alvim (2013) e Jooste; Dreyer e Oberlander (2016) determinaram que a quantidade de camadas de parênquima paliçádico é um caractere importante para a diferenciação de espécies de *Oxalis*. Cristais prismáticos são encontrados nos parênquimas paliçádico e esponjoso sob MOL e MP (Figuras 7E e 7F).

Figura 7 – Secções transversais da lâmina foliar de *Averrhoa bilimbi* L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização

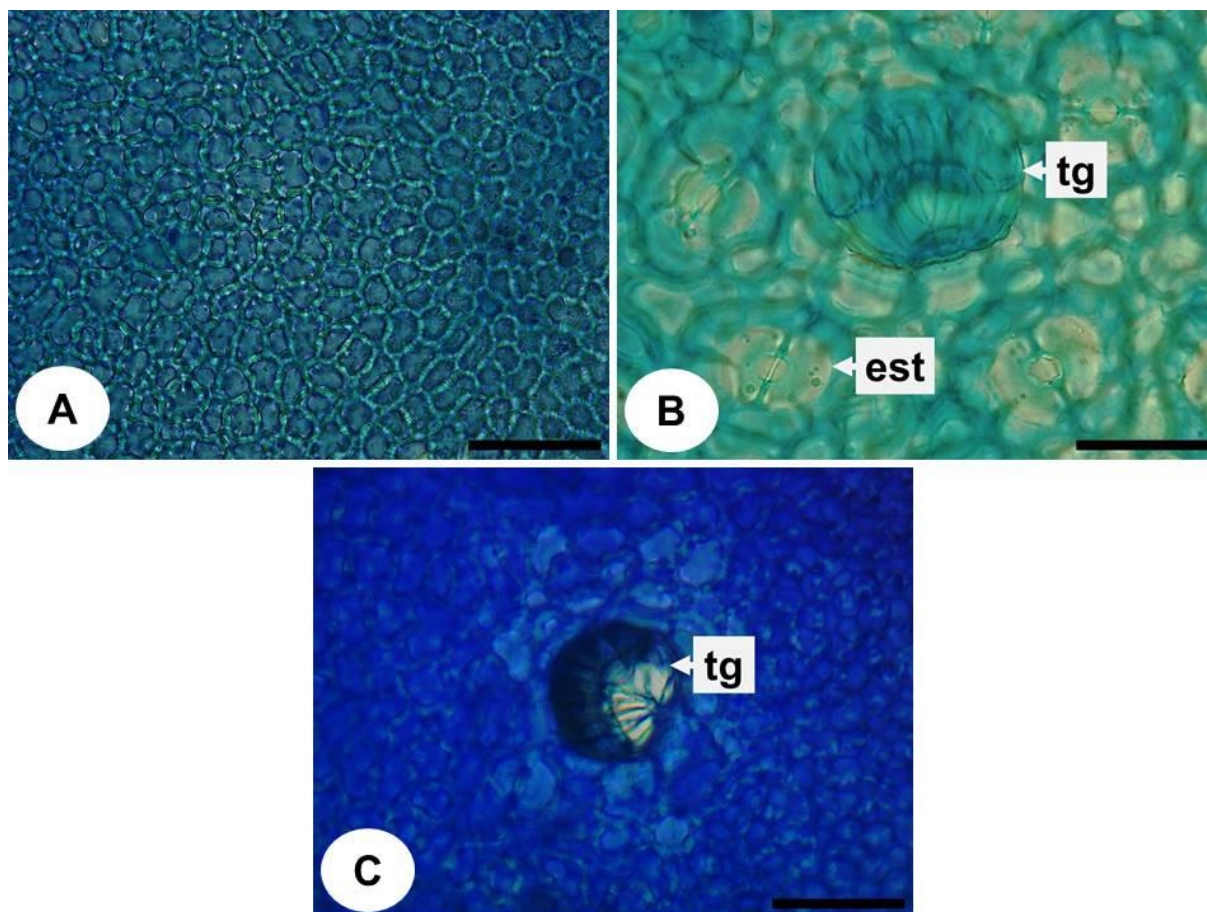


A: microscopia eletrônica de varredura; B, C e E: microscopia óptica de luz; D e F: microscopia de polarização. A – D: nervura central; E e F: mesófilo. Abreviaturas: co: colênquima; cp: cristal prismático; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fl: floema; fv: feixe vascular; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, B e E = 100 µm; C, D e F = 50 µm. Fonte: Autor próprio.

5.1.4 *Mangifera indica* L.

Em vista frontal, sob MOL, as células epidérmicas de *M. indica* apresentam paredes levemente sinuosas e espessas nas duas faces da lâmina (Figuras 8A e 8B). A lâmina foliar é hipoestomática, com estômatos do tipo anomocítico na face abaxial (Figura 8B). De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), na família Anacardiaceae podem ocorrer folhas hipoestomáticas ou anfiestomáticas. Tricomas glandulares multicelulares foram encontrados em ambas as faces da lâmina (Figuras 8B e 8C). Rocha et al. (2015) não citaram a presença de tricomas na lâmina foliar de *M. indica*, porém, encontraram tricomas tectores na lâmina foliar de *Spondias purpurea*. Vasconcelos; Vasconcelos e Randau (2016) descreveram a presença de tricomas tectores em *S. mombin*.

Figura 8 – Secções paradérmicas da lâmina foliar de *Mangifera indica* L. sob microscopia óptica de luz

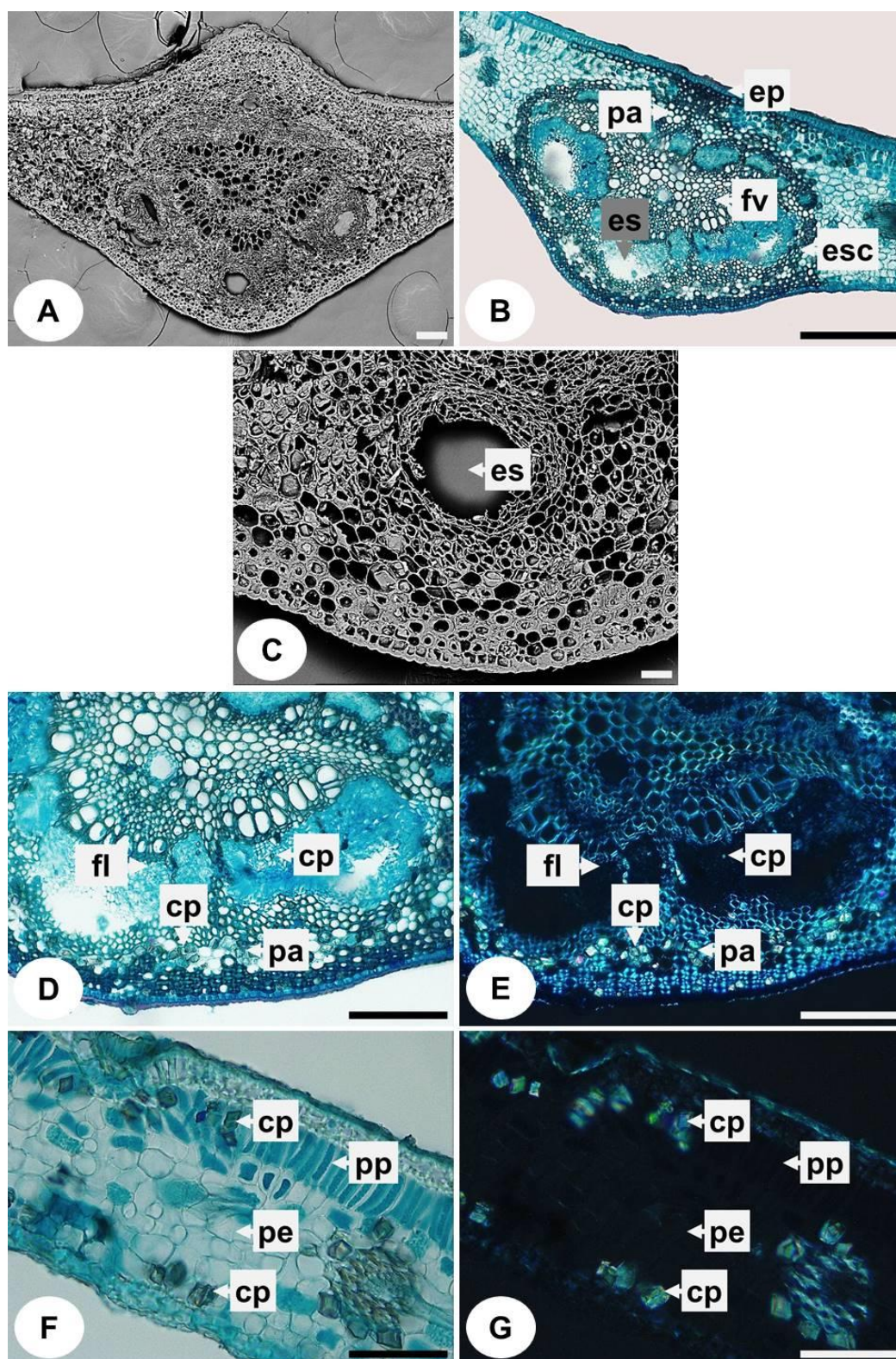


A e C: face adaxial da epiderme; B: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: est: estômato; tg: tricoma glandular. Barras: A e B = 50 μ m; C = 20 μ m. Fonte: Autor próprio.

A nervura central, em secção transversal sob MEV, possui formato biconvexo (Figura 9A). Rocha et al. (2015) também encontraram este mesmo formato da nervura central em *M. indica*. Sob MOL, a epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula espessa (Figura 9B). O feixe vascular possui formato biconvexo e é do tipo colateral, circundando por esclerênquima (Figura 9B), corroborando os estudos de Santhan (2014) e Rocha et al. (2015). No floema encontram-se estruturas secretoras (Figura 9B e 9C). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), a presença de estruturas secretoras é a principal característica da família Anacardiaceae. Nos órgãos vegetativos, estas estruturas são encontradas, principalmente, no floema e na medula. Há estudos na literatura que relatam a composição da secreção dessas estruturas e, também, o seu modo de formação (LACCHIA; GUERREIRO, 2009). Cristais prismáticos foram visualizados no floema e no parênquima através de MOL e MP (Figuras 9D e 9E).

O mesofilo, sob MOL, apresenta uma organização do tipo dorsiventral, com uma a duas camadas de parênquima paliçádico e em torno de seis a oito camadas de parênquima esponjoso (Figura 9F). Santhan (2014) observaram duas a três camadas de parênquima paliçádico para a espécie em estudo. Cristais prismáticos são visualizados no parênquima paliçádico e no esponjoso através de MOL e MP (Figuras 9F e 9G).

Figura 9 – Secções transversais da lâmina foliar de *Mangifera indica* L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização



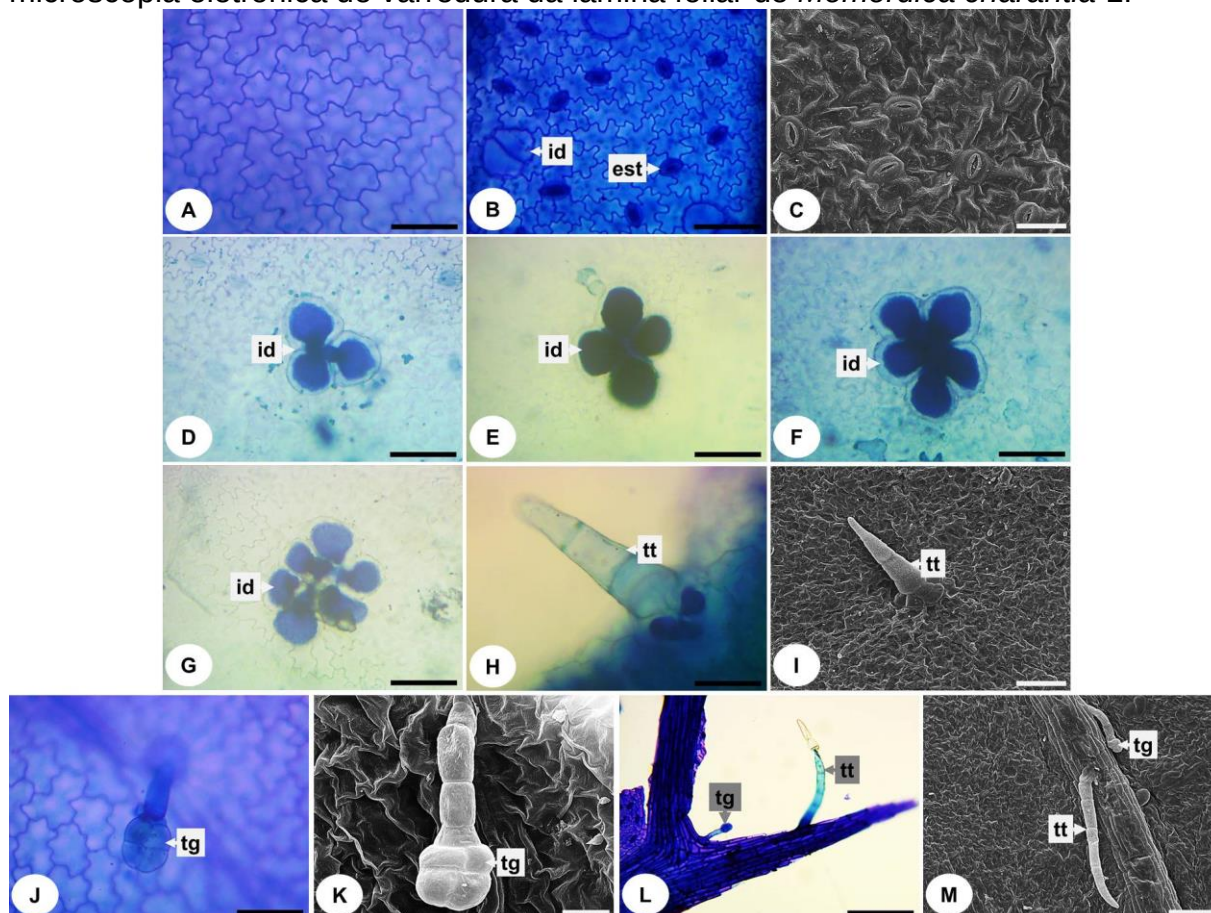
A e C: microscopia eletrônica de varredura; B, D e F: microscopia óptica de luz; E e G: microscopia de polarização. A – E: nervura central; F e G: mesofilo. Abreviaturas: cp: cristal prismático; ep: epiderme; es: estrutra secretora; esc: esclerênquima; fl: floema; fv: feixe vascular; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, D e E = 100 μ m; B = 200 μ m; F e G: 50 μ m; C = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

5.1.5 *Momordica charantia* L.

Em vista frontal, sob MOL, a lâmina foliar de *M. charantia* é hipoestomática, com estômatos anomocíticos na face abaxial da epiderme (Figuras 10A e 10B). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), na família Cucurbitaceae, os estômatos são do tipo anomocítico e podem estar presentes nas duas faces da lâmina foliar ou restritos à face abaxial. As células epidérmicas apresentam paredes fortemente sinuosas em ambas as faces (Figuras 10A e 10B) e, em MEV, verifica-se que elas são recobertas por cutícula levemente estriada (Figura 10C). Sob MOL e MEV visualizam-se, entre as células epidérmicas, alguns idioblastos cristalíferos, em grupos de dois (Figura 10B), três (Figura 10D), quatro (Figura 10E), cinco (Figura 10F) e seis (Figura 10G), além de tricomas tectores e glandulares.

Os tricomas tectores são unisseriados e multicelulares (Figuras 10H e 10I) e os tricomas glandulares possuem pedúnculo unisseriado e cabeça multicelular (Figuras 10J e 10K). Os tricomas são mais frequentes na região da nervura central (Figuras 10L e 10M), corroborando os dados encontrados por Coutinho et al. (2009). Daleffi Zocoler et al. (2006) encontraram apenas tricomas tectores na lâmina foliar da espécie. Coutinho et al. (2009), também estudando a lâmina foliar de *M. charantia*, evidenciaram os mesmos tipos de tricomas citados no presente estudo.

Figura 10 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de *Momordica charantia* L.



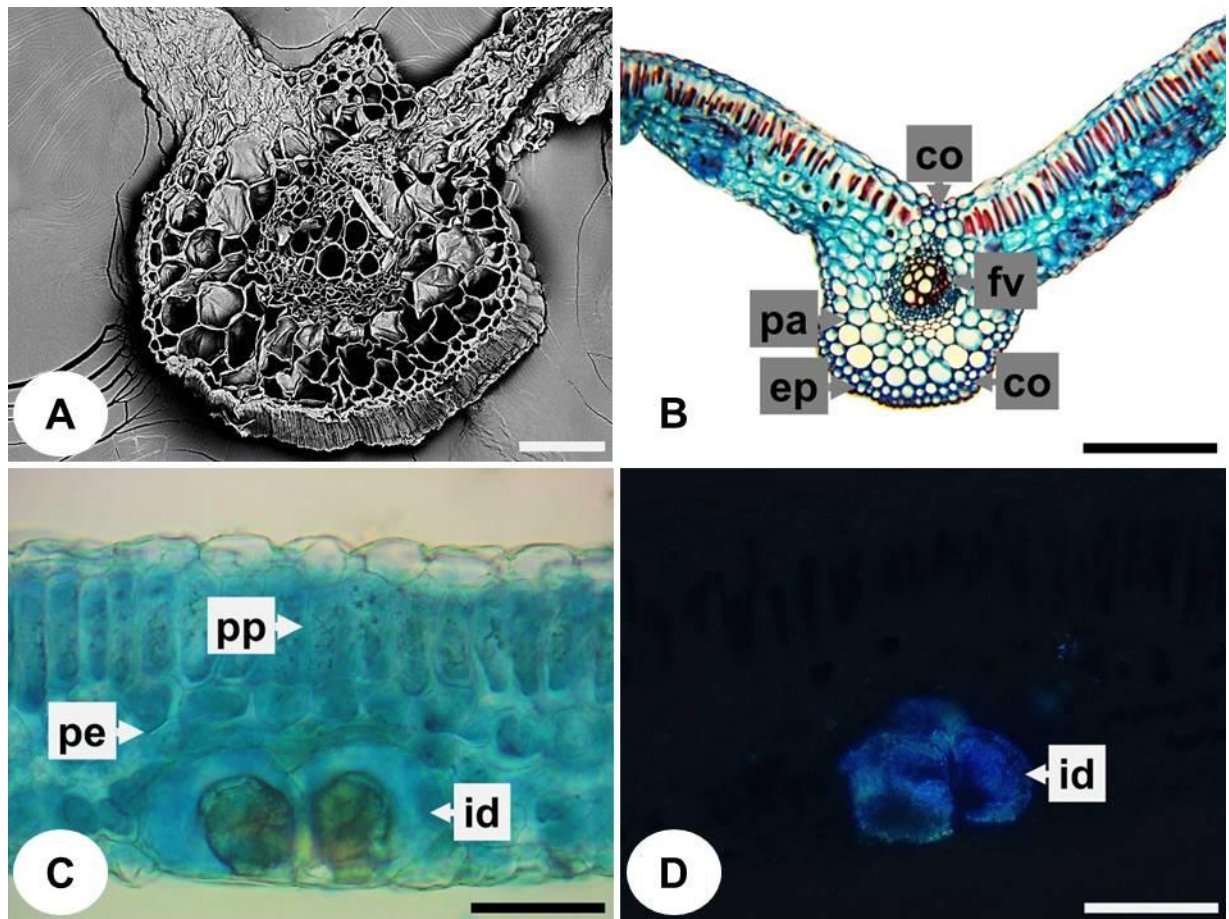
A, B, D, E, F, G, H, J e L: microscopia óptica de luz; C, I, K e M: microscopia eletrônica de varredura. A, H, I, K: face adaxial da epiderme; B, C, D, E, F, G, J, L e M: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: est: estômato; id: idioblasto; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector. Barras: A, B, D, E, F, G, H, J e L = 50 µm; C e K = 25 µm; I e M = 100 µm. Fonte: Autor próprio.

A nervura central de *M. charantia*, sob MEV e MOL, apresenta um formato plano-convexo ou biconvexo (Figuras 11A e 11B). A epiderme é unisseriada, formada por células arredondadas e recobertas por cutícula fina (Figura 11B). Um a dois estratos de colênquima situam-se abaixo da epiderme na face adaxial, enquanto na abaxial pode ocorrer um estrato descontínuo deste tecido (Figura 11B).

Um feixe vascular biclateral está situado na região central parenquimática da nervura (Figura 11B). Daleffi Zocoler et al. (2006) e Săvulescu e Hoza (2010) também descreveram a presença de um feixe vascular biclateral na nervura central da lâmina foliar de *M. charantia*. Entretanto, Coutinho et al. (2009) reportaram que existe de um a três feixes vasculares na nervura central. Quando existe a presença de três feixes, o feixe central é maior e do tipo biclateral, enquanto os demais adjacentes são colaterais. Quando há apenas um feixe, este é sempre biclateral.

O mesofilo é dorsiventral, composto por uma camada de parênquima paliçádico e cerca de cinco camadas de parênquima esponjoso (Figura 11C). Em *M. tuberosa*, o parênquima paliçádico apresenta duas camadas de células (KUMAR et al., 2010). Na face abaxial da epiderme estão inseridos idioblastos que apresentam, em seu interior, cristais aglomerados (Figura 11C), também visualizados sob MP (Figura 11D). Em *M. tuberosa*, os idioblastos estão inseridos em ambas as faces da epiderme (KUMAR et al., 2010).

Figura 11 – Secções transversais da lâmina foliar de *Momordica charantia* L. sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização



A: microscopia eletrônica de varredura; B e C: microscopia óptica de luz; D: microscopia de polarização. A e B: nervura central; C: mesofilo; D: idioblastos no mesofilo. Abreviaturas: co: colênquima; ep: epiderme; id: idioblasto; fv: feixe vascular; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A = 100 μ m; B = 200 μ m; C e D = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

5.1.6 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Em vista frontal, sob MOL, a lâmina foliar de *S. cumini* apresenta células epidérmicas de paredes sinuosas na face adaxial (Figura 12A) e células de paredes retas ou levemente onduladas na face abaxial (Figura 12A). Verifica-se, também, a presença de cavidades secretoras, as quais ocorrem em ambas as faces (Figuras 12A e 12B). Sob MEV, percebe-se que as células epidérmicas são recobertas por cutícula lisa (Figuras 12C e 12D).

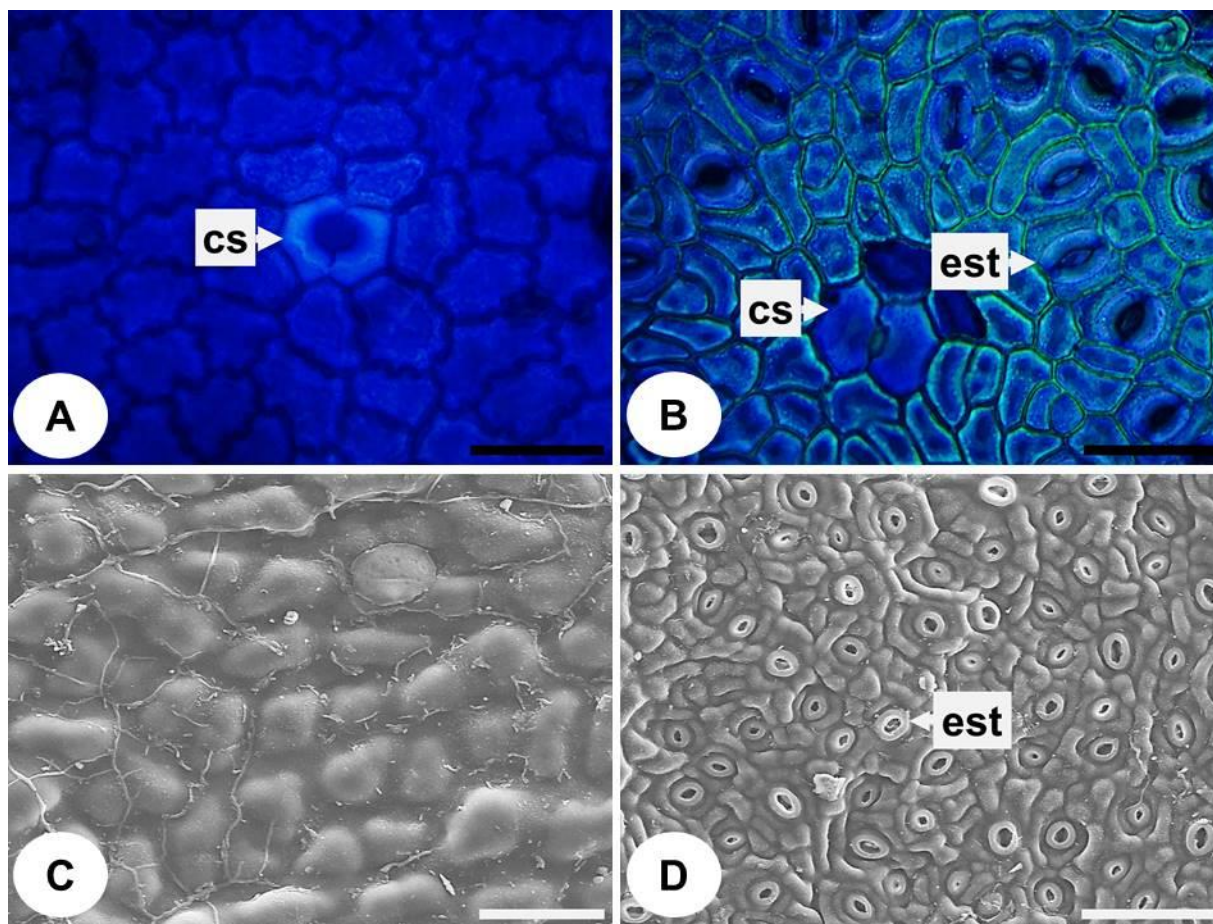
Não foram visualizados tricomas na lâmina foliar de *S. cumini*. Apesar da ocorrência de tricomas tectores ser relatada para espécies da família Myrtaceae (METCALFE; CHALK, 1950), em um estudo com dezessete espécies do gênero *Syzygium* na Tailândia, nenhuma apresentou tricomas (KANTACHOT; CHANTARANOTHAI; THAMMATHAWORN, 2007).

Sob MOL, nota-se que a lâmina foliar de *S. cumini* é hipoestomática (Figuras 12A e 12B), corroborando outros estudos com a espécie (RUGGIERO, 2004; KANTACHOT; CHANTARANOTHAI; THAMMATHAWORN, 2007; SIQUEIRA-NUNES; MARTINS, 2010). Entretanto, Alberton et al. (2001) a descreveram como anfiestomática.

Existe uma divergência na literatura com relação aos tipos de estômatos encontrados na lâmina foliar da espécie. No presente estudo foram identificados estômatos anomocíticos e anisocíticos (Figura 12B). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), os estômatos na família Myrtaceae são normalmente anomocíticos. Este foi o único tipo descrito por Alberton et al. (2001) e Ruggiero (2004) para *S. cumini*, enquanto Siqueira-Nunes e Martins (2010) citaram apenas estômatos paracíticos e Kantachot; Chantaranothai e Thammathaworn (2007) encontraram estômatos anisocíticos e paracíticos.

Ainda segundo Kantachot; Chantaranothai e Thammathaworn (2007), de dezessete espécies de *Syzygium* analisadas, apenas *S. cumini*, *S. laetum* subsp. *jugorum* e *S. ripicola* apresentaram estômatos anisocíticos e paracíticos. Considerando as demais, cinco mostraram apenas estômatos anomocíticos e nove somente estômatos paracíticos.

Figura 12 – Secções paradérmicas sob microscopia óptica de luz e análise sob microscopia eletrônica de varredura da lâmina foliar de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



A e B: microscopia óptica de luz; C e D: microscopia eletrônica de varredura. A e C: face adaxial da epiderme; B e D: face abaxial da epiderme. Abreviaturas: cs: cavidade secretora; est: estômato. Barras: A; B e C = 50 µm; D = 100 µm. Fonte: Autor próprio.

A nervura central, em corte transversal, sob MEV, é levemente côncava na face superior e levemente convexa na face inferior (Figura 13A). Ruggiero (2004) também descreveram o formato da nervura central da espécie como côncavo-convexo, enquanto Siqueira-Nunes e Martins (2010) descreveram como plano-convexo. Sob MOL, a epiderme é unisseriada, formada por células arredondadas, recobertas por cutícula espessa (Figura 13B).

Na região parenquimática central da nervura está localizado um feixe vascular biclateral, circundado continuamente por uma bainha de esclerênquima (Figura 13B). Este tipo de feixe vascular é comum na família Myrtaceae (METCALFE; CHALK, 1950) e foi mencionado para esta espécie (RUGGIERO, 2004; KANTACHOT; CHANTARANOTHAI; THAMMATHAWORN, 2007; SIQUEIRA-NUNES; MARTINS, 2010).

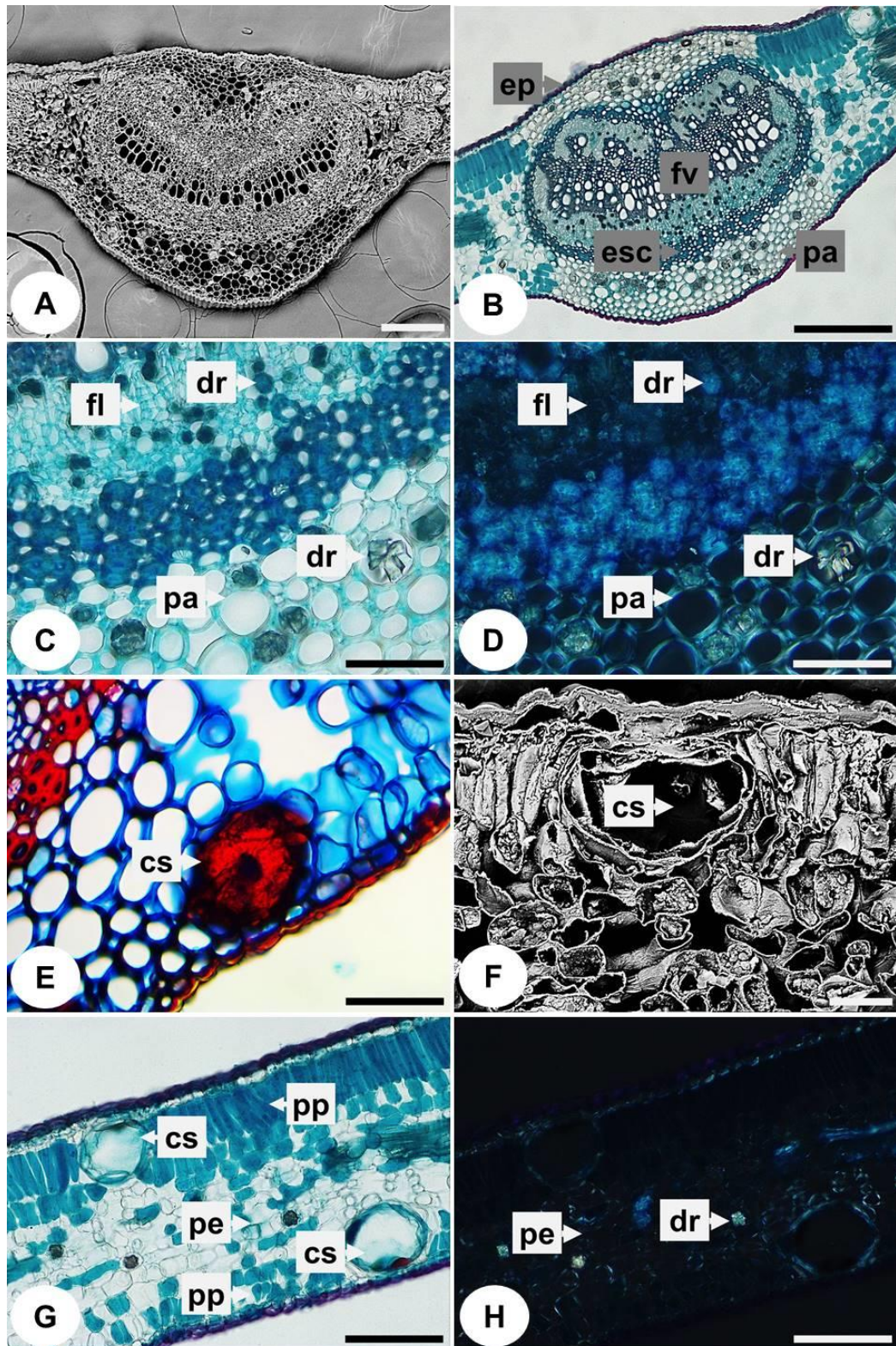
Drusas são encontradas no parênquima e no floema, identificadas sob MOL e MP (Figuras 13C e 13D). Na nervura central e no mesofilo são observadas, sob MOL e MEV, cavidades secretoras próximas à epiderme (Figuras 13E e 13F). Segundo Metcalfe e Chalk (1950), essas cavidades secretoras estão, geralmente, presentes na família Myrtaceae e secretam substâncias oleosas.

Sob MOL, o mesofilo é isobilateral (Figura 13G). Este tipo de mesofilo é predominante na família Myrtaceae (METCALFE; CHALK, 1950; KANTACHOT; CHANTARANOTHAI; THAMMATHAWORN, 2007). O parênquima paliçádico está localizado abaixo de ambas as faces da epiderme, sendo constituído por dois estratos na face adaxial e um estrato na face abaxial. O parênquima esponjoso é constituído por sete a nove camadas de células irregulares (Figura 13G). Neste último tecido ocorrem drusas, visualizadas em MOL e MP (Figuras 13G e 13H).

Kantachot; Chantaranothai e Thammathaworn (2007) não citam o mesofilo de *S. cumini* como biestratificado como os demais trabalhos sobre a espécie (ALBERTON et al., 2001; RUGGIERO, 2004; SIQUEIRA-NUNES; MARTINS, 2010). Estes autores afirmaram que há uma camada de hipoderme no mesofilo da espécie, assim como há também esta mesma camada em *S. ripicola* e duas a três camadas em *S. malaccense*.

Soh e Parnell (2011) estudaram 81 espécies de *Syzygium* provenientes do Sudeste Asiático e do Sudoeste Pacífico e descreveram, com relação aos cristais, que, em algumas espécies, as drusas predominam e os cristais prismáticos são raros; em outras, são os cristais prismáticos que predominam e as drusas são raras; e ainda que existem espécies onde a ocorrência dos dois tipos de cristais é igual.

Figura 13 – Secções transversais da lâmina foliar de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sob microscopias eletrônica de varredura, óptica de luz e de polarização



A e F: microscopia eletrônica de varredura; B, C, E e G: microscopia óptica de luz; D e H: microscopia de polarização. A – E: nervura central; F – H: mesofilo. Abreviaturas: cs: cavidade secretora; dr: drusa; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fl: floema; fv: feixe vascular; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, B e F = 200 µm; C, D e E = 50 µm; G e H = 100 µm. Fonte: Autor próprio.

A Tabela 1 resume as informações encontradas sobre os cristais presentes nas oito espécies investigadas, utilizando microscopias óptica de luz e de polarização. A descrição dessas inclusões é de grande importância na diagnose de drogas vegetais (OLIVEIRA; AKISUE, 2009). Os formatos, locais e formas de hidratação desses cristais são específicos para cada espécie (GENUA; HILLSON, 1985; PRYCHID; RUDALL, 1999) e esta constância de forma e distribuição do cristal indica a forte regulação genética da deposição de cristais (ILARSLAN; PALMER; HORNER, 2001; WEINER; DOVE, 2003). De acordo com Franceschi e Nakata (2005), a morfologia dos cristais produzidos pode ser de um único tipo em toda a planta, ou vários tipos, sendo cada um específico para um determinado órgão, ou ainda vários tipos dentro de um mesmo órgão, mas em diferentes tecidos.

Drusas e cristais prismáticos foram os dois tipos de cristais que predominaram nas espécies estudadas. Apenas *M. charantia* apresentou um tipo de cristal diferente desses dois tipos citados. *A. muricata*, *A. squamosa* e *M. charantia* foram as únicas espécies que mostraram cristais em apenas um tecido. Nas demais espécies os cristais distribuem-se em mais de um tecido na lâmina foliar. Nenhuma espécie apresentou mais de um tipo de cristal na lâmina foliar.

Apesar de alguns autores afirmarem que a formação dos cristais está sob regulação genética, outros estudos apontam que a localização e o tamanho dos cristais podem ser afetados por fatores físicos, químicos e biológicos, tais como luz, temperatura, pH, concentração de íons e herbivoria (FRANCESCHI; HORNER, 1980; MOLANO-FLORES, 2001; KUO-HUANG; KU; FRANCESCHI, 2007; MERIÇ, 2009).

Na Tabela 1 encontram-se os valores dos tamanhos médios dos cristais determinados nas lâminas foliares das espécies em estudo. Dentre as drusas, as de menor diâmetro foram encontradas no floema de *A. heterophyllus* ($7,45 \mu\text{m} \pm 0,64$) e as de maior diâmetro foram encontradas no parênquima da nervura central de *A. altalis* ($24,65 \mu\text{m} \pm 2,43$). Dentre os cristais prismáticos, os de maior e menor comprimento e largura foram determinados em *A. bilimbi*, sendo os maiores localizados no parênquima esponjoso ($24,86 \mu\text{m} \pm 7,36$ de comprimento e $17,10 \mu\text{m} \pm 5,74$ de largura) e no floema ($7,01 \mu\text{m} \pm 0,54$ de comprimento e $4,85 \mu\text{m} \pm 1,01$ de largura), respectivamente.

Tabela 1 – Caracterização e tamanho dos cristais nas lâminas foliares das espécies *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L., *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, *Artocarpus heterophyllus* Lam., *Averrhoa bilimbi* L., *Mangifera indica* L., *Momordica charantia* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels

ESPÉCIE	TIPO DE CRISTAL	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO (μm)
<i>Annona muricata</i>	Drusa	Nervura central: parênquima	D: $9,61 \pm 1,16$
<i>Annona squamosa</i>	Drusa	Nervura central: parênquima	D: $11,81 \pm 1,66$
<i>Artocarpus altilis</i>	Drusa	Epiderme Nervura central: floema Nervura central: parênquima Mesofilo: parênquima paliçádico e bainha parenquimática	D: $10,41 \pm 1,01$ D: $8,92 \pm 1,61$ D: $24,65 \pm 2,43$ D: $9,46 \pm 0,94$
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Drusa	Epiderme Nervura central: floema Nervura central: parênquima Mesofilo: parênquima paliçádico e bainha parenquimática	D: $12,03 \pm 2,10$ D: $7,45 \pm 0,64$ D: $16,67 \pm 4,31$ D: $8,12 \pm 1,12$
<i>Averrhoa bilimbi</i>	Prismático	Nervura central: floema Nervura central: parênquima Mesofilo: paliçádico Mesofilo: esponjoso	C: $7,01 \pm 0,54$ L: $4,85 \pm 1,01$ C: $14,71 \pm 0,19$ L: $9,53 \pm 0,60$ C: $18,87 \pm 2,11$ L: $9,51 \pm 2,1$ C: $24,86 \pm 7,36$ L: $17,10 \pm 5,74$
<i>Mangifera indica</i>	Prismático	Nervura central: floema Nervura central: parênquima Mesofilo: parênquima paliçádico e esponjoso	C: $7,67 \pm 0,96$ L: $5,43 \pm 1,31$ C: $13,48 \pm 2,05$ L: $10,31 \pm 1,25$ C: $14,46 \pm 1,88$ L: $11,10 \pm 2,08$
<i>Momordica charantia</i>	Aglomerado	Face abaxial da epiderme	D: $47,28 \pm 6,05$
<i>Syzygium cumini</i>	Drusa	Nervura central: floema Nervura central: parênquima Mesofilo: parênquima esponjoso	D: $10,22 \pm 1,33$ D: $19,82 \pm 1,86$ D: $22,82 \pm 4,02$

D: diâmetro; C: comprimento; L: largura. Fonte: Autor próprio.

5.2 CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA

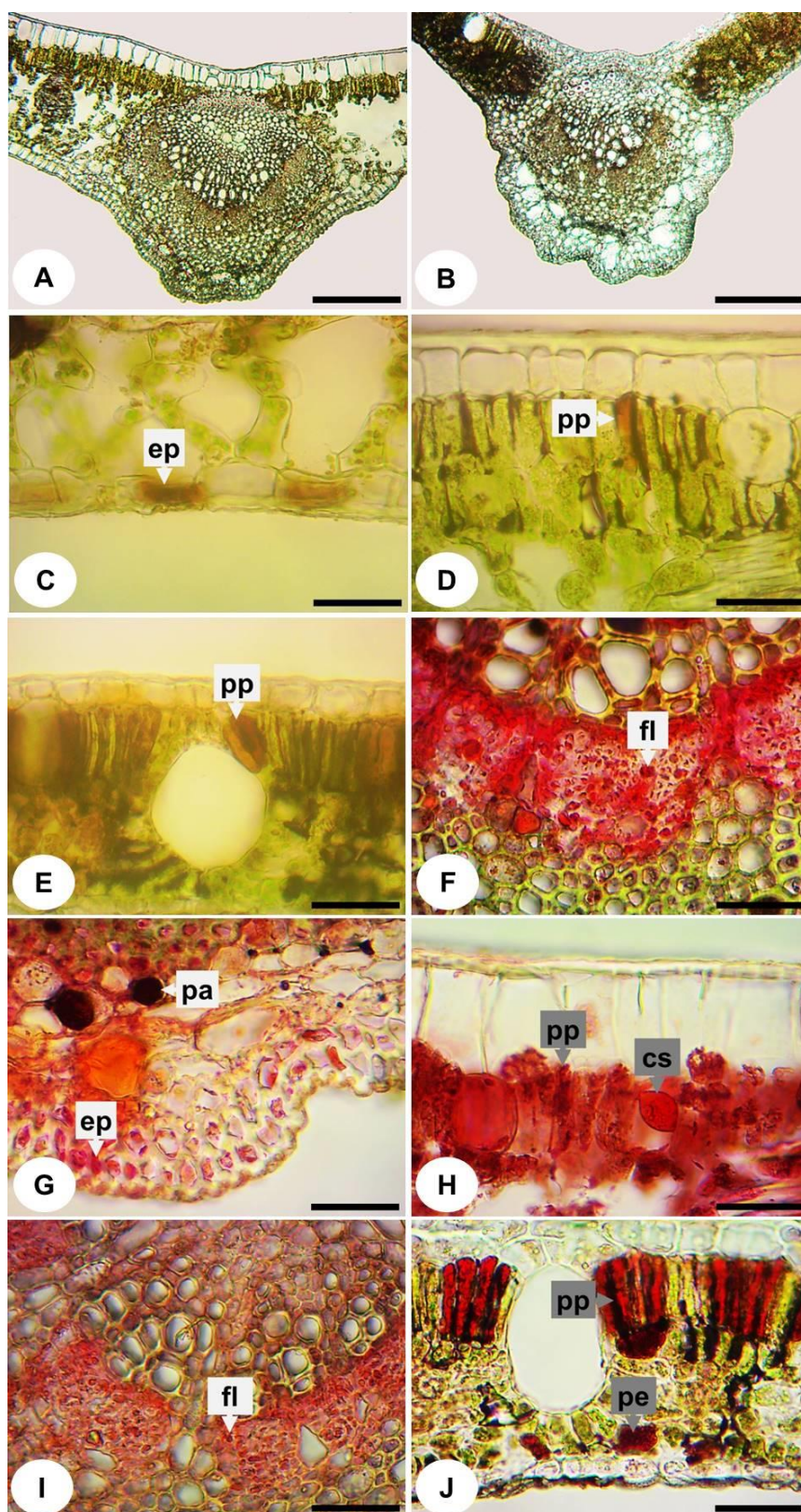
5.2.1 *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L.

A Figura 14A mostra a secção transversal da lâmina foliar de *A. muricata* e a Figura 14B mostra a secção transversal da lâmina foliar de *A. squamosa*, ambas sem adição de reagentes. Compostos fenólicos foram visualizados na epiderme (Figura 14C) e no parênquima paliçádico de *A. muricata* (Figura 14D) e no parênquima paliçádico de *A. squamosa* (Figura 14E). Taninos foram evidenciados no floema (Figura 14F), na epiderme (Figura 14G), no parênquima da nervura central (Figura 14G), no parênquima paliçádico (Figura 14H) e nas cavidades secretoras (Figura 14H) de *A. muricata*. Em *A. squamosa*, os taninos foram evidenciados no floema (Figura 14I) e nos parênquimas paliçádico e esponjoso (Figura 14J). Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de taninos e compostos fenólicos nas folhas das duas espécies (CHAVES, 1997; ALENCAR et al., 2010; GAVAMUKULYA et al., 2014; IYANDA-JOEL et al., 2016; MORAES et al., 2016).

Triterpenos e esteroides foram encontrados apenas em *A. muricata*, no parênquima da nervura central (Figura 15A). Alencar et al. (2010) não detectaram essa classe de metabólitos em *A. muricata*, porém, outros estudos fitoquímicos revelaram a presença de terpenos na espécie (GAVAMUKULYA et al., 2014; IYANDA-JOEL et al., 2016). Alcaloides foram observados nas cavidades secretoras e no floema de *A. muricata* (Figura 15B) e no parênquima da nervura central (Figura 15C) e no floema de *A. squamosa* (Figura 15D). A presença desses compostos nas folhas de *A. muricata* é relatada na literatura (CHAVES, 1997; GAVAMUKULYA et al., 2014) e Oviedo et al. (2009) correlacionaram sua presença à atividade ansiolítica de extratos de folhas da espécie.

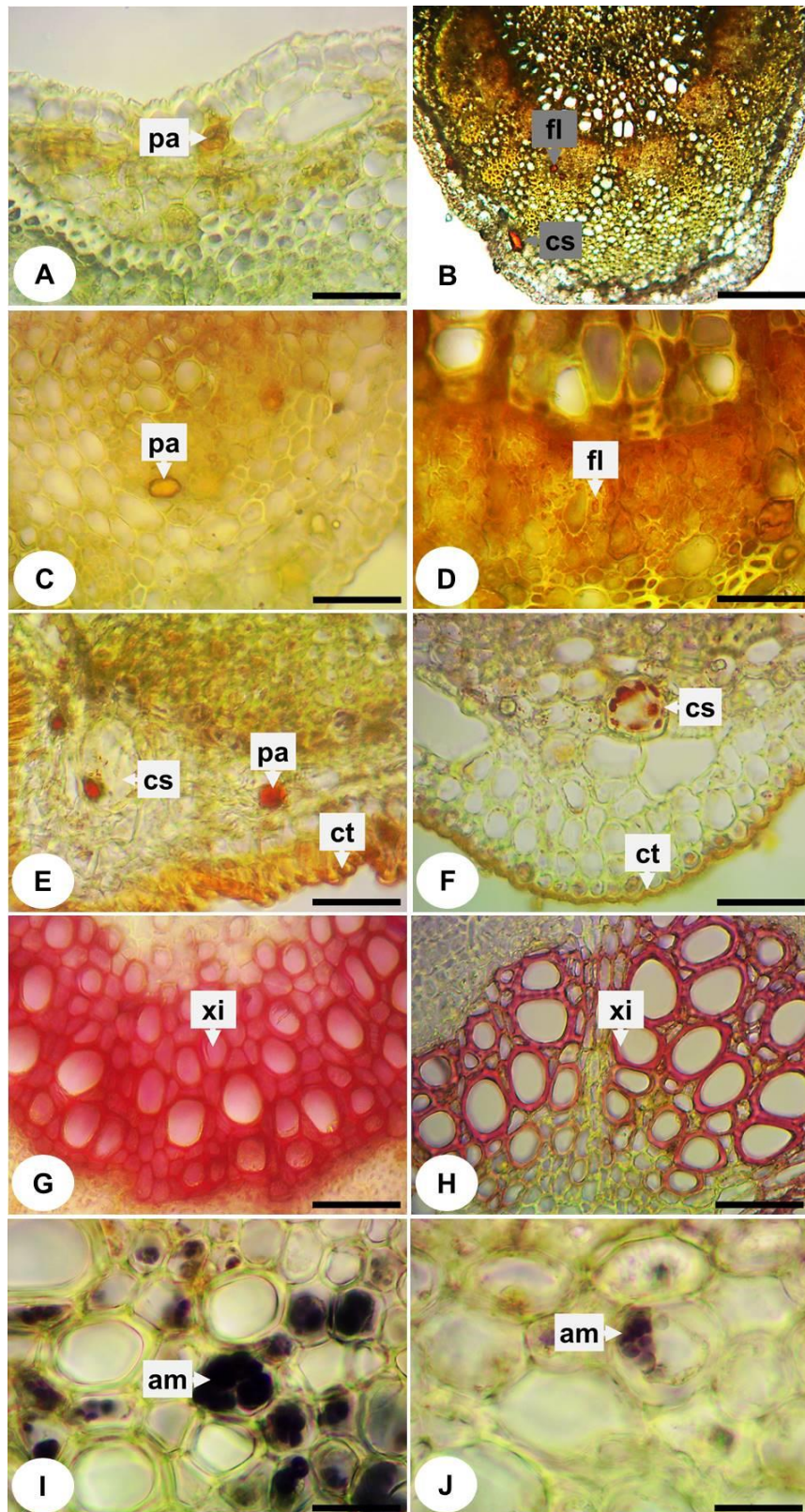
Compostos lipofílicos foram evidenciados nas cavidades secretoras e na cutícula de ambas as espécies (Figuras 15E e 15F), além de serem encontrados no parênquima da nervura central de *A. muricata* (Figura 15E). Nas duas espécies também foi encontrada lignina no xilema (Figuras 15G e 15H) e amido no parênquima da nervura central (Figuras 15I e 15J).

Figura 14 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. – parte 1



A, C, D, F, G e H: *Annona muricata*; B, E, I e J: *Annona squamosa*. A e B: controles; C – E: dicromato de potássio 10%; F – J: vanilina clorídrica. Abreviaturas: cs: cavidade secretora; ep: epiderme; fl: floema; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliádico. Barras: A e B = 200 μ m; C – J = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 15 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. – parte 2

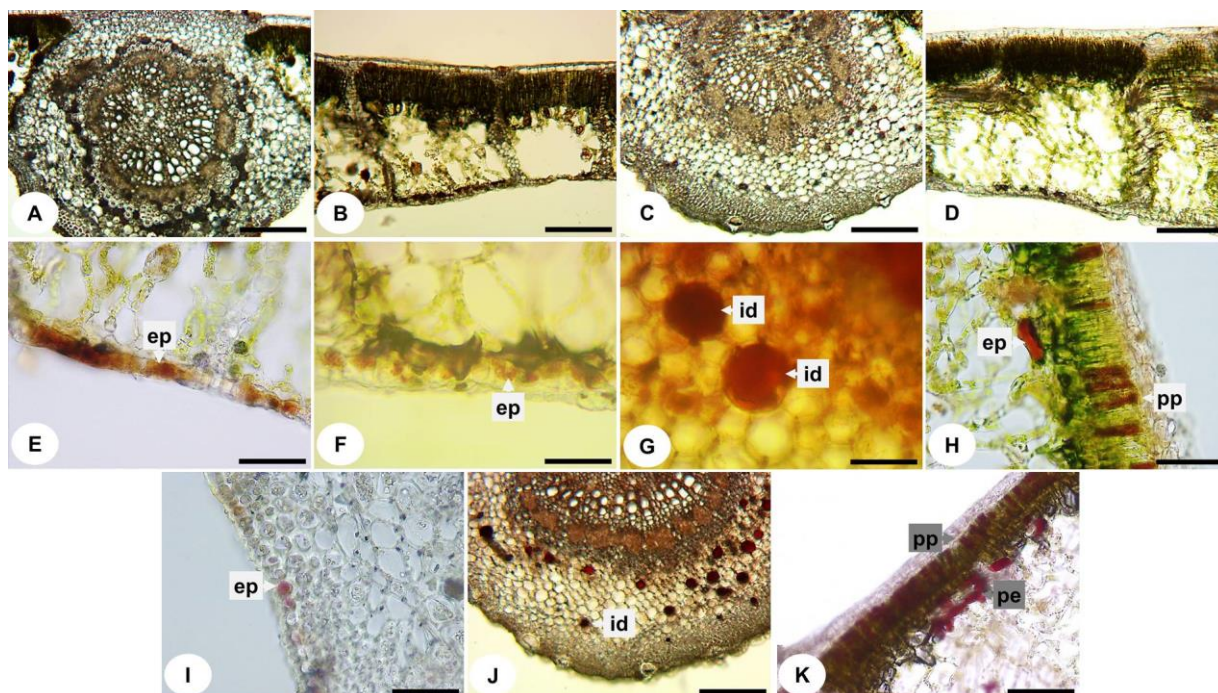


A, B, E, G e I: *Annona muricata*; C, D, F, H e J: *Annona squamosa*. A: tricloreto de antimônio; B – D: Dragendorff; E e F: Sudan III; G e H: floroglucinol; I e J: Lugol. Abreviaturas: am: amido; cs: cavidade secretora; ct: cutícula; fl: floema; pa: parênquima; xi: xilema. Barras: A, C, D, E, F, G, H, I e J = 50 µm; B = 200 µm. Fonte: Autor próprio.

5.2.2 *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam.

As Figuras 16A e 16B mostram as secções transversais da lâmina foliar de *A. altilis* e as Figuras 16C e 16D mostram as secções transversais de *A. heterophyllus* sem adição de reagentes. Compostos fenólicos foram evidenciados na epiderme de *A. altilis* (Figura 16E) e na epiderme, idioblastos, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso de *A. heterophyllus* (Figuras 16F, 16G e 16H). Vários compostos fenólicos, principalmente flavonoides, têm sido isolados a partir de folhas das duas espécies (LU et al., 2007; WANG et al., 2007; SHAMAUN et al., 2010; WANG et al., 2017). Taninos foram observados na epiderme de *A. altilis* (Figura 16I) e nos idioblastos, parênquima paliçádico e parênquima esponjoso de *A. heterophyllus* (Figuras 16J e 16K).

Figura 16 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam. – parte 1

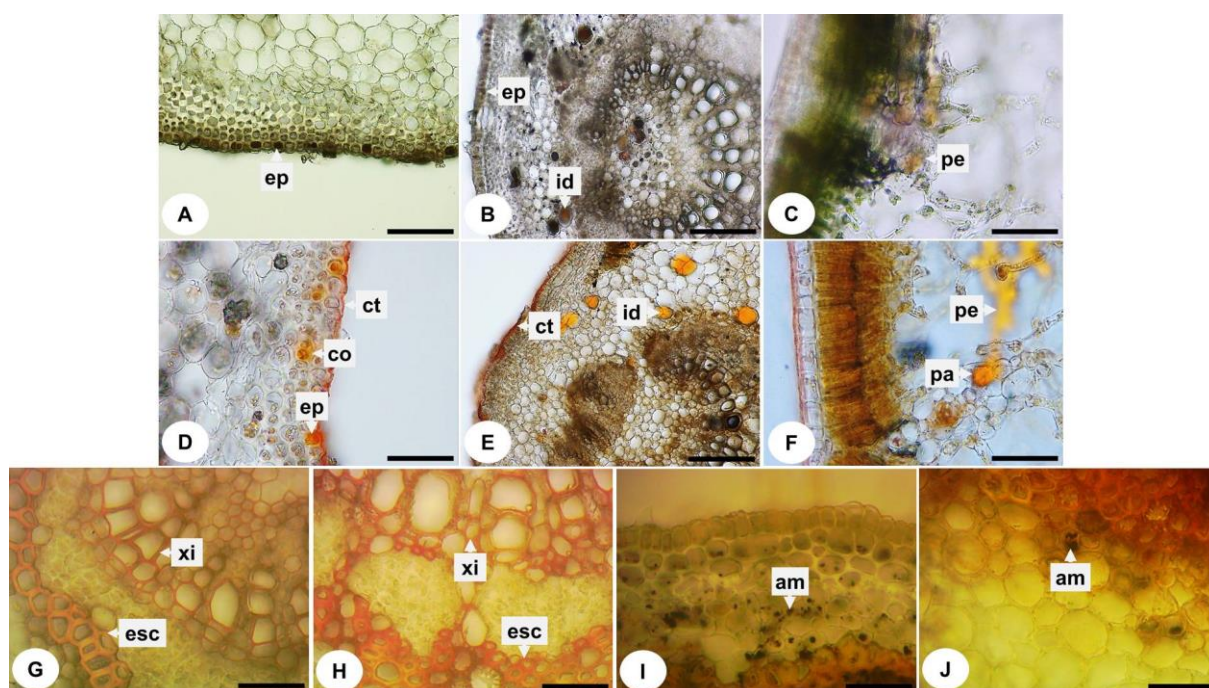


A, B, E e I: *Artocarpus altilis*; C, D, F, G, H, J e K: *Artocarpus heterophyllus*. A – D: controles; E – H: dicromato de potássio 10%; I – K: vanilina clorídrica. Abreviaturas: ep: epiderme; id: idioblasto; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: A, B, C, D e J = 200 µm; E, F, G e H = 50 µm; I e K = 100 µm. Fonte: Autor próprio.

Triterpenos e esteroides foram visualizados na epiderme de *A. altilis* (Figura 17A) e na epiderme, idioblastos e parênquima esponjoso de *A. heterophyllum* (Figuras 17B e 17C). Compostos lipofílicos foram revelados na cutícula, epiderme e colênquima de *A. altilis* (Figura 17D) e na cutícula, idioblastos, parênquima esponjoso e na bainha vascular parenquimática de *A. heterophyllum* (Figuras 17E e 17F). Nas duas espécies foram encontrados lignina no xilema e esclerênquima (Figuras 17G e 17H) e amido no parênquima (Figuras 17I e 17J). O teste para alcaloides foi negativo.

A presença de triterpenos e esteroides, além da ausência de alcaloides, foram relatadas por Periyannayagam e Karthikeyan (2013), através de testes fitoquímicos, nas folhas de *A. heterophyllum* coletada na Índia.

Figura 17 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllum* Lam. – parte 2



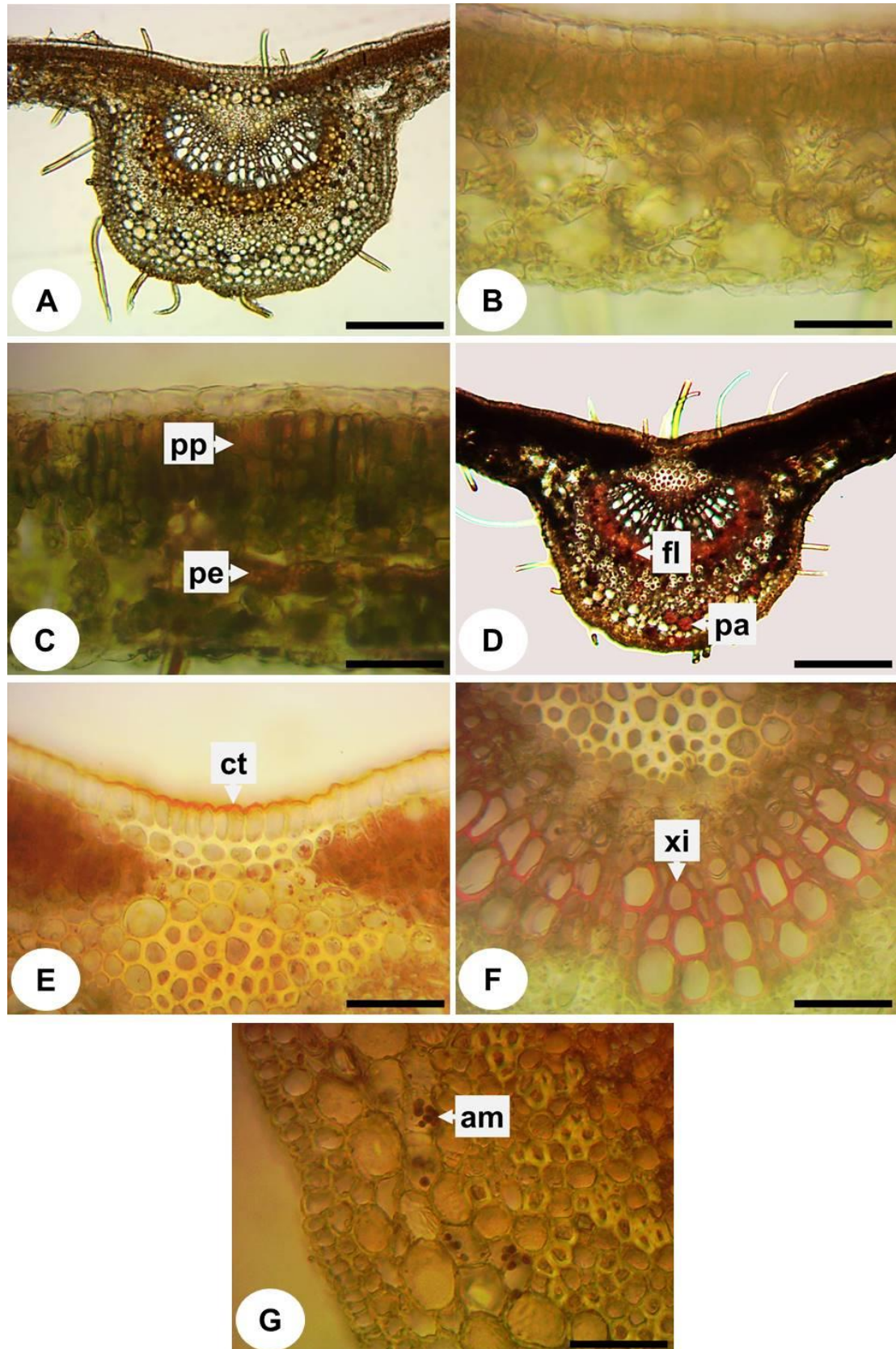
A, D, G e I: *Artocarpus altilis*; B, C, E, F, H e J: *Artocarpus heterophyllum*. A – C: tricloreto de antimônio; D – F: Sudan III; G e H: floroglucinol; I e J: Lugol. Abreviaturas: am: amido; co: colênquima; ct: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; id: idioblasto; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliádico; xi: xilema. Barras: A, B e E = 100 µm; C, D, F, G, H, I e J = 50 µm. Fonte: Autor próprio.

5.2.3 *Averrhoa bilimbi* L.

As Figuras 18A e 18B mostram secções transversais da lâmina foliar de *A. bilimbi* sem adição de reagente. Compostos fenólicos foram encontrados nos parênquimas paliçádico e esponjoso (Figura 18C). Taninos foram evidenciados no floema e no parênquima da nervura central (Figura 18D). Esses metabólitos já foram detectados nas folhas da espécie através de testes fitoquímicos (AZEEM; VRUSHABENDRASWAMI, 2015; RAMSAY; MUELLER-HARVEY, 2016; VALSAN; RAPHAEL, 2016).

A presença de compostos lipofílicos foi observada na cutícula (Figura 18E), bem como a presença de lignina no xilema (Figura 18F) e de amido no parênquima da nervura central (Figura 18G). Guedes (2009) realizou testes histoquímicos na lâmina foliar de *A. bilimbi* para compostos lipofílicos e amido e encontrou resultados semelhantes aos do presente estudo. Os testes para alcaloides, triterpenos e esteroides foram negativos. Alcaloides e triterpenos foram evidenciados em testes fitoquímicos realizados em folhas da espécie coletada na Índia (AZEEM; VRUSHABENDRASWAMI, 2015; VALSAN; RAPHAEL, 2016). Ashrafudoulla et al. (2016) detectaram alcaloides, através de testes fitoquímicos, em folhas da espécie coletadas em Bangladesh e Karon et al. (2011) detectaram alcaloides e esteroides em testes fitoquímicos com extrato etanólico nas partes aéreas de *A. bilimbi*, também coletada em Bangladesh.

Figura 18 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Averrhoa bilimbi* L.

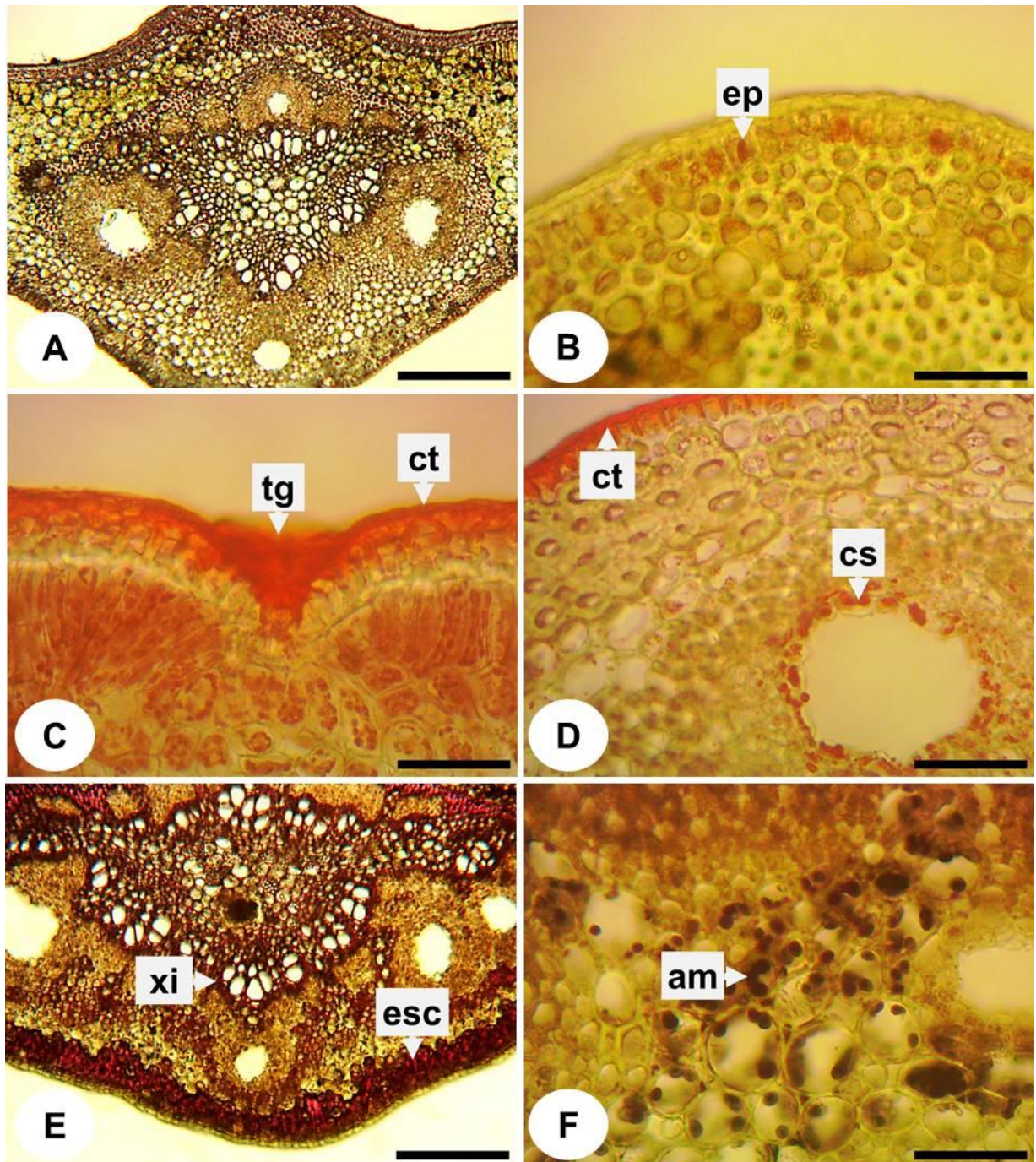


A e B: controles; C: dicromato de potássio 10%; D: vanilina clorídrica; E: Sudan III; F: floroglucinol; G: Lugol. Abreviaturas: am: amido; ct: cutícula; fl: floema; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema. Barras: A e D = 100 μ m; B, C, E, F e G = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

5.2.4 *Mangifera indica* L.

A Figura 19A mostra a secção transversal da lâmina foliar de *M. indica* sem adição de reagentes. Compostos fenólicos foram evidenciados na epiderme (Figura 19B) e compostos lipofílicos na cutícula (Figuras 19C e 19D), nos tricomas glandulares (Figura 19D) e nas cavidades secretoras (Figura 19D). A lignina foi encontrada no xilema e no esclerênquima (Figura 19E) e amido foi encontrado no parênquima da nervura central (Figura 19F). Os testes para alcaloides, taninos, triterpenos e esteroides foram negativos, o que diverge da literatura (OKWU; EZENAGU, 2008; HELEN et al., 2013; SOMKUWAR; KAMBLE, 2013; NWANKWO; OSARO-MATHEW, 2014; DHITAL et al., 2017; DISO et al., 2017; DIVYALASHMI; SHARMILI, 2017. Porém, nesses trabalhos onde foram identificados esses metabólitos foram realizados testes fitoquímicos e a espécie foi coletada em diferentes épocas e países.

Figura 19 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Mangifera indica* L.



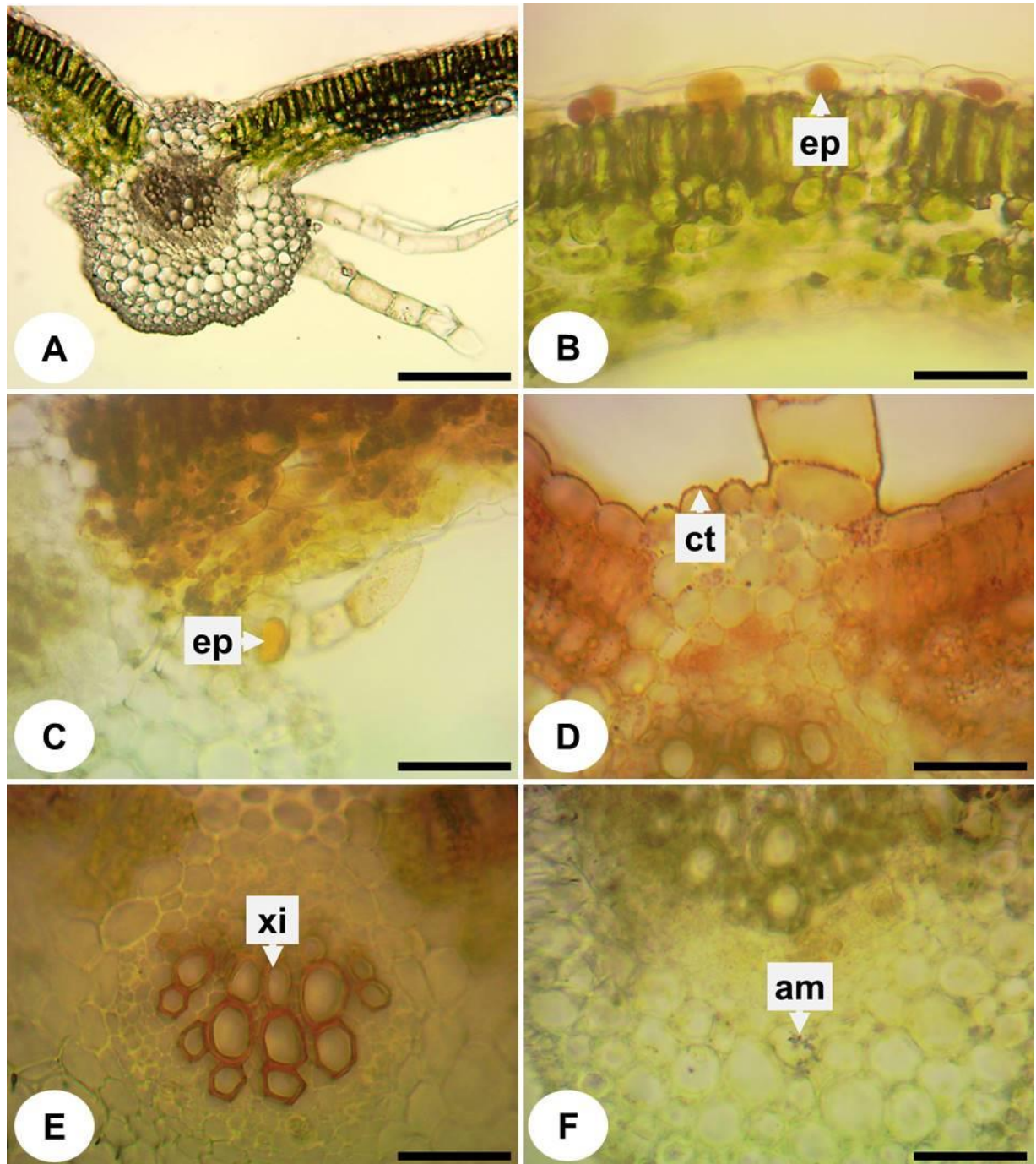
A: controle; B: dicromato de potássio 10%; C e D: Sudan III; E: floroglucinol; F: Lugol. Abreviaturas: am: amido; cs: cavidade secretora; ct: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; tg: tricoma glandular; xi: xilema. Barras: A e E = 200 μ m; B, C, D e F = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

5.2.5 *Momordica charantia* L.

A Figura 20A mostra a secção transversal da lâmina foliar de *M. charantia* sem adição de reagente. Compostos fenólicos foram encontrados nas células epidérmicas (Figura 20B). Além dos compostos fenólicos, alcaloides foram encontrados nas células epidérmicas (Figura 20C). Compostos lipofílicos foram evidenciados na cutícula (Figura 20D), lignina no xilema (Figura 20E) e amido no parênquima da nervura central (Figura 20F).

Não foram encontrados, na literatura, estudos histoquímicos com a lâmina foliar de *M. charantia*. Entretanto, estudos fitoquímicos indicaram a presença de flavonoides, taninos, terpenos e alcaloides (ALENCAR et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010). No presente estudo, taninos e terpenos não foram evidenciados através da histoquímica. Essa divergência com a literatura pode ser explicada pela diferença entre as técnicas empregadas.

Figura 20 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Momordica charantia* L.



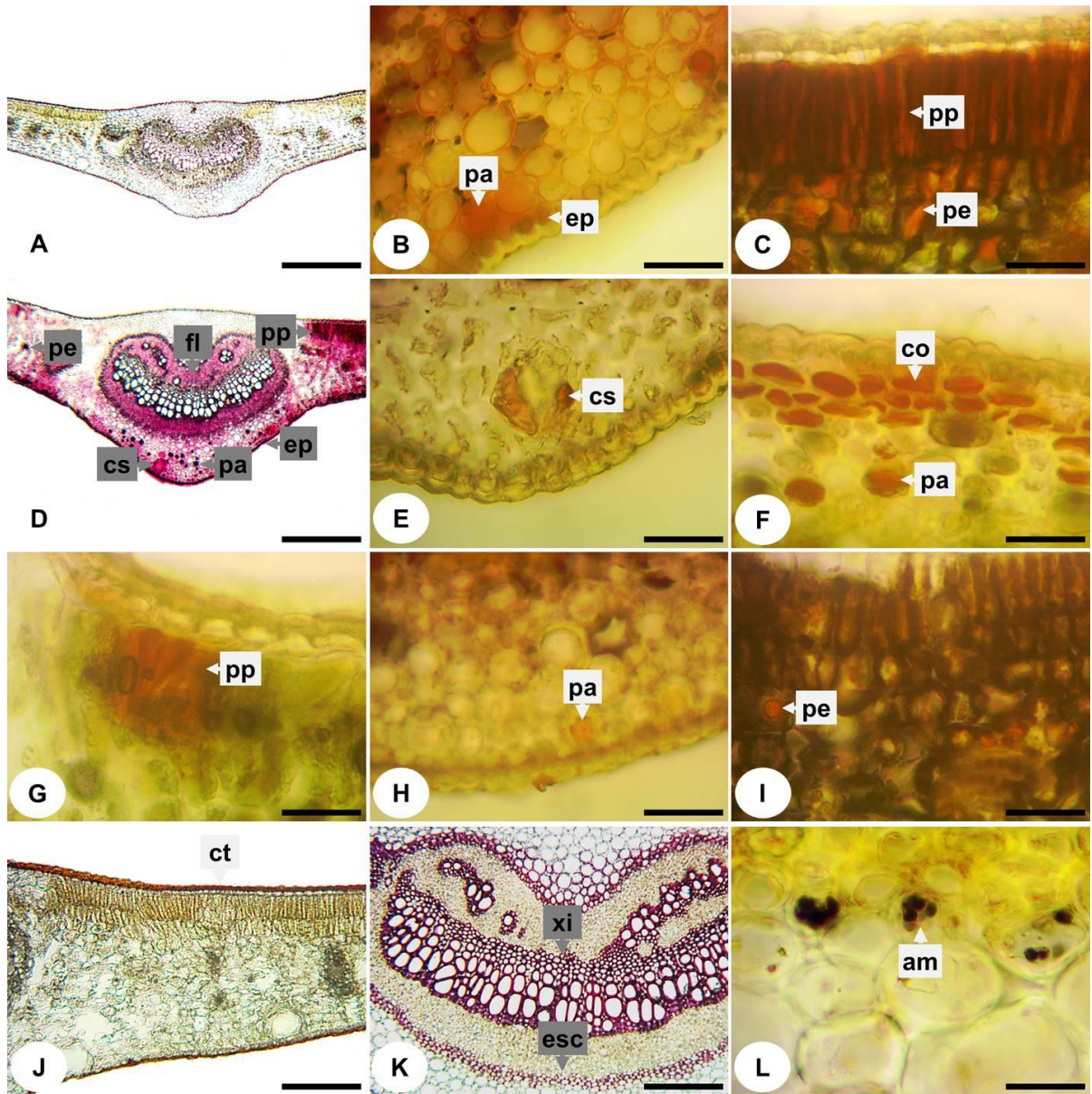
A: controle; B: dicromato de potássio 10%; C: Dragendorff; D: Sudan III; E: floroglucinol; F: Lugol. Abreviaturas: am: amido; ct: cutícula; ep: epiderme; xi: xilema. Barras: A = 200 µm; B – F = 50 µm. Fonte: Autor próprio.

5.2.6 *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A Figura 21A mostra a secção transversal da lâmina foliar de *S. cumini* sem adição de nenhum reagente. Compostos fenólicos foram evidenciados na epiderme (Figura 21B), no parênquima da nervura central (Figura 21B), nos parênquimas paliçádico e esponjoso (Figura 21C). Taninos foram encontrados nos mesmo locais onde foram observados os compostos fenólicos, além de também serem visualizados no floema e nas cavidades secretoras (Figura 21D). Triterpenos e esteroides foram identificados nas cavidades secretoras (Figura 21E), no colênquima (Figura 21F), no parênquima da nervura central (Figura 21F) e no parênquima paliçádico (Figura 21G). A presença de compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides corroboram investigações fitoquímicas da literatura (RUGGIERO, 2004; ITANKAR et al., 2015; VEBER et al., 2015; SANCHES et al., 2016).

Alcaloides foram visualizados no parênquima da nervura central (Figura 21H) e no parênquima esponjoso (Figura 21I). Ramos e Bandiola (2017) detectaram alcaloides, através de testes fitoquímicos, em extratos de folhas de *S. cumini* coletadas nas Filipinas. Compostos lipofílicos foram evidenciados na cutícula (Figura 21J) e a lignina foi evidenciada no xilema e esclerênquima (Figura 21K). De acordo com Oliveira e Akisue (2009), a lignina normalmente está presente nos elementos do feixe vascular. A presença de amido foi demonstrada nas células parenquimáticas da nervura central (Figura 21L).

Figura 21 – Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



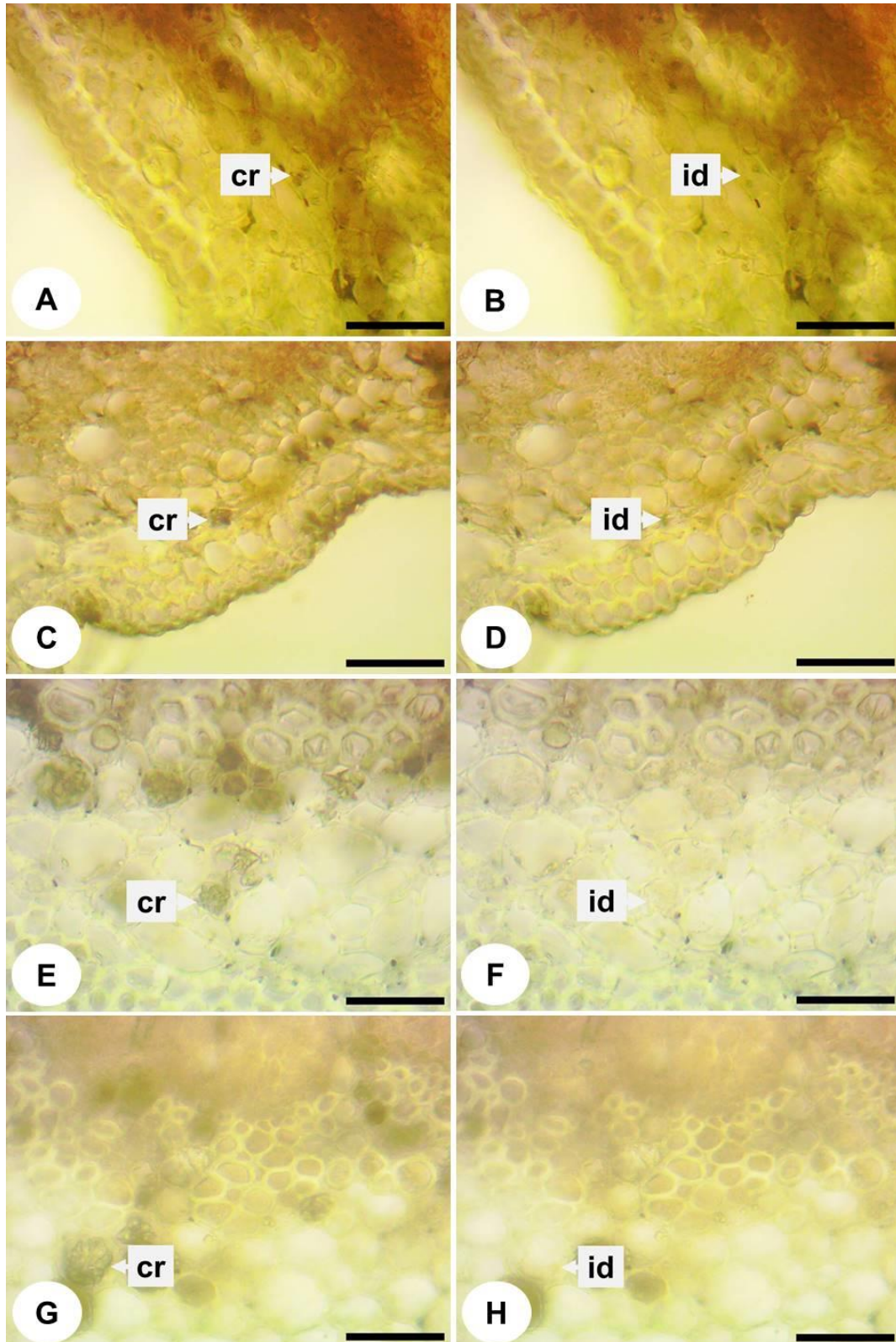
A: controle; B e C: dicromato de potássio 10%; D: vanilina clorídrica; E, F e G: tricloreto de antimônio; H e I: Dragendorff; J: Sudan III; K: floroglucinol; L: Lugol. Abreviaturas: am: amido; co: colênquima; cs: cavidade secretora; ct: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fl: floema; pa: parênquima; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema. Barras: A e D = 500 µm; B, C, E, F, G, H e I = 50 µm; J e K = 200 µm; L = 20 µm. Fonte: Autor próprio.

5.2.7 Cristais

Todas as espécies foram submetidas ao teste histoquímico com ácido clorídrico 10%. Foram capturadas imagens das lâminas foliares evidenciando os cristais antes (Figuras 22A, 22C, 22E, 22G, 22I, 23A, 23C, 23E, 23G e 23I) e após a adição do reagente (Figuras 22B, 22D, 22F, 22H, 23B, 23D, 23F e 23H). Assim, as figuras mostram que, após a adição do reagente, os cristais nas amostras de todas as espécies foram dissolvidos, porém, sem formar bolhas, o que indica que eles são de oxalato de cálcio (JENSEN, 1962).

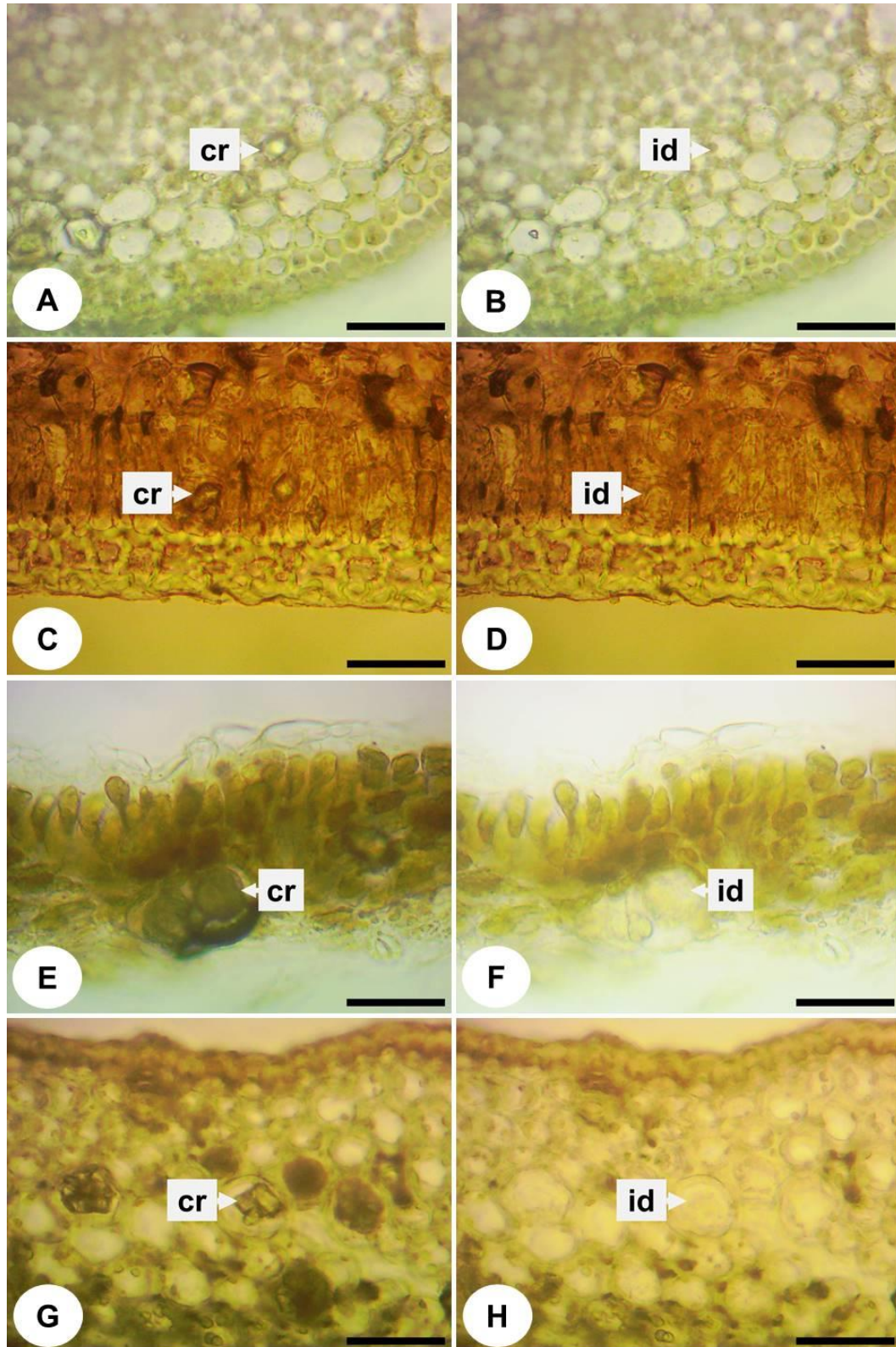
Estudos com *Artocarpus heterophyllus* (PERIYANAYAGAM; KARTHIKEYAN (2013), *Averrhoa bilimbi* (GUEDES, 2009), *Momordica charantia* (COUTINHO et al., 2009) e *Syzygium cumini* (SIQUEIRA-NUNES; MARTINS, 2010) afirmam que os cristais observados nas lâminas foliares das espécies em estudo são de oxalato de cálcio, porém, não há indicação de que foi realizado teste histoquímico para os cristais.

Figura 22 – Caracterização histoquímica dos cristais nas lâminas foliares de *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L., *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg e *Artocarpus heterophyllus* Lam. sob MOL



A e B: *Annona muricata*; C e D: *Annona squamosa*; E e F: *Artocarpus altilis*; G e H: *Artocarpus heterophyllus*. Abreviaturas: cr: cristal; id: idioblasto. Barras: A – H = 50 µm. Fonte: Autor próprio.

Figura 23 – Caracterização histoquímica dos cristais nas lâminas foliares de *Averrhoa bilimbi* L., *Mangifera indica* L., *Momordica charantia* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels sob MOL



A e B: *Averrhoa bilimbi*; C e D: *Mangifera indica*; E e F: *Momordica charantia*; G e H: *Syzygium cumini*. Abreviaturas: cr: cristal; id: idioblasto. Barras: A – H = 50 μ m. Fonte: Autor próprio.

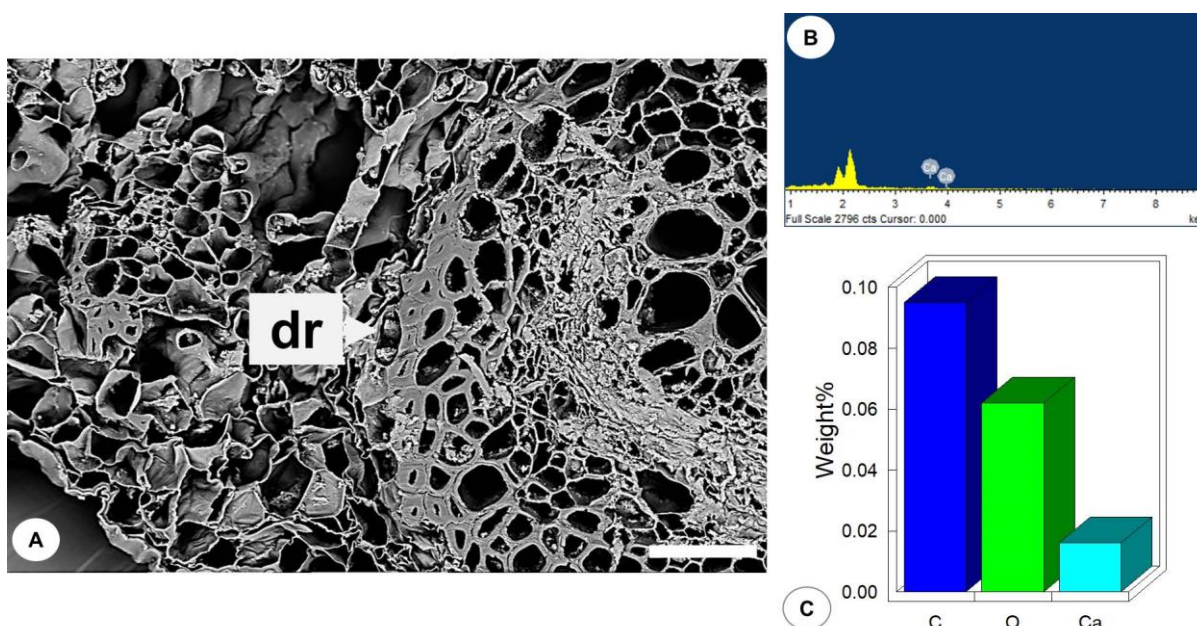
5.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS

Através da análise sob MEV-EDS foi possível identificar que a composição química dos cristais presentes em todas as espécies estudadas é de oxalato de cálcio (Figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31).

O ácido oxálico é um ácido orgânico amplamente distribuído em vários organismos e um componente natural de um grande número de plantas. Ocorre como ácido livre, como sais solúveis de potássio e de sódio e como sais insolúveis de cálcio, magnésio e ferro (NOONAN; SAVAGE, 1999). A fração insolúvel é, predominantemente, composta por oxalato de cálcio e, em algumas plantas, formam cristais (NAKATA, 2003).

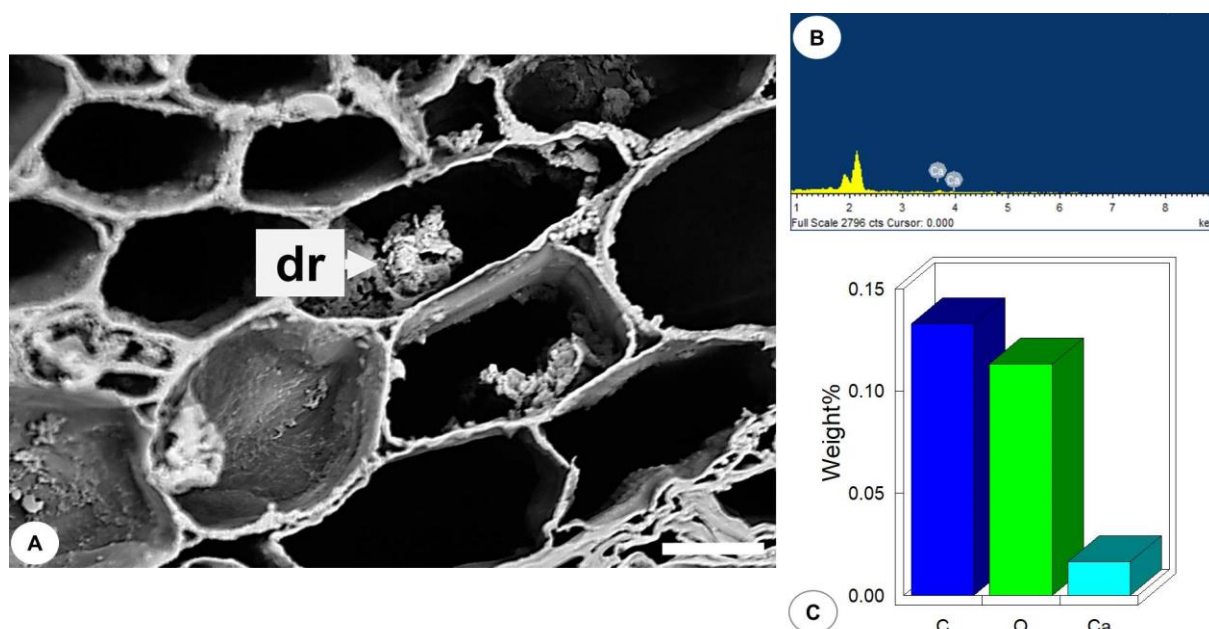
Glicolato, glioxilato, oxaloacetato, citrato e ácido ascórbico foram propostos como precursores do ácido oxálico em plantas (CHANG; BEEVERS, 1968; CHANG; HUANG, 1981; HORNER; KAUSCH; WAGNER, 2000; KOSTMAN et al., 2001). Estudos mostraram que o ácido oxálico é sintetizado em resposta ao aumento de cálcio (ÇALIŞKAN, 2000; KEATES et al., 2000). O oxalato de cálcio é um produto onde os íons de cálcio são obtidos no meio ambiente e os íons de oxalato são provenientes do metabolismo das plantas (ILARSLAN et al., 1997).

Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Annona muricata* L.



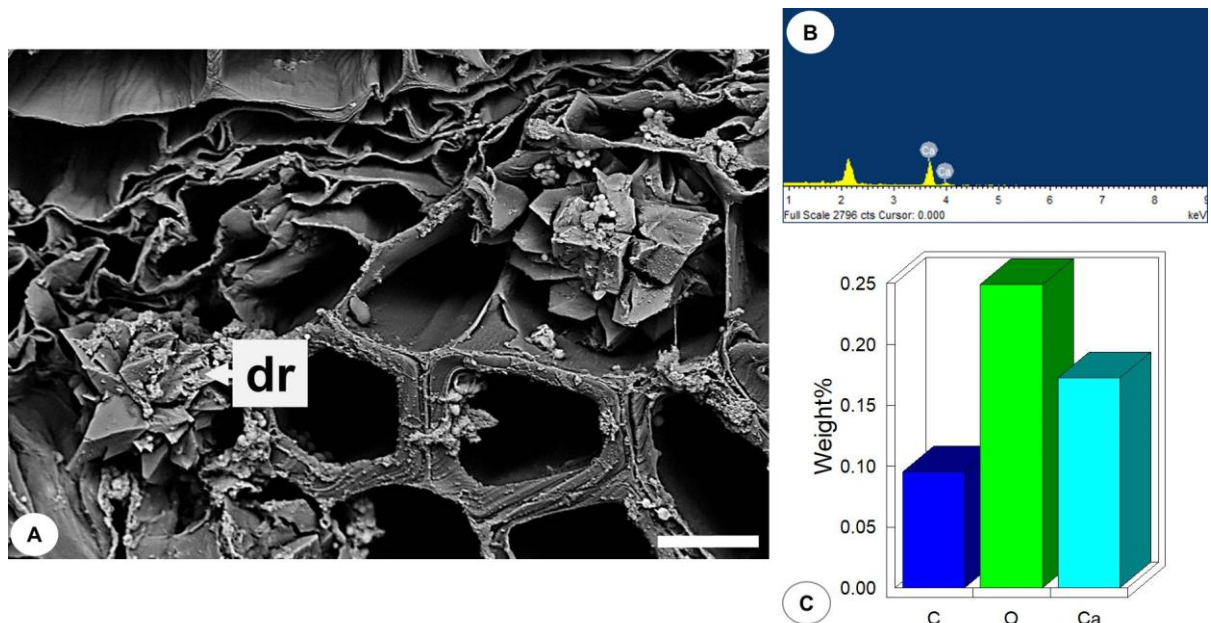
A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: dr: drusa. Barra: A = 30 µm. Fonte: Autor próprio.

Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Annona squamosa* L.



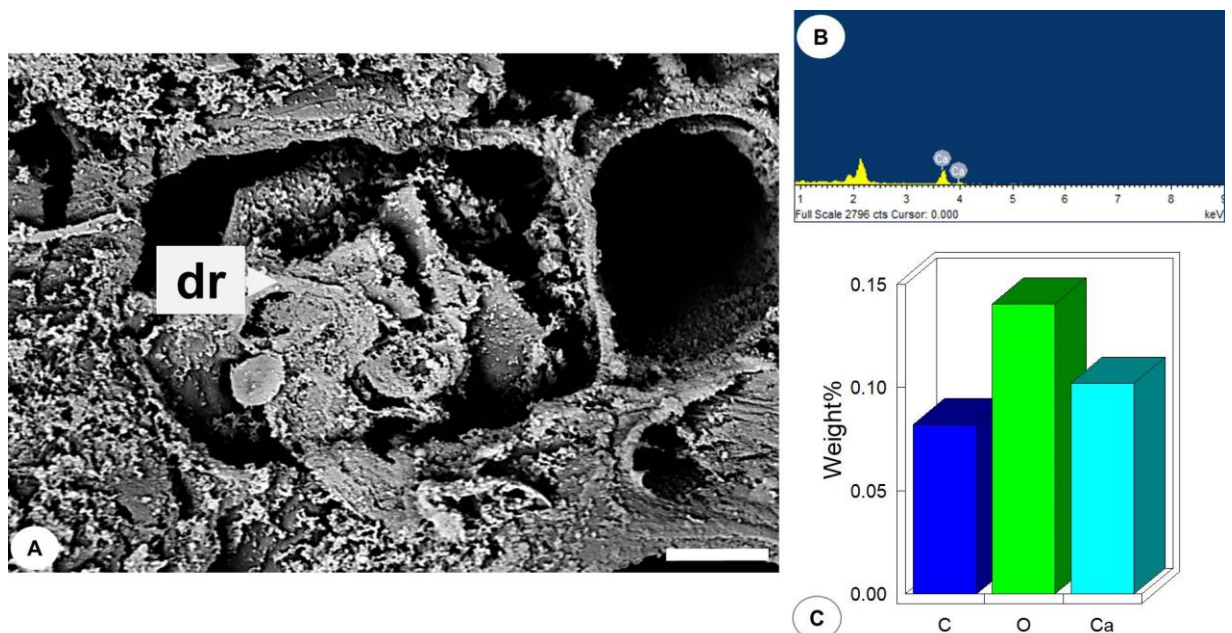
A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: dr: drusa. Barra: A = 6 µm. Fonte: Autor próprio.

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg



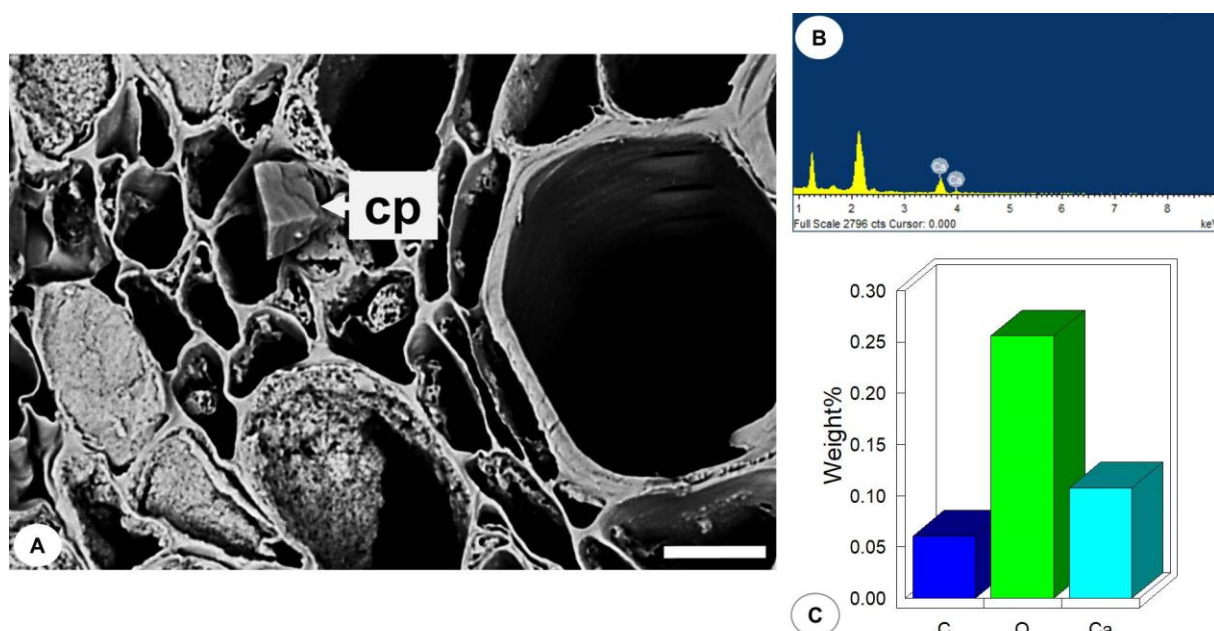
A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: dr: drusa. Barra: A = 6 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Artocarpus heterophyllus* Lam.



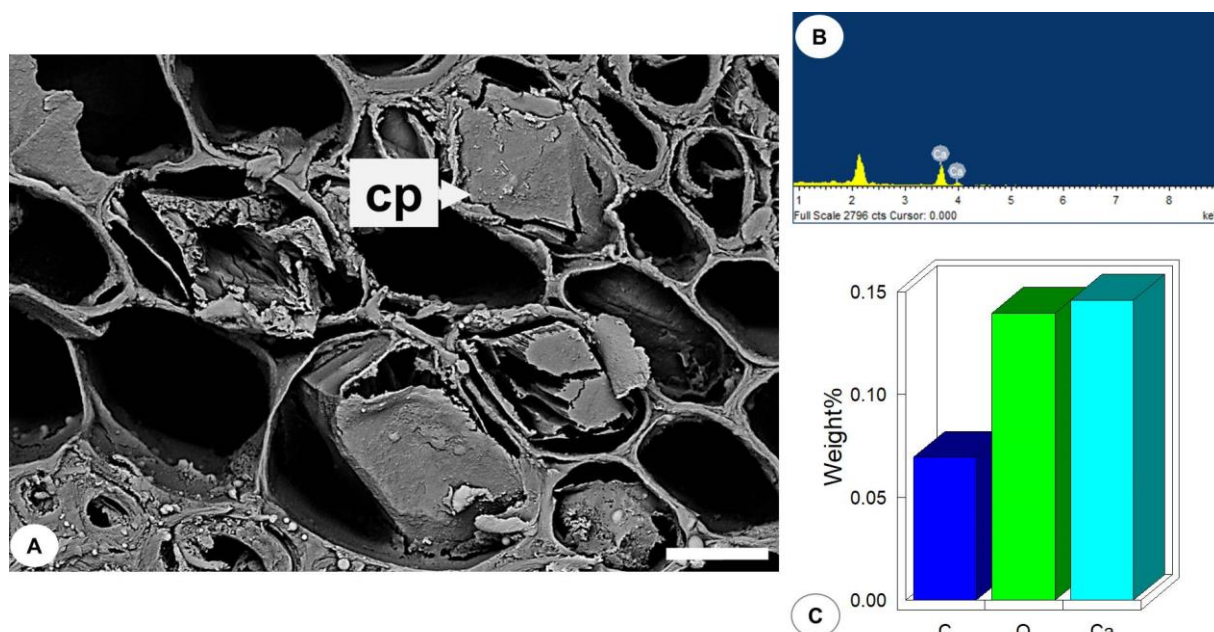
A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: dr: drusa. Barra: A = 2 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Averrhoa bilimbi* L.



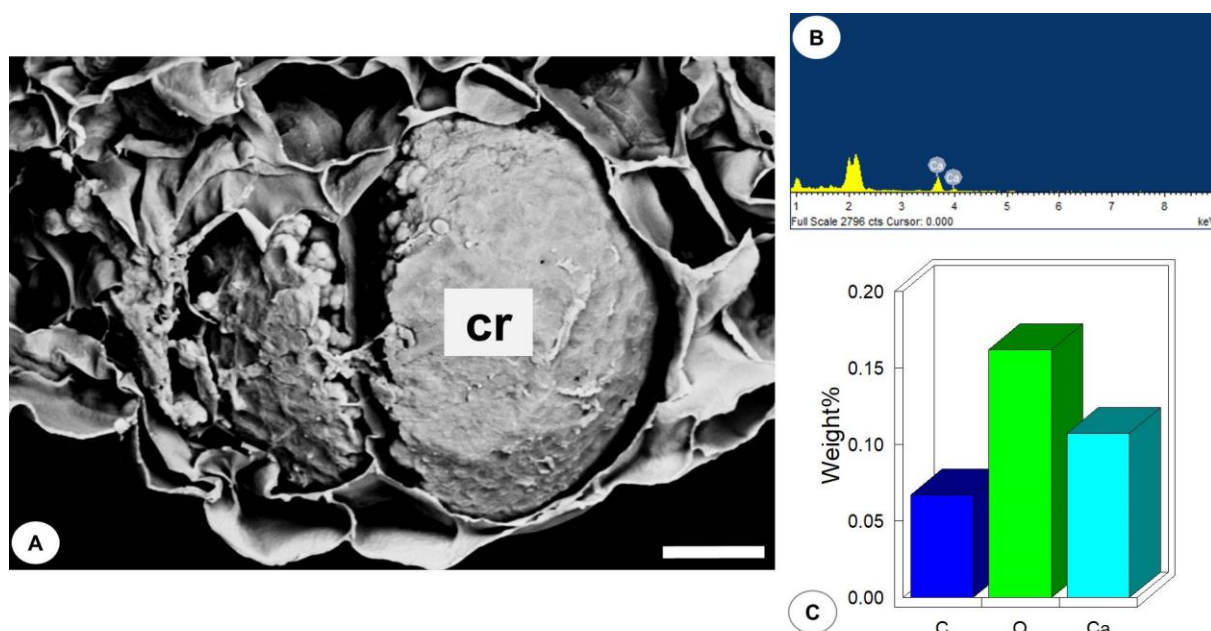
A: cristal prismático; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: cp: cristal prismático. Barra: A = 4 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Mangifera indica* L.



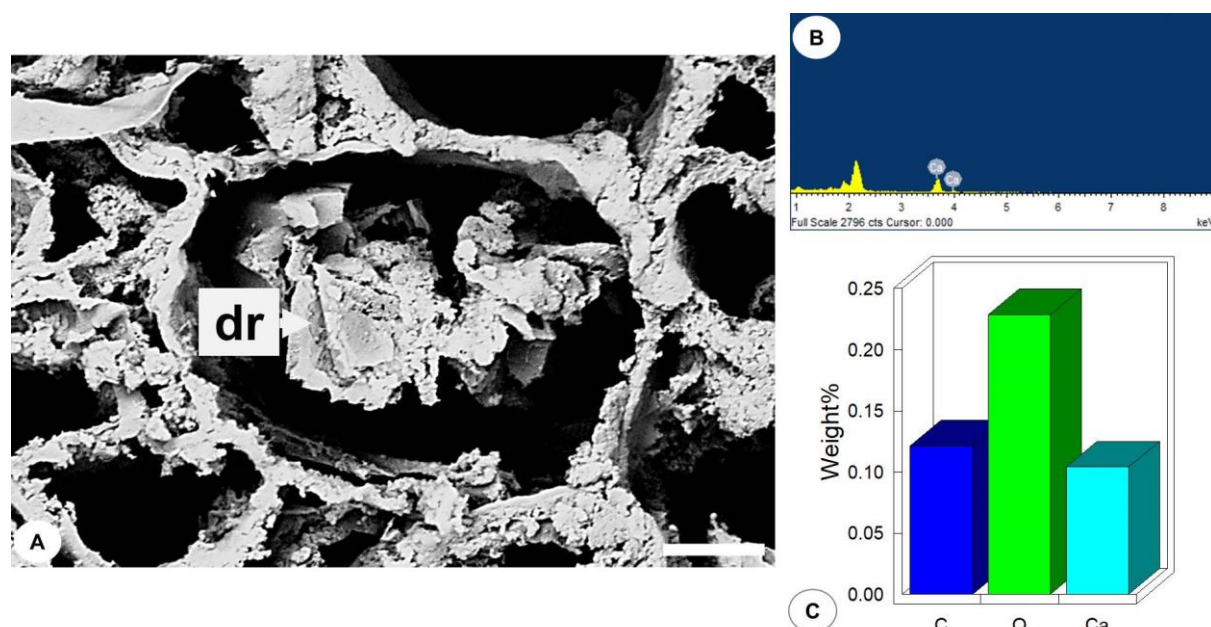
A: cristal prismático; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: cp: cristal prismático. Barra: A = 6 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Momordica charantia* L.



A: cristal; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: cr: cristal. Barra: A = 10 μ m. Fonte: Autor próprio.

Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Syzygium cumini* (L.) Skeels



A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal. Abreviaturas: dr: drusa. Barra: A = 2 μ m. Fonte: Autor próprio.

5.4 DOSEAMENTO DE ÁCIDO OXÁLICO

As concentrações médias de oxalato determinadas nas lâminas foliares das espécies estudadas encontram-se na Tabela 2. Apesar de *A. bilimbi* ser uma espécie da família Oxalidaceae, a qual é conhecida por apresentar plantas que acumulam ácido oxálico em seus tecidos, ela não foi a espécie que apresentou o maior teor de oxalato total dentre as oito espécies analisadas. O maior valor de oxalato total foi encontrado em *A. altilis* ($6,35 \pm 0,12$ g/100 g de matéria seca) e o menor valor em *M. charantia* ($3,67 \pm 0,05$ g/100 g de matéria seca). Com relação aos teores de oxalato solúvel, *M. indica* apresentou o maior valor ($5,12 \pm 0,29$ g/100 g de matéria seca) e *M. charantia* o menor ($2,16 \pm 0,12$ g/100 g de matéria seca). Os teores de oxalato insolúvel são obtidos diminuindo o valor de oxalato total do valor do oxalato solúvel. O maior valor de oxalato insolúvel foi identificado em *A. altilis* (2,71 g/100 g de matéria seca) e o menor em *A. heterophyllus* (0,85 g/100 g de matéria seca).

Tabela 2 – Concentrações médias (g/100 g de matéria seca) de oxalatos nas lâminas foliares das espécies *Annona muricata* L., *Annona squamosa* L., *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, *Artocarpus heterophyllus* Lam., *Averrhoa bilimbi* L., *Mangifera indica* L., *Momordica charantia* L. e *Syzygium cumini* (L.) Skeels

ESPÉCIE	OXALATO TOTAL	OXALATO SOLÚVEL	OXALATO INSOLÚVEL
<i>Annona muricata</i>	$5,64 \pm 0,28$	$4,65 \pm 0,09$	0,99
<i>Annona squamosa</i>	$6,27 \pm 0,24$	$4,17 \pm 0,27$	2,10
<i>Artocarpus altilis</i>	$6,35 \pm 0,12$	$3,64 \pm 0,19$	2,71
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	$4,71 \pm 0,21$	$3,86 \pm 0,46$	0,85
<i>Averrhoa bilimbi</i>	$5,45 \pm 0,28$	$3,38 \pm 0,11$	2,07
<i>Mangifera indica</i>	$6,33 \pm 0,17$	$5,12 \pm 0,29$	1,21
<i>Momordica charantia</i>	$3,67 \pm 0,05$	$2,16 \pm 0,12$	1,51
<i>Syzygium cumini</i>	$4,48 \pm 0,08$	$3,40 \pm 0,06$	1,08

Fonte: Autor próprio.

Os resultados mostram que, apesar de algumas espécies pertencerem a um mesmo gênero, elas apresentam diferentes conteúdos de oxalato. O teor médio de

oxalato total nas oito espécies variou de 3,67 a 6,35 g/100 g de matéria seca, que é muito maior que o teor de oxalato de alimentos diários, como farinhas (37 a 269 mg/100 g de matéria seca), nozes (42 a 469 mg/100 g de matéria seca) (CHAI; LIEBMAN, 2005), pães (16,5 a 45,9 mg/100 g de matéria seca), biscoitos (23,7 a 384 mg/100 g de matéria seca) (OKOMBO; LIEBMAN, 2010) e massas (20 a 30 mg/100 g de matéria seca) (LIEBMAN; OKOMBO, 2009).

Schroder; Vanhanen e Savage (2011) coletaram 15 amostras de cacau em pó disponíveis, comercialmente, em quatro países, e 34 amostras de chocolate preto, provenientes de 13 países, e analisaram o teor de oxalato total e oxalato solúvel. O teor de oxalato total nas amostras de cacau em pó variou de 650 a 783 mg/100 g de matéria seca e o teor de oxalato solúvel variou de 360 a 567 mg/100 g de matéria seca. No chocolate preto, o teor de oxalato total variou de 155 a 485 mg/100 g de matéria seca e o teor de oxalato solúvel variou de 157 a 351 mg/100 g.

Siener et al. (2017) analisaram a quantidade de oxalato em uma variedade de bebidas alcoólicas e não alcoólicas. As concentrações de oxalato foram de 3,21 a 6,34 mg/100 mL em chás verdes e pretos, 0,28 a 1,96 mg/100 mL em chás gelados e 0,08 a 1,82 mg/100 mL em chás de ervas. O teor de oxalato variou entre cerveja e vinho, variando de 0,30 mg/100 mL em vinho branco a 1,78 mg/100 mL em cerveja não alcoólica.

Siener et al. (2016) avaliaram o teor de oxalato em sucos de frutas e vegetais, néctares e drinques. As maiores concentrações de oxalato foram encontradas no néctar de ruibarbo (198,3 mg/100 mL) e sucos de beterraba (60,1 a 70,0 mg/100 mL). Nguyen e Savage (2013) determinaram o teor de oxalato total em frutas comumente consumidas na Nova Zelândia e verificaram as maiores concentrações em *Phyllanthus emblica* L. (7,566 g/100 g de matéria seca), *Averrhoa carambola* L. (0,4361 g/100 g de matéria seca) e *Rheum rhabarbarum* L. (0,6402 g/100 g de matéria seca).

Huang; Huang e Liebman (2015) pesquisaram o teor de oxalato em 22 espécies comumente utilizadas na medicina chinesa. Os autores observaram uma variação significativa no teor de oxalato entre as espécies, sendo que *Houttuynia cordata* (3,204 g/100 g de matéria seca) e *Folium eriobotryae* (3,203 g/100 g de matéria seca) apresentaram os maiores valores de oxalato total e *Houttuynia cordata* (2,146 g/100 g de matéria seca) e *Eclipta prostrata* (1,218 g/100 g de matéria seca) apresentaram os maiores valores de oxalato solúvel.

Siener et al. (2006) analisaram os teores de oxalato total e oxalato solúvel em diferentes partes de espécies de Polygonaceae, Amaranthaceae e Chenopodiaceae. O maior teor de oxalato foi encontrado em folhas e caules das plantas nessas 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.

Não foram encontrados na literatura dados sobre o teor de oxalato nas folhas das espécies estudadas. Wagner et al. (1975) determinaram o teor de oxalato em frutos de carambolas (*Averrhoa carambola*) de 18 cultivares dos Estados Unidos e encontraram teores médios (mg/100g de fruto fresco) variando de 39 mg a 679 mg. Joseph e Mendonça (1989) investigaram o teor de oxalato nos frutos verdes e maduros da carambola azeda e doce (*Averrhoa carambola*) e nos frutos verdes e maduros do biribiri (*Averrhoa bilimbi*) coletados na Guiana. Os níveis mais elevados de oxalato foram encontrados nos frutos verdes de ambas as espécies. Na carambola azeda, o teor médio (mg/100g de fruto fresco) variou de 3,79 a 5,9, na carambola doce variou de 0,18 a 1,4 e no biribiri variou de 8,45 a 11,20.

Poucos são os estudos que realizaram a determinação de oxalato através de titulação. Esses estudos foram voltados para hortaliças, como espinafre, maxixe, jiló, feijão verde e feijão andu (SANTOS, 2006; AZEVEDO, 2012; BENEVIDES et al., 2013). Os valores médios (mg/100 g de matéria seca) encontrados nos vegetais *in natura* foram: maxixe ($1,44 \pm 0,00$), jiló ($3,58 \pm 0,08$), feijão verde ($4,92 \pm 0,03$) e feijão andu ($0,48 \pm 0,04$) (BENEVIDES et al., 2013). No espinafre *in natura*, o teor médio de oxalato encontrado foi 1,84 g/100 g de matéria seca (AZEVEDO, 2012). Os teores médios encontrados para oxalato em 100 g de matéria seca foram de 60,53 mg no brócolis, 49,66 mg na couve-flor e 38,09 mg na couve (SANTOS, 2006).

6 CONCLUSÃO

Esse estudo possibilitou a identificação de parâmetros anatômicos e histoquímicos para a diagnose de *Annona muricata*, *Annona squamosa*, *Artocarpus altilis*, *Artocarpus heterophyllus*, *Averrhoa bilimbi*, *Mangifera indica*, *Momordica charantia* e *Syzygium cumini*. Em *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. altilis*, *A. heterophyllus* e *S. cumini* foram encontradas drusas, enquanto que em *A. bilimbi* e *M. indica* foram encontrados cristais prismáticos. Em *M. charantia* os cristais são aglomerados. Testes histoquímicos e análises microquímicas demonstraram que esses cristais são de oxalato de cálcio. A histoquímica também evidenciou o local de acúmulo de outros metabólitos nas lâminas foliares das espécies investigadas. O teor médio de oxalato total nas oito espécies variou de 3,67 a 6,35 g/100 g de matéria seca, que é muito maior que o teor de oxalato de alimentos diários. Assim, esse estudo contribuiu com a padronização farmacobotânica das espécies estudadas e trouxe dados inéditos sobre o conteúdo de oxalato presente nas suas lâminas foliares.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. C.; FIASCHI, P. **Oxalidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB181>>. Acesso em: 18 Jan. 2016.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AGRAWAL, M. et al. Pharmacognostical evaluation of *Annona squamosa* Linn. **Int. J. Phytomed.**, v. 3, p. 480-485, 2011.
- AGUIAR, L. C. G. G.; BARROS, R. F. M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 3, p. 419-434, 2012.
- AHMAD, N. et al. *Momordica charantia*: for traditional uses and pharmacological actions. **J. Drug Deliv. Ther.**, v. 6, n. 2, p. 40-44, 2016.
- AKINLOYE, A. J. et al. Comparative anatomical studies of *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg and *Artocarpus communis* (J. R. & G. Forster) in Nigeria. **Sciences in Cold and Arid Regions**, v. 7, n. 6, p. 709-721, 2015.
- ALBERTON, J. R. et al. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 2001.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALENCAR, N. L. et al. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias-evidence in support of the diversification hypothesis. **Econ. Bot.**, v. 64, n. 1, p. 68-79, 2010.
- ALKHAWALIDY, A. S. R.; HOSSAIN, M. A. Study on total phenolics and antioxidant activity of leaves crude extracts of *Annona squamosa* traditionally used for the treatment of cancerous tumours. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v. 5, n. 1, p. S142-S144, 2015.
- ALMEIDA, M. Z. et al. Species with medicinal and mystical-religious uses in São Francisco do Conde, Bahia, Brazil: a contribution to the selection of species for

introduction into the local Unified Health System. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 171-184, 2014.

ALWAN, A. et al. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. **The Lancet**, v. 376, n. 9755, p. 1861-1868, 2010.

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 III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot. J. Lin. Soc.**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.

ARROYO, J. et al. Efecto hipoglicemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. **An. Fac. Med.**, v. 70, n. 3, p. 163-167, 2009.

ASHRAFUDOULLA, M. et al. Phytochemical screening of *Solanum nigrum* L, *S. myriacanthus* Dunal, *Solanum melongena* and *Averrhoa bilimbi* in Bangladesh. **J. Med. Plants Studies**, v. 4, n. 1, p. 35-38, 2016.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. **Complement. Ther. Med.**, v. 21, p. 232-243, 2012.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.

AZEEM, A. K.; VRUSHABENDRASWAMI, B. M. Hypolipidemic evaluation of *Averrhoa bilimbi* leaf ethanolic extracts on streptozotocin induced diabetic rats. **J. Innov. Pharm. Biol. Sci.**, v. 2, p. 649-652, 2015.

AZEVEDO, F. L. A. A. **Valor nutricional, capacidade antioxidante e utilização de folhas de espinafre (*Tetragonia tetragonoides*) em pó como ingrediente de pão de forma.** 2012. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

BACCAN, N. et al. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3. ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

BAPTISTEL, A. C. et al. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 2, p. 406-425, 2014.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from South, Central and North America with hypoglycemic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARMAN, A. K. et al. Acute kidney injury associated with ingestion of star fruit: Acute oxalate nephropathy. **Indian J. Nephrol.**, v. 26, n. 6, p. 446-448, 2016.

BARTHLOTT, W. et al. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 126, p. 237-260, 1998.

BEIDOKHT, M. N.; JÄGER, A. K. Review of antidiabetic fruits, vegetables, beverages, oils and spices commonly consumed in the diet. **J. Ethnopharmacol.**, v. 201, p. 26-41, 2017.

BENEVIDES, C. M. J. et al. Efeito do processamento sobre os teores de oxalato e tanino em maxixe (*Cucumis anguria* L.), jiló (*Solanum gilo*), feijão verde (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijão andu (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp). **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 321-327, 2013.

BENTO, E. B. et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. **Saudi J. Biol. Sci.**, v. 25, n. 4, p. 609-621, 2018.

BERG, C. C. **Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae)**. With introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph 7. 83. ed. New York: Flora Neotropica, 2001. 346p.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 371/GM, de 04 de março de 2002. Dispõe sobre o Programa Nacional de Assistência Farmacêutica para Hipertensão Arterial e

Diabetes Mellitus. **Diário Oficial da União**, nº 44, Brasília, DF, 06 mar. 2002. Seção 1, p. 88.

BUCHHOLZ, T; MELZIG, M. F. Medicinal plants traditionally used for treatment of obesity and Diabetes mellitus – screening for pancreatic lipase and α -Amylase inhibition. **Phytother. Res.**, v. 30, n. 2, p. 260-266, 2015.

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

CAETANO, C. P. et al. Neurotoxicity following the ingestion of bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi*) in an end-stage renal disease patient on hemodialysis. **Case Rep. Nephrol. Dial.**, v. 7, p. 6-12, 2017.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 131, p. 326-342, 2010.

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

CHACKREWARTHY, S. et al. Evaluation of the hypoglycemic and hypolipidemic effects of an ethylacetate fraction of *Artocarpus heterophyllus* (jak) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacogn. Mag.**, v. 6, n. 23, p. 186-190, 2010.

CHAGAS, V. T. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015.

CHAI, W.; LIEBMAN, M. Oxalate content of legumes, nuts, and grain-based flours. **J. Food Comp. Anal.**, v. 18, n. 7, p. 723-729, 2005.

CHANDRIKA, U. G. et al. Hypoglycemic action of the flavonoid fraction of *Artocarpus heterophyllus* leaf. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.**, v. 3, n. 2, p. 42-50, 2006.

CHANG, C.; BEEVERS, H. Biogenesis of oxalate in plant tissues. **Plant Physiol.**, v. 43, p. 1821-1828, 1968.

CHANG, C. C.; HUANG, A. H. Metabolism of glycolate in isolated spinach leaf peroxisomes: kinetics of glyoxylate, oxalate, carbon dioxide, and glycine formation. **Plant Physiol.**, v. 67, n. 5, p. 1003-1006, 1981.

CHANUDOM, L.; TANGPONG, J. Anti-inflammation property of *Syzygium cumini* (L.) Skeels on indomethacin-induced acute gastric ulceration. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2015, 2015.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 169, p. 5-40, 2012.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por ccd: uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica”. **Quim. Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.

CHEN, Y. W. et al. Determination of oxalic acid in vegetables by derivatization gas chromatography. **Sepu**, v. 7, p. 226-228, 1989.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 685-692, 2014.

CORRÊA, P. G.; CHAGAS, M. G. S.; PIMENTEL, R. M. S. Caracterização morfoanatômica foliar de *Annona crassiflora* Mart. **Rev. Bras. Biociências**, v. 5, p. 816-818, 2007.

COSTA, J. C.; MARINHO, M. G. V. Etnobotânica de plantas medicinais em duas comunidades do município de Picuí, Paraíba, **Brasil. Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 1, p. 125-134, 2016.

COUTINHO, D. F. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 01, p. 7-17, 2009.

DALEFFI ZOCOLER, A. M., et al. Contribuição ao controle de qualidade farmacognóstico das folhas e caules de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L. – Cucurbitaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 22-27, 2006.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 3, p. 367-373, 2011.

DAUD, N.; HASHIM H.; SAMSULRIZAL, N. Anticoagulant activity of *Averrhoa bilimbi* Linn in normal and alloxan induced diabetic rats. **Open Conf. Proc. J.**, v. 4, p. 21-26, 2013.

DHITAL, K. S. Phytochemical screening and antioxidant activities of *Mangifera indica* leaves grown in temperate region of the Nepal. **J. Pharmacogn. Phytochem.**, v. 6, n. 3, p. 205-209, 2017.

DHOLVITAYAKHUN, A. et al. Using scanning and transmission electron microscopy to investigate the antibacterial mechanism of action of the medicinal plant *Annona squamosa* Linn. **J. Herbal Med.**, v. 7, p. 31-36, 2017.

DISO, S. U. et al. Antibacterial activity and phytochemical screening of *Mangifera indica* (mango) stem and leaf extracts on clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Adv. Med. Pharm. Res.**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2017.

DITSCH, F.; BARTHLOTT, W. **Mikromorphologie der Epicuticularwachse und das System der Dilleniidae und Rosidae.** (Tropische Und Subtropische Pflanzenwelt (Akademie Mainz)). Franz Steiner Verlag Wiesbaden GmbH, 1997.

DIVYALASHMI, L.; SHARMILI, A. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Mangifera indica* L and *Piper betle*. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 84-91, 2017.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 2A, p. 488-500, 2009.

DUARTE, M. R.; OLIVEIRA, R. B.; SOUZA, D. C. Anatomia foliar e caulinar de duas espécies de *Rollinia* (Annonaceae): *R. rugulosa* e *R. mucosa*. **Visão Acadêmica**, v. 16, n. 3, p. 4-21, 2015.

DUNCAN, B. B. et al. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Rev. Saúde Pública**, v. 46, p. 126-134, 2012.

EDDOUKS, M. et al. Antidiabetic plants improving insulin sensitivity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 66, p. 1197-1214, 2014.

EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K. H.; SAMARAKOON, S. R. A review on ethnopharmacological applications, pharmacological activities, and bioactive

compounds of *Mangifera indica* (mango). **Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v. 2017, 2017.

FALCÃO, M. A. et al. Fenologia e produtividade da fruta-pão (*Artocarpus altilis*) e da jaca (*A. heterophyllus*) na Amazônia Central. **Acta Amaz.**, v. 31, p. 179-191, 2001.

FEIJÓ, A. M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 1, p. 50-56, 2012.

FERRÃO, B. H. et al. Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 321-334, 2014.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis**, v. 2, p. 381-400, 2014.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. Calcium oxalate in plants. **Bot. Rev.**, v. 46, 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.

FOONG, C. P.; HAMID, R. A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 22, n. 6, p. 1301-1307, 2012.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie, 1968.

GANGADHARA, M.; INAMDAR, J. A. Trichomes and stomata, and their taxonomic significance in the Urticales. **Plant Syst. Evol.**, v. 127, p. 121-137, 1977.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 7, p. S355-S363, 2014.

GENUA, J. M.; HILLSON, C. J. The occurrence, type and location of calcium oxalate crystals in the leaves of fourteen species of Araceae. **Ann. Bot.**, v. 56, p. 351-361, 1985.

GHORBANI, A. Best herbs for managing diabetes: a review of clinical studies. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 49, n. 3, p. 413-422, 2013.

GHUNIYAL, J. Ethanomedical, chemical, pharmacological, toxicological properties of *Mangifera indica*: a review. **Int. J. Pharm. Res. Rev.**, v. 4, n. 10, p. 51-64, 2015.

GOULART, F. A. A. **Doenças Crônicas Não Transmissíveis: estratégias de controle e desafios para os sistemas de saúde**. Brasília: OPAS, 2011.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 123-132, 2004.

GUEDES, A. S. **Contribuição ao estudo farmacognóstico das espécies medicinais *Averrhoa bilimbi* L. e *Poirertia bahiana* C. Muller**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

GUPTA, M. et al. *Momordica charantia* Linn. (karela): nature's silent healer. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 11, n. 1, p. 32-37, 2011.

GUPTA, R. K. et al. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, n. 1, p. 75-81, 2005.

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

HAFID, A. F. et al. Antiviral activity of the dichloromethane extracts from *Artocarpus heterophyllus* leaves against hepatitis C virus. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 7, n. 7, p. 633-639, 2017.

HAMID, R. A. et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 22, n. 3, p. 630-641, 2012.

HELEN, P. A. M. et al. Phytochemical analysis and anticancer activity of leaf extract of *Mangifera indica* (kottukonam varika). **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 4, n. 2, p. 823-828, 2013.

HOLMES, R. P.; ASSIMOS, D. G. The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. **Urol. Res.**, v. 32, p. 311-316, 2004.

HORNER, H. T. et al. Towards uncovering evolution of lineage-specific calcium oxalate crystal patterns in Piperales. **Botany**, v. 93, n. 3, p. 159-169, 2015.

HORNER, H. T.; KAUSCH, A. P.; WAGNER, B. L. Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid rot culture, **Int. J. Plant Sci.**, v. 161, p. 861-868, 2000.

HUANG, J.; HUANG, C.; LIEBMAN, M. Oxalate contents of commonly used Chinese medicinal herbs. **J. Tradit. Chin. Med.**, v. 35, n. 5, p. 594-599, 2015.

ILARSLAN, H. et al. 1997. Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (Leguminosae). **Amer. J. Bot.**, v. 84, p. 10422-1046, 1997.

ILARSLAN, H.; PALMER, R. G.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. **Ann Bot.**, v. 88, p. 243-257, 2001.

ITANKAR, P. R. et al. High performance thin layer chromatography fingerprinting, phytochemical and physicochemical studies of antidiabetic herbal extracts. **Ayu.**, v. 35, n. 2, p. 188-195, 2015.

IYANDA-JOEL, W. O. et al. Phytochemical and antimycobacterial analysis of aqueous and ethanolic extracts of *Annona muricata* Linn (Soursop). **17th International Congress on Infectious Diseases / International Journal of Infectious Diseases**, p. 395-396, 2016.

JAHURUL, M. H. A. et al. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. **Food Chem.**, v. 183, p. 173-180, 2015.

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

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

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985.

JOOSTE, M.; DREYER, L. L.; OBERLANDER, K. C. The phylogenetic significance of leaf anatomical traits of southern African *Oxalis*. **BMC Evol. Biol.**, v. 16, p. 225, 2016.

JORGE, L. I. F. et al. *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) e *Achras sapota* L. (Sapotaceae) – elementos morfo-anatômicos de orientação diagnóstica. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, n. 3, p. 104-108, 2005.

JOSEPH, B.; JINI, D. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 93-102, 2013.

JOSEPH, J.; MENDONÇA, G. Oxalic acid content of carambola (*Averrhoa carambola* L.) and bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.). **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, Georgetown, v. 33, p. 117-120, 1989.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomed. Pharmacother.**, v. 100, p. 83-92, 2018.

KALIDINDI, N. et al. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **J. Food Drug Anal.**, v. 23, n. 4, p. 795-802, 2015.

KANTACHOT, C.; CHANTARANOTHAI, P.; THAMMATHAWORN, A. Contributions to the leaf anatomy and taxonomy of Thai Myrtaceae. **Nat. History J. Chulalongkorn University**, v. 7, n. 1, p. 35-45, 2007.

KARON, B. et al. Preliminary antimicrobial, cytotoxic and chemical investigations of *Averrhoa bilimbi* Linn. and *Zizyphus mauritiana* Lam. **Bangladesh Pharm. J.**, v. 14, n. 2, p. 127-131, 2011.

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.

KOOTI, W. et al. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. **Electronic Physician**, v. 8, n. 1, p. 1832-1842, 2016.

KOSTMAN, T. A. et al. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbon 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within calcium oxalate crystal idioblasts, **Plant Physiol.**, v. 125, p. 634-640, 2001.

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.

KUMAR, P. et al. Pharmacognostical studies on *Momordica tuberosa* Cogn. **Pharmacogn. J.**, v. 2, n. 5, p. 28-33, 2010.

KUO-HUANG, L. L.; KU, M. S. B.; FRANCESCHI, V. R. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shadeadapted *Peperomia glabella*. **Bot. Stud.**, v. 48, p. 155-164, 2007.

LACCHIA, A. P. S; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Aspectos ultra estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. **Acta Bot. Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 376-378, 2009.

LAURICELLA, M. et al. Multifaceted health benefits of *Mangifera indica* L. (mango): the inestimable value of orchards recently planted in sicilian rural areas. **Nutrients**, v. 9, p. 525, 2017.

LEAL, L. R.; TELLIS, C. J. M. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Rev. Fitos**, v. 9, n. 4, p. 261-264, 2015.

LEON, L. E. et al. Use of photochemical reactions in flow injection: determination of oxalic acid in urine. **Analyst.**, v. 115, n. 12, p. 1549-1552, 1990.

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

LEWANDOWSKI, S.; RODGERS, A. L. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. **Clin. Chim. Acta**, v. 345, p. 17-34, 2004.

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

LIMA, J. S. et al. Saberes e uso da flora madeireira por especialistas populares do agreste de Sergipe. **Sitientibus Sér Ci Biol.**, v. 11, p. 239-253, 2011.

LIMA, V. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, L. S. Physicochemical characteristics of bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 23, n. 2, p. 421-423, 2001.

LIPORACCI, H. S. N.; SIMÃO, D. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 4, p. 529-540, 2013.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; LACERDA, M. T. C.; BACHER, L. B. **Frutas no Brasil**: nativas e exóticas (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2015.

LOZANO, A. et al. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v. 10, n. 2, 2014.

LU, Y. et al. Two-dimensional counter-current chromatography for the preparative separation of prenylflavonoids from *Artocarpus altilis*. **J. Chromatogr. A**, v. 1151, p. 31-36, 2007.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110235>. Acesso em: 15 Dez. 2017.

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

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

MALTA, D. C. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014.

MALTA, D. C.; MORAIS NETO, O. L.; SILVA JUNIOR, J. B. Apresentação do Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 4, p. 425-438, 2011.

MALTA, D. C.; SILVA JUNIOR, J. B. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151-164, 2013.

MANDEL, N. Mechanism of stone formation. **Semin. Nephrol.**, v. 16, n. 5, p. 364-74, 1996.

MARTÍNEZ, A. M. Aportes a la anatomía foliar de *Artocarpus communis*, *A. heterophyllus* y *Brosimum alicastrum* (Moraceae). **Revista Jard. Bot. Nac.**, v. 28, p. 201-203, 2008.

MARTINS, A. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, n. 1, p. 21-30, 2005.

MASSEY, L. K. Food oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 107, p. 1191-1194, 2007.

MENTREDDY, S. R. Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, p. 743-750, 2007.

MERIÇ, Ç. Calcium oxalate crystals in some species of the Tribe Inuleae (Asteraceae). **Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.**, v. 51, p. 105-110, 2009.

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.**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

METCALFE, C. R.; CHALK, K. L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon, 1950.

MILLER, R. P.; NAIR, P. K. R. Indigenous agroforestry systems in Amazonia: from prehistory to today. **Agrofor. Syst.**, v. 66, p. 151-164, 2006.

MOLANO-FLORES, B. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). **Ann. Bot.**, v. 88, p. 387-391, 2001.

MOLINA, M. et al. La fruta estrella causa fracaso renal agudo. **Nefrologia**, v. 37, p. 221-222, 2017.

MORAES, I. V. M. et al. UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 26, p. 174-179, 2016.

MOREIRA, D. L. et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 248-257, 2014.

MORO, M. F.; CASTRO, A. S. F. A check list of plant species in the urban forestry of Fortaleza, Brazil: where are the native species in the country of megadiversity? **Urban Ecosyst.**, v. 18, p. 47-71, 2015.

MOZEF, T. et al. Bioactivity of ethyl acetate fraction from the leaves of “Sukun” (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) in preventing atherosclerosis. **Procedia Chem.**, v. 16, p. 106-112, 2015.

NAGMOTI, D. M. et al. Hepatoprotective effect of *Averrhoa bilimbi* Linn. against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 1-6, 2010.

NAIK, V. V. et al. Methodology in determination of oxalic acid in plant tissue: a comparative approach. **J. Global Trends Pharm. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 1662-1672, 2014.

NAIR, S. et al. Acute oxalate nephropathy following ingestion of *Averrhoa bilimbi* juice. **Case Reports in Nephrology**, 2014. 5p.

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

NAKATA, P. A. Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. **Front. Biol.**, v. 7, n. 3, p. 254-266, 2012.

NAPPI, G. U. et al. Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 4, p. 811-820, 2006.
 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.

NICOLETTI, M. A. Administração de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e de plantas medicinais – importância da orientação correta para seu uso racional. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 3, p. 264-271, 2009.

NWANKWO, I. U.; OSARO-MATHEW, R. C. Assessment of the phytochemical components of *Mangifera indica* (leaf) and *Musa paradisiaca* (roots) extracts and their antibacterial activity against some common pathogenic bacteria. **J. Pharm. Biol. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 8-11, 2014.

NWOKOCHA, C. et al. Aqueous extract from leaf of *Artocarpus altilis* provides cardio-protection from isoproterenol induced myocardial damage in rats: Negative chronotropic and inotropic effects. **J. Ethnopharmacol.**, v. 203, p. 163-170, 2017.

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

OKWU, D. E.; EZENAGU, V. Evaluation of the phytochemical composition of mango (*Mangifera indica* Linn) stem bark and leaves. **Int. J. Chem. Sci.**, v. 6, n. 2, p. 705-716, 2008.

OLIVEIRA, E. S. M.; AGUIAR, A. S. Why eating star fruit is prohibited for patients with chronic kidney disease? **J. Bras. Nefrol.**, v. 37, p. 241-247, 2015.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu; 2009.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 12, n. 3, p. 282-301, 2010.

OLIVEIRA, G. L. **Etnobotânica nordestina**: plantas medicinais da comunidade Muribeca (Jaboatão dos Guararapes-PE, Brasil). 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.

OVIEDO, V. et al. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica em ratones. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.**, v. 38, n. 1, p. 105-120, 2009.

PANDAY, D. R.; RAUNIAR, G. P.; PANDAY, K. R. *Momordica charantia* (karela): and antidiabetic. **World J. Pharm. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 84-99, 2015.

PARVEZ, G. M. M. Pharmacological activities of mango (*Mangifera indica*): a review. **J. Pharmacogn. Phytochem.**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2016.

PASCHOALIN; R. P. et al. Lesão renal aguda como complicação da ingestão excessiva de suco do fruto biri biri (*Averrhoa bilimbi*). **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, p. 545-548, 2014.

PELL, S. K. et al. **Anacardiaceae**. In: KUBITZKI, K. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. India: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 7-50, 2011.

PENTECOST, A. Calcification in plants. **Int. Rev. Cytol.**, v. 62, p. 1-27, 1980.

PEREIRA, V. J.; KAPLAN, M. A. C. 2013. *Artocarpus*: um gênero exótico de grande bioatividade. **Floresta e Ambiente**, v. 20, p. 1-15, 2013.

PERIYANAYAGAM, K.; KARTHIKEYAN, V. Pharmacognostical, SEM and XRF profile of the leaves of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) – a contribution to combat the NTD. **Innovare J. Life Sci.**, v. 1, n. 1, p. 23-28, 2013.

PINTO, N. C. C. et al. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 89, p. 2053-2073, 2017.

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

PUSHPARAJ, P. N.; TAN, B. K. H.; TAN, C. H. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. **Life Sci.**, v. 70, p. 535-547, 2001.

PUSHPARAJ, P. N.; TAN, C. H.; TAN, B. K. H. Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 69-76, 2000.

PUTRA, A. M. P.; AULIA, D.; WAHYUNI, A. Uji aktivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap penurunan kadar glukosa darah mencit putih jantan yang diinduksi aloksan. **Jurnal Ilmiah Ibnu Sina**, v. 2, n. 2, p. 263-269, 2017.

RABÊLO, S. V. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Rev. Bras. Frut.**, v. 36, p. 265-271, 2014.

RAGONE, D. **Farm and forestry production and marketing for breadfruit** (*Artocarpus altilis*). In: ELEVITCH, C. R. (Ed), Specialty crops for Pacific Island agroforestry, Holualoa, Hawaii: Permanent Agriculture Resources (PAR), p. 1-18, 2011.

RAMOS, I. L.; BANDIOLA, T. M. B. Phytochemical screening of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaf extracts using different solvents of extraction. **Der Pharmacia Lettre**, v. 9, n. 2, p. 74-78, 2017.

RAMSAY, A.; MUELLER-HARVEY, I. Procyanidins from *Averrhoa bilimbi* fruits and leaves. **J. Food Compost. Anal.**, v. 47, p. 16-20, 2016.

REIS, R. E.; ALVIM, M. N. Anatomia foliar comparada de três espécies do gênero *Oxalis* L. (Oxalidaceae). **Periódico Científico do Núcleo de Biociências do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix**, v. 3, n. 6, p. 59-72, 2013.

RIBEIRO, D. A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

RIBEIRO, R. V. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RIBEIRO, W. S. et al. Caracterização pós-colheita do limão cayne (*Averrhoa bilimbi* L.), armazenado em atmosfera modificada. **Rev. Bras. Prod. Agroind.**, v. 12, n. 2, p. 133-139, 2010.

ROCHA, L. A. et al. Diferenças foliares morfoanatômicas de quatro espécies da família Anacardiaceae. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 27, n. 2, p. 35-48, 2015.

ROCHA, T. T. **Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas pelas comunidades da Reserva Extrativista Marinha de Soure, Pará, Brasil**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade do Estado do Pará, Belém, 2014.

RODRIGUES, A. P.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 721-730, 2014.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), **Brazilian Amazon. Phytother. Res.**, v. 20, p. 378-391, 2006.

RODRIGUES, J. A.; BARROS, A. A. Development of a method for oxalate determination by differential pulse polarography after derivatization with ophenylenediamine. **Anal. Chim. Acta**, v. 273, p. 531-537, 1993.

RODRIGUES, K. A. F. et al. Prospeção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 2, 2010.

ROMANIUC NETO, S. et al. **Moraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB167>>. Acesso em 15 Agosto 2017.

ROSA, R. L.; BARCELOS, A. L. V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste – SC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

ROYER, M. et al. Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* Aubl. Wood: A study of the chemotaxonomy of the Moraceae family. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1708-1713, 2010.

RUGGIERO, A. A. **Estudo farmacognóstico do jambolão *Syzygium cumini* (L.) Skeels Myrtaceae**. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SANCHES, J. R. et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. **Front. Pharmacol.**, v. 7, n. 48, 2016.

SANTHAN, P. Leaf structural characteristics of importante medicinal plants. **Int. J. Res. Ayurveda Pharm.**, v. 5, n. 6, p. 673-679, 2014.

SANTOS, M. A. T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve- flor e couve. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 2, p. 327-334, 2012.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R. Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 1, n. 1, p. 58-74, 2008.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, C. L. L. G. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 707-720, 2014.

SANTOS, S. L. D. X. et al. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade rural do semi-árido da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, n. 1, p. 68-79, 2012.

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

SAVAGE, G. P. et al. Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. **J. Food Compos. Anal.**, v. 13, p. 201-206, 2000.

SAVAGE, G. P.; MÁRTENSSON, L. Comparison of the estimates of the oxalate content of taro leaves and corms and a selection of Indian vegetables following hot water, hot acid and in vitro extraction methods. **J. Food Compos. Anal.**, v. 23, p. 113-117, 2010.

SĂVULESCU, E.; HOZA, G. Research results regarding the anatomy of *Momordica charanthia* L. specie. **Lucrări științifice USAMVB, Seria B**, v. LIV, p. 694-700, 2010.

SCARANELLO, K. L. et al. Carambola como causa de lesão renal aguda. **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, p. 246-249, 2014.

SCARDELATO, J. A.; LEGRAMANDI, V. H. P.; SACRAMENTO, L. V. S. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento da nefrolitíase: paradoxo? **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 34, n. 2, p. 161-168, 2013.

SCHNETZLER, B. N.; TEIXEIRA, S. P.; MARINHO, C. R. Trichomes that secrete substances of a mixed nature in the vegetative and reproductive organs of some species of Moraceae. **Acta Bot. Brasilica**, v. 31, p. 392-402, 2016.

SCHRODER, T.; VANHANEN, L.; SAVAGE, G. P. Oxalate content in commercially produced cocoa and dark chocolate. **J. Food Comp. Anal.**, v. 24, n. 7, p. 916-922, 2011.

SHAH, K. A. et al. *Mangifera indica* (Mango). **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 7, p. 42-48, 2010.

SHAMAUN, S. S. et al. Prenylated flavones from *Artocarpus altilis*. **J. Nat. Med.**, v. 64, p. 478-481, 2010.

SHIRWAIKAR, A. et al. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin–nicotinamide type 2 diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, n. 1, p. 171-175, 2004.

SIENER, R. et al. Dietary risk factors for hyperoxaluria in calcim oxalate stone formers. **Kidney Int.**, v. 63, p. 1037-1043, 2003.

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

SIENER, R. et al. The oxalate content of fruit and vegetable juices, nectars and drinks. **J. Food Comp. Anal.**, v. 45, p. 108-112, 2016.

SIENER, R. et al. Oxalate content of beverages. **J. Food Comp. Anal.**, v. 63, p. 184-188, 2017.

SILVA, I. G. R.; TAKEMURA, O. S. Aspectos de intoxicações por *Dieffenbachia* ssp (Comigo-ninguém-pode) – Araceae. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 151-159, 2006.

SIMÃO, A. A. **Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade**. 2013. 182 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

SIQUEIRA, A. M. O. et al. Dietary fibre content, phenolic compounds and antioxidant activity in soursops (*Annona muricata* L.). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 37, n. 4, p. 1020-1026, 2015.

SIQUEIRA-NUNES, A.; MARTINS, M. B. G. Estudo anatômico de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Rev. Biociências**, v. 16, n. 2, p. 116-122, 2010.

SOBRAL, M. et al. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10853>>. Acesso em: 18 Jan. 2016

SOH, W. K.; PARNELL, J. Comparative leaf anatomy and phylogeny of *Syzygium* Gaertn. **Plant Syst. Evol.**, v. 297, p.1-32, 2011.

SOMKUWAR, D. O.; KAMBLE, V. A. Phytochemical screening of ethanolic extracts of stem, leaves, flower and seed kernel of *Mangifera indica* L. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 383-389, 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **J. Sci. Food Agric.**, v. 93, p. 2084-2093, 2013.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 15 Agosto 2017.

SUNARTI, S.; TIHURUA, R. E. F. Studianatomidaun jenis-jenis *Averrhoa* di Indonesia untuk mempertegas status taksonominya. **Berita Biologi**, v. 9, n. 3, p. 253-257, 2008.

TAN, B. K. H., TAN, C. H.; PUSHPARAJ, P. N. Anti-diabetic activity of the sem-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in high fat diet fed-streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci.**, v. 76, p. 2827-2839, 2005.

TAN, S. P. et al. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: a review. **Food Rev. Int.**, v. 32, n. 2, p. 181-202, 2016.

THE PLANT LIST. **Version 1.1. Published on the Internet**. 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 15 Agosto 2017.

UPADHYAY, A.; AGRAHARI, P.; SINGH, D. K. A review on salient pharmacological features of *Momordica charantia*. **Int. J. Pharm.**, v. 11, n. 5, p. 405-413, 2015.

VALSAN, A.; RAPHAEL, R. Pharmacognostic profile of *Averrhoa bilimbi* Linn. leaves. **South Indian J. Biol. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 75-80, 2016.

VANELLI, C. P.; CORRÊA, T. H. A.; CORRÊA, J. O. A. Carambola (*Averrhoa carambola*): sua neurotoxicidade e abordagens terapêuticas. **HU Rev.**, Juiz de Fora, v. 40, p. 129-133, 2014.

VARELA, D. S. S.; AZEVEDO, D. M. Saberes e práticas fitoterápicas de médicos na estratégia saúde da família. **Trab. Educ. Saúde**, v. 12, n. 2, p. 273-290, 2014.

VASCONCELOS, A. L. et al. Anatomical characterization of ultra-structures, biominerals and histolocalization of metabolites in leaves of *Genipa americana*. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 27, p. 541-548, 2017.

VASCONCELOS, A. L.; VASCONCELOS, A. L.; RANDAU, K. P. Pharmacognostic characterization of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Pharmacogn. J.**, v. 8, n. 6, p. 513-519, 2016.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 2, p.267-273, 2015.

VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 367-382, 2006.

VIEIRA, G. H. F. et al. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129-132, 2010.

VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 5, p. 567-571, 2011.

WAGNER, C. J. et al. Carambola selection for commercial production. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 88, p. 466-469, 1975.

WANG, X. L. et al. New phenolic compounds from the leaves of *Artocarpus heterophyllus*. **Chin. Chem. Lett.**, v. 28, p. 37-40, 2017.

WANG, Y. et al. Geranyl flavonoids from the leaves of *Artocarpus altilis*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1300-1306, 2007.

WEINER, S.; DOVE, P. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 54, p. 1-29, 2003.

WHO. World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Genebra: WHO Press, 2014.

WHO. World Health Organization. **World Health Statistics 2017**: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: WHO, 2017.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **Am. J. Bot.**, v. 63, p. 1167-1173, 1976.

**APÊNDICE A – ARTIGO 1 ACEITO NA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA
BRASILEIRA DE CIÊNCIAS**

**Comparative anatomy and histochemistry of the leaf blade of two species of
*Artocarpus***

**RAFAELA DAMASCENO SÁ¹, MARÍLIA BARBOSA CADENA¹, RAFAEL JOSÉ
RIBEIRO PADILHA², LUIZ CARLOS ALVES², KARINA PERRELLI RANDAU¹**

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, S/N, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Setor de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

Key words: *Artocarpus altilis*, *Artocarpus heterophyllus*, crystals, microscopy, Moraceae.

Running title: Pharmacobotany study of species of Moraceae

Academy Section: Biological Sciences

Correspondence to: Karina Perrelli Randau. E-mail: krandau@hotmail.com

ABSTRACT:

In Brazil there are two species of *Artocarpus* that were introduced: *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, known as fruta-pão, and *Artocarpus heterophyllus* Lam., known as jaca. Both are used as food and medicine. The objective of this work was to conduct a comparative anatomical and histochemical study between *A. altilis* and *A. heterophyllus*. Techniques of optical, polarized and scanning electron coupled to energy dispersive spectroscopy. The anatomical characterization showed the characters of general occurrence in the family Moraceae and of those that allow the differentiation of *A. altilis* and *A. heterophyllus*. The histochemistry revealed the sites of synthesis and/or storage of the metabolites. The chemical microanalyses brought new information about the chemical composition of crystals. The study provides pharmacobotanical data for the quality control of the species.

INTRODUCTION

The Moraceae family comprises 40 genera and about 1.217 species of occurrence in the tropical regions of the planet (The Plant List 2013), being that about 50% of the genera are distributed between the region of Mexico to Argentina (Berg 2001). In Brazil, the family is represented by 19 genera and 208 species (Romaniuc Neto et al. 2015), which have an important medicinal and economic value, known to present bioactive secondary metabolites and to be exploited by the wood industry (Royer et al. 2010, Lima et al. 2011).

The genus *Artocarpus* comprises 61 species native to Asia and India, known for their fruits much appreciated (Ragone 2011, Stevens 2012). In Brazil, two species were introduced: *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, known as fruta-pão, and *Artocarpus heterophyllus* Lam., known as jaca (Falcão et al. 2001, Pereira and Kaplan 2013). Worldwide, these two species are known, respectively, as breadfruit and jackfruit (Pereira and Kaplan 2013).

Both are perennial trees that produce latex, very cultivated in domestic orchards in the tropical regions of Brazil. The fruits are consumed *in natura*, baked or cooked, or in the form of candies and compotes (Lorenzi et al. 2015). Different parts of the plants are also used in traditional medicine to treat injuries, furuncles, back pain, rheumatisms and respiratory problems (Rodrigues 2006, Albuquerque et al. 2007, Agra et al. 2008, Aguiar and Barros 2012).

Studies with extracts, fractions and isolated components of the leaves of the two species demonstrate cardio-protective functions (Nwokocha et al. 2017), dendrite elongation inhibition (Rao et al. 2013), prevent atherosclerosis (Mozef et al. 2015) and have antiviral (Hafid et al. 2017), hypoglycemic and hypolipidemic effects (Chandrika et al. 2006, Chackrewarthy et al. 2010).

In addition to being widely used by the population as a therapeutic resource, these plant drugs can constitute raw materials used in the manufacture of phytotherapeutic. In some cases, medicinal plants may be erroneously used for presenting morphological similarities. Anatomical and histochemical studies contribute to the correct identification of these species (Costa et al. 2014). Thus, the objective of this work was to conduct a comparative study between *A. altilis* and *A. heterophyllus* to determine the authenticity parameters for these species.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Adult leaves of specimens of *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus* were collected in the neighborhood of Aldeia, Camaragibe, Pernambuco, Brazil. A voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), under registration number 91180 for *A. altilis* and 91181 for *A. heterophyllus*.

ANATOMICAL CHARACTERIZATION – OPTICAL MICROSCOPY

Various cross-sections were obtained by hand, using a common razor blade, in the middle region of leaf blades fixed in FAA 50% (Johansen 1940). Paradermal sections were also performed on the adaxial and abaxial faces. All sections were subjected to decolorization with sodium hypochlorite solution (50 %) (Kraus and Arduin 1997), followed by washing with distilled water. Subsequently, the cross-sections were stained with safranin and astra blue

(Bukatsch 1972) and paradermal sections were stained with methylene blue (1 %) (Krauter 1985). Then, semipermanent histological slides were prepared to contain the sections of botanical material, following common plant anatomy procedures (Johansen 1940, Sass 1951). The analysis of the semipermanent histological slides were conducted on images in software (LAS EZ), obtained by a digital camera (LEICA ICC50 W) coupled to an optical microscope (Leica DM750M).

ANATOMICAL CHARACTERIZATION – POLARIZED LIGHT MICROSCOPY

Semipermanent histological slides were prepared with cross-sections of leaf blades obtained by the same method used for the analysis in optical microscopy. For the analysis of the slides was used a polarized microscope (Leica DM750M) coupled to a digital camera (LEICA ICC50 W). The images were processed in software (LAS EZ).

HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Histochemical tests were made on cross-sections of fresh leaf blades obtained by hand, using a common razor blade (Johansen 1940). The specific reagents used were: potassium dichromate (10 %) for phenolic compounds (Gabe 1968); vanillin chloridric for tannins (Mace and Howell 1974); antimony trichloride for triterpenes and steroids (Mace et al. 1974); Dragendorff's reagent for detecting alkaloids (Yoder and Mahlberg 1976); Sudan III for lipophilic substances (Sass 1951); phloroglucinol for lignin (Johansen 1940); Lugol for starch (Johansen 1940) and hydrochloric acid (10 %) to establish the nature of the crystals (Jensen 1962). Controls were performed in parallel with the tests. Semipermanent histological slides

were prepared to contain the cross-sections and were analyzed with an optical microscope (Leica DM750M) (Johansen 1940, Sass 1951).

ANALYSIS OF THE ELEMENTAL COMPOSITION OF CRYSTALS

Samples of fresh leaf blades were fixed in 2.5% glutaraldehyde (buffered with 4% formaldehyde). After dehydration in ethanol series, the material was submitted to critical point drying (Hitachi HCP-2) and mounted onto stubs, using double-sided adhesive tape and sputter-coated with gold (Q150T) (Haddad et al. 1998). Finally, the samples were examined with a Scanning Electron Microscope (SEM) (Zeiss EVO LS15). The chemical microanalyses by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) were done with X-ray detector attached to the scanning electron microscope.

RESULTS

The leaf blade of *A. altilis*, in frontal view in optical microscopy, has cells with straight or slightly sinuous walls on both sides (Figs. 1a-b). The leaf blade is hypostomatic, with anomocytic and actinocytic stomata on the abaxial face (Fig. 1b). The presence of druses is observed under optical and polarized microscopy on both faces of the leaf blade (Figs. 1a-d). There are non-glandular trichomes and glandular trichomes. The non-glandular trichomes can be of three types: simple (Fig. 1e), hooked (Figs. 1f-g) and conical (Figs. 1h, j). The glandular trichomes are multicellular and have eight or more cells (Figs. 1i-j). All types of trichomes described are found on both sides of the leaf blade, except for the simple non-glandular trichome, which is present only on the adaxial side.

Figure 1

The leaf blade of *A. heterophyllus*, in frontal view in optical microscopy, has cells of sinuous walls on both sides (Figs. 2a-b). As it was visualized in *A. altilis*, the leaf blade of *A. heterophyllus* is hypostomatic, with anomocytic and actinocytic stomata on the abaxial face (Fig. 2b), and also presents druses on both faces, observed under optical and polarized microscopy (Figs. 2a-d). In *A. heterophyllus* there is only one type of non-glandular trichome, the unicellular conical, and it is restricted to the abaxial face (Fig. 2e). The glandular trichomes are multicellular, found on both sides of the leaf blade and have six cells or more cells (Figs. 2f-g).

Figure 2

In cross-section, analyzed by scanning electron microscopy, the midrib of *A. altilis* shows a biconvex shape (Fig. 3a) and *A. heterophyllus* shows midrib ranging from plane-convex to slightly biconvex (Fig. 3b). Under optical microscopy, the epidermis on both species is uniseriate, covered with thin cuticle (Figs. 3c-d). In both species there are lithocysts mainly in the regions of ribs (Figs. 3e-f). Two to four layers of collenchyma are situated below the epidermis in *A. altilis* (Fig. 3c), while in *A. heterophyllus* the collenchyma is composed of three to seven layers of cells (Fig. 3d).

The two species studied have a collateral vascular bundle in the midrib, associated with sclerenchyma (Figs. 3c-d). *Artocarpus heterophyllus* presents a more developed medullar region of parenchyma than *A. altilis* (Figs. 3c-d) and has idioblasts in the parenchyma (Fig. 3d). Druses are observed in optical and polarized microscopy in the parenchyma and phloem of the two species (Figs. 3c, d, g, h).

The mesophyll of both species, in cross-section visualized in optical microscopy, is dorsiventral, consisting of one to two layers of palisade parenchyma in *A. altilis* (Fig. 3i) and of about three layers of palisade parenchyma in *A. heterophyllus* (Fig. 3j). The spongy parenchyma consists of several layers of cells loosely arranged (Figs. 3i-j). Small vascular bundles are distributed throughout the mesophyll and are protected by an irregular bundle sheath of parenchyma cells. This bundle sheath has extensions that always connect the two epidermal faces in *A. altilis*, which does not occur in *A. heterophyllus* (Figs. 3i-j). Druses are observed in optical and polarized microscopy in the palisade parenchyma and in the bundle sheath (Figs. 3k-l).

Figure 3

The table 1 shows the main anatomical characters of the two species.

TABLE 1

Summary of the major anatomical characters of *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus*

	<i>Artocarpus altilis</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>
Epidermis	Uniseriate, cells with straight or slightly sinuous walls on both sides.	Uniseriate, cells with sinuous walls on both sides.
Stomata	Anomocytic and actinocytic on the abaxial face.	Anomocytic and actinocytic on the abaxial face.
Trichomes	Adaxial face - non-glandular: simple, hooked and conical; glandular: multicellular, with more cells.	Adaxial face - glandular: multicellular, with six or more cells.

	eight or more cells.	Abaxial face - non-glandular:
	Abaxial face - non-glandular: conical;	glandular:
	hooked and conical; multicellular, with six or	
	glandular: multicellular, with more cells.	
	eight or more cells.	
Druses	Epidermis, parenchyma of the midrib, phloem, palisade parenchyma and bundle sheath.	Epidermis, parenchyma of the midrib, phloem, palisade parenchyma and bundle sheath.
Lithocysts	Mainly in the regions of ribs.	Mainly in the regions of ribs.
Midrib	Biconvex shape.	Plane-convex to slightly biconvex shape.
Collenchyma	Two to four layers.	Three to seven layers.
Vascular bundle	Collateral associated with sclerenchyma.	Collateral associated with sclerenchyma.
Mesophyll	Dorsiventral, with one to two layers of palisade parenchyma and several layers of spongy parenchyma.	Dorsiventral, with three layers of palisade parenchyma and several layers of spongy parenchyma.

The figures 4a and 4b shows cross-section of the leaf blade of *A. altilis* and the figures 4c and 4d show cross-section of the leaf blade of *A. heterophyllus* without the addition of reagent. Phenolic compounds were found in the epidermis of *A. altilis* (Fig. 4e) and in epidermis, idioblasts, palisade and spongy parenchyma of *A. heterophyllus* (Figs. 4f-h). The presence of tannins was observed in the epidermis of *A. altilis* (Fig. 4i) and in the idioblasts and palisade and spongy parenchyma of *A. heterophyllus* (Figs. 4j-k).

Triterpenes and steroids were located in the epidermis of *A. altilis* (Fig. 4l) and in the epidermis, idioblasts and spongy parenchyma of *A. heterophyllus* (Figs. 4m-n). Lipophilic substances were revealed in the cuticle, epidermis and collenchyma of *A. altilis* (Fig. 4o) and in cuticle, idioblasts, spongy parenchyma and bundle sheath in the mesophyll of *A. heterophyllus* (Figs. 4p-q). In the two species were found lignin in the xylem and sclerenchyma (Fig. 4r-s) and starch in the parenchyma (Figs. 4t-u). The figures 4v and 4x shows the presence of druses in idioblasts and figures 4w and 4y shows the dissolution of the druses with the test of hydrochloric acid (10%), indicating that they are of calcium oxalate. Tests with Dragendorff's reagent were negative.

Figure 4

The table 2 shows a summary of the histochemical characterization of the two species.

TABLE 2

Summary of the histochemical characterization of *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus*

	<i>Artocarpus altilis</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>
Phenolic compounds	Epidermis.	Epidermis, idioblasts, palisade and spongy parenchyma.
Tannins	Epidermis.	Idioblasts, palisade and spongy parenchyma.
Triterpenes and steroids	Epidermis.	Epidermis, idioblasts and spongy parenchyma.
Lipophilic substances	Cuticle, epidermis, and	Cuticle, idioblasts, spongy

	collenchyma.	parenchyma and bundle sheath in the mesophyll.
Lignin	Xylem and sclerenchyma.	Xylem and sclerenchyma.
Starch	Parenchyma.	Parenchyma.
Druses	Calcium oxalate.	Calcium oxalate.
Alkaloids	Negative.	Negative.

The chemical microanalyses performed by SEM-EDS in the druses present in the leaf blades of *A. altilis* (Figs. 5a-c) and *A. heterophyllus* (Figs. 5d-f) revealed peaks of absorbance for calcium, carbon and oxygen, confirming that they are formed of calcium oxalate.

Figure 5

DISCUSSION

According to Metcalfe and Chalk (1950), in the family Moraceae can be found anomocytic and anisocytic stomata. Gangadhara and Inamdar (1977) found anomocytic stomata in both species and actinocytic stomata only in *A. altilis*.

There are controversies in the literature regarding the types of trichomes found in the two species studied. Martínez (2008) stated that the leaf blade of *A. heterophyllus* is glabrous on the adaxial side. However, in the present study was found glandular trichome in this face of the leaf blade of *A. heterophyllus*, as was also found by Gangadhara and Inamdar (1977) and Schnetzler et al. (2017). The types of non-glandular trichomes simple, hooked and conical were also described by Gangadhara and Inamdar (1977) for species of *Artocarpus*. Studying trichomes of 25 taxa of Urticales, these authors emphasized that the presence of glandular trichomes located in depressions is a diagnostic feature for *Artocarpus*.

The family Moraceae is known to have cystoliths. Metcalfe and Chalk (1950) stated that true cystoliths occur in *Broussonetia*, *Chlorophora*, *Conocephalus*, *Dammaropsis*, *Fatoua*, *Ficus*, *Malaisia*, *Morus*, *Poulsenia* and *Sparattosyce*, especially in the epidermis of the leaf. In species of *Antiaris*, *Artocarpus*, *Broussonetia*, *Cecropia* and *Parartocarpus* occur structures resembling cystoliths in the hairs.

Periyanayagam and Karthikeyan (2013) and Akinloye et al. (2015) observed druses in the same tissues found in the present study. Wu and Kuo-Huang (1997) described the presence of prismatic crystals in the bundle sheath of *A. altilis*, which was not observed in this study. These previous studies did not perform histochemical tests and chemical microanalyses to determine the chemical composition of the crystals.

The epidermis of Moraceae species usually consists of a single layer of cells, but may have two to three layers, as in *Ficus* species (Sonibare et al. 2006). According to Metcalfe and Chalk (1950) there are idioblasts of tannins in the leaf of *Artocarpus*. However, the present study has demonstrated the presence of other metabolites in idioblasts through histochemistry, such as phenolic compounds triterpenes, steroids and lipophilic substances. Histochemistry was also important to reveal that the two species of *Artocarpus* present the same types of metabolites, however, located in different tissues. Identification of the chemical composition of the crystals by histochemical test and by SEM-EDS is an important diagnostic feature for genus and species of Moraceae.

Thus, the new information of the chemical microanalyses and the histochemistry, allied to the anatomical description, show the characters of general occurrence in the family Moraceae and of those that allow the differentiation of *A. altilis* and *A. heterophyllus*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-UFPE)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support in the form of fellowship awards. They also thanks CNPq for research funding (409452/016-5).

REFERENCES

- AGRA MF, SILVA KN, BASÍLIO IJLD, FREITAS PF AND BARBOSA-FILHO JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Bras J Pharmacogn* 18: 472-508.
- AGUIAR LCGG AND BARROS RFM. 2012. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). *Rev Bras Pl Med* 14: 419-434.
- AKINLOYE AJ, BOROKINI TI, ADENIJI KA AND AKINNUBI FM. 2015. Comparative anatomical studies of *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg and *Artocarpus communis* (J. R. & G. Forster) in Nigeria. *Sciences in Cold and Arid Regions* 7: 709-721.
- ALBUQUERQUE UP, MEDEIROS PM, ALMEIDA ALS, MONTEIRO JM, LINS NETO EMF, MELO JG AND SANTOS JP. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.
- BERG CC. 2001. Moreae, Artocarpeae, and *Dorstenia* (Moraceae). With introductions to the family and *Ficus* and with additions and corrections to *Flora Neotropica* Monograph 7. 83 ed., New York: Flora Neotropica, 346 p.
- BUKATSCH F. 1972. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.

- FALCÃO MA, CLEMENTE CR, GOMES JBM, CHÁVEZ FLORES WB, SANTIAGO FF AND FREITAS VP. 2001. Fenologia e produtividade da fruta-pão (*Artocarpus altilis*) e da jaca (*A. heterophyllus*) na Amazônia Central. Acta Amaz 31: 179-191.
- GABE M. 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson & Cie, 1113 p.
- GANGADHARA M AND INAMDAR JA. 1977. Trichomes and stomata, and their taxonomic significance in the Urticales. Plant Syst Evol 127: 121-137.
- HADDAD A ET AL. 1998. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 179.
- JOHANSEN DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill, 523 p.
- JENSEN WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman, 408 p.
- KRAUS JE AND ARDUIN M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 198 p.
- KRAUTER D. 1985. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. Mikrokosmos 74: 231-233.

- LIMA JS, OLIVEIRA DM, NASCIMENTO JÚNIOR JE, SILVA-MANN R AND GOMES LJ. 2011. Saberes e uso da flora madeireira por especialistas populares do agreste de Sergipe. *Sitientibus Sér Ci Biol* 11: 239-253.
- LORENZI H, LACERDA MTC AND BACHER LB. 2015. Frutas no Brasil: nativas e exóticas (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 768 p.
- MACE ME AND HOWELL CR. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Can J Bot* 52: 2423-2426.
- MACE ME, BELL AA AND STIPANOVIC RD. 1974. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. *Phytopathology* 64: 1297-1302.
- MARTÍNEZ AM. 2008. Aportes a la anatomía foliar de *Artocarpus communis*, *A. heterophyllus* y *Brosimum alicastrum* (Moraceae). 2008. *Revista Jard Bot Nac* 28: 201-203.
- METCALFE CR AND CHALK L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press. 1500 p.
- PEREIRA VJ AND KAPLAN MAC. 2013. *Artocarpus*: um gênero exótico de grande bioatividade. *Floresta e Ambiente* 20: 1-15.

- PERIYANAYAGAM K AND KARTHIKEYAN V. 2013. Pharmacognostical, SEM and XRF profile of the leaves of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) – a contribution to combat the NTD. *Innovare Journal of Life Science* 1: 23-28.
- RAGONE D. 2011. Farm and forestry production and marketing for breadfruit (*Artocarpus altilis*). In: ELEVITCH CR (Ed), Specialty crops for Pacific Island agroforestry, Holualoa, Hawaii: Permanent Agriculture Resources (PAR), p. 1-18.
- RODRIGUES E. 2006. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon *Phytother Res* 20: 378-391.
- ROMANIUC NETO S, CARAUTA JPP, VIANNA FILHO MDM, PEREIRA RAS, RIBEIRO JELS, MACHADO AFP, SANTOS A, PELISSARI G AND PEDERNEIRAS LC. 2015. Moraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB167>. Acesso em 15 Agosto 2017.
- ROYER M, HERBETTE G, EPARVIER V, BEAUCHÊNE J, THIBAUT B AND STIEN D. 2010. Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* Aubl. Wood: A study of the chemotaxonomy of the Moraceae family. *Phytochemistry* 71: 1708-1713.
- SASS JE. 1951. Botanical microtechnique. Ames: Iowa State College Press, 391 p.

- SCHNETZLER BN, TEIXEIRA SP AND MARINHO CR. 2016. Trichomes that secrete substances of a mixed nature in the vegetative and reproductive organs of some species of Moraceae. *Acta Bot Brasilica* 31: 392-402.
- SONIBARE MA, JAYEOLA AA AND EGUNYOMI A. 2006. Comparative leaf anatomy of *Ficus* Linn. species (Moraceae) from Nigeria. *J Appl Sci* 6: 3016-3025.
- STEVENS PF. 2012. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 15 Agosto 2017.
- THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. Published on the Internet. <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em 15 Agosto 2017.
- WU CC AND KUO-HUANG LL. 1997. Calcium crystals in the leaves of some species of Moraceae. *Bot Bull Acad Sinica* 38: 97-104.
- YODER LR AND MAHLBERG PG. 1976. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *Am J Bot* 63: 1167-1173.
- ZHANG J, LU H AND HUANG L. 2014. Calciphytoliths (calcium oxalate crystals) analysis for the identification of decayed tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Sci Rep* 4: 1-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - paradermal sections of the leaf blade of *Artocarpus altilis*. **a, b, e, f, g, h, i** and **j**: optical microscopy; **c** and **d**: polarized light microscopy; **a, c, e, f, h** and **i**: adaxial face; **b, d, g** and **j**: abaxial face. Abbreviations: dr = druse; ep = epidermis; gt = glandular trichome; ng = non-glandular trichome; sta = stomata. Bars: **a, b, e, f, g, h, i** and **j** = 50 μm ; **c** and **d** = 20 μm .

Figure 2 - paradermal sections of the leaf blade of *Artocarpus heterophyllus*. **a, b, e, f** and **g**: optical microscopy; **c** and **d**: polarized light microscopy; **a** and **c**: adaxial face; **b, d, e, f**, and **g**: abaxial face. Abbreviations: dr = druse; ep = epidermis; gt = glandular trichome; lit = lithocyst; ng = non-glandular trichome; sta = stomata. Bars: **a, b** and **e** = 50 μm ; **c, d, f** and **g** = 20 μm .

Figure 3 - cross-sections of the leaf blades of *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus*. **a, c, e, g, i** and **k**: *A. altilis*; **b, d, f, h, j** and **l**: *A. heterophyllus*; **a** and **b**: scanning electron microscopy; **c, d, e, f, i** and **j**: optical microscopy; **g, h, k** and **l** = polarized light microscopy. Abbreviations: co = collenchyma; dr = druse; ep = epidermis; id = idioblast; lit = lithocyst; pp = palisade parenchyma; sp = spongy parenchyma; vb = vascular bundle. Bars: **c, g, i, j, k** and **l** = 100 μm ; **d** and **h** = 200 μm ; **e** and **f** = 50 μm .

Figure 4 - histochemistry of the leaf blades of *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus*. **a, b, e, i, l, o, r, t, v** and **w**: *A. altilis*; **c, d, f, g, h, j, k, m, n, p, q, s, u, x** and **y**: *A. heterophyllus*; **a, b, c** and **d**: control; **e, f, g** and **h**: potassium dichromate (10 %); **i, j** and **k**: vanillin chloridric; **l, m** and **n**: antimony trichloride; **o, p** and **q**: Sudan III; **r** and **s**:

phloroglucinol; **t** and **u**: Lugol; **v**, **w**, **x** and **y**: hydrochloric acid (10 %). Abbreviations: co = collenchyma; ct = cuticle; dr = druse; ep = epidermis; id = idioblast; pa = parenchyma; pp = palisade parenchyma; scl = sclerenchyma; sp = spongy parenchyma; st = starch; xy = xylem. Bars: **a**, **b**, **c**, **d** and **j** = 200 μm ; **i**, **k**, **l**, **m** and **p** = 100 μm ; **e**, **f**, **g**, **h**, **n**, **o**, **q**, **r**, **s**, **t**, **u**, **v**, **w**, **x** and **y** = 50 μm .

Figure 5 - Scanning electron micrograph and elemental composition of the druses observed in *Artocarpus altilis* and *Artocarpus heterophyllus*. **a**, **b** and **c**: *A. altilis*; **d**, **e** and **f**: *A. heterophyllus*; **a** and **d**: druses; **b** and **e**: analysis of elemental composition of the druses; **c** and **f**: percentage of the chemical constituents of the druses. Abbreviations: dr = druses.

Figure 1

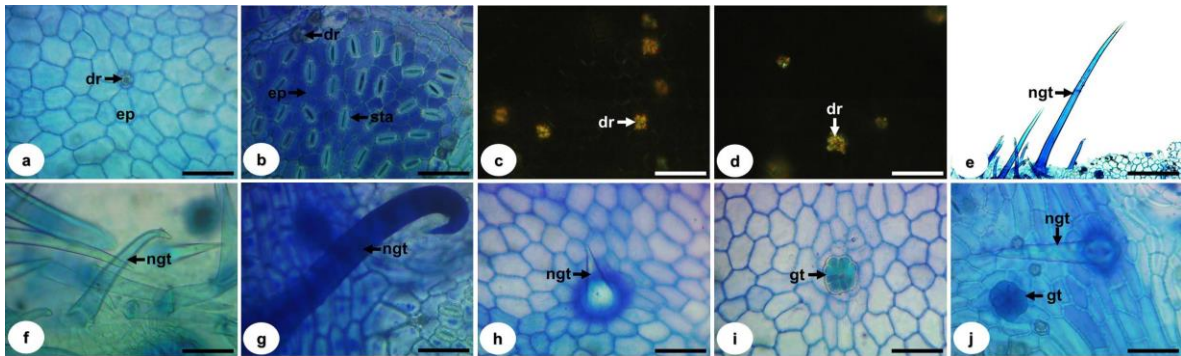


Figure 2

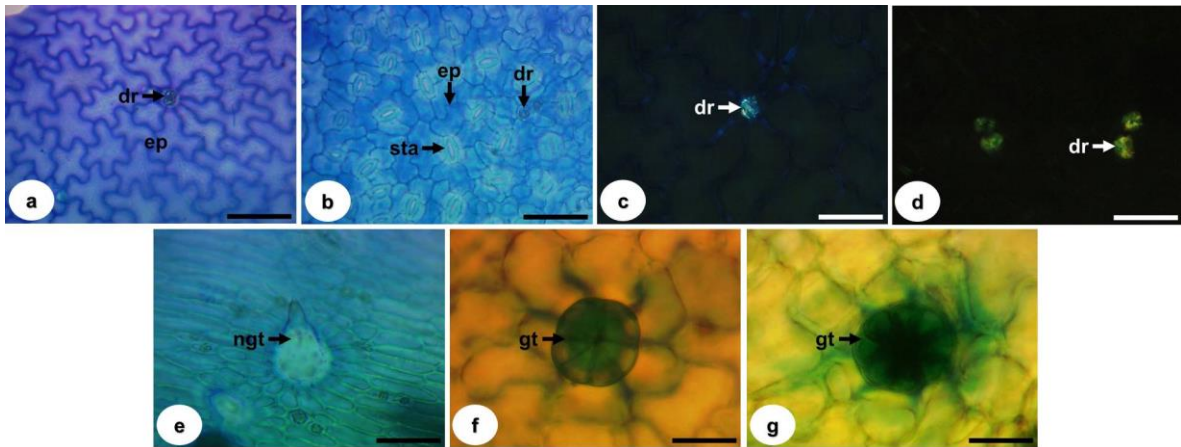


Figure 3

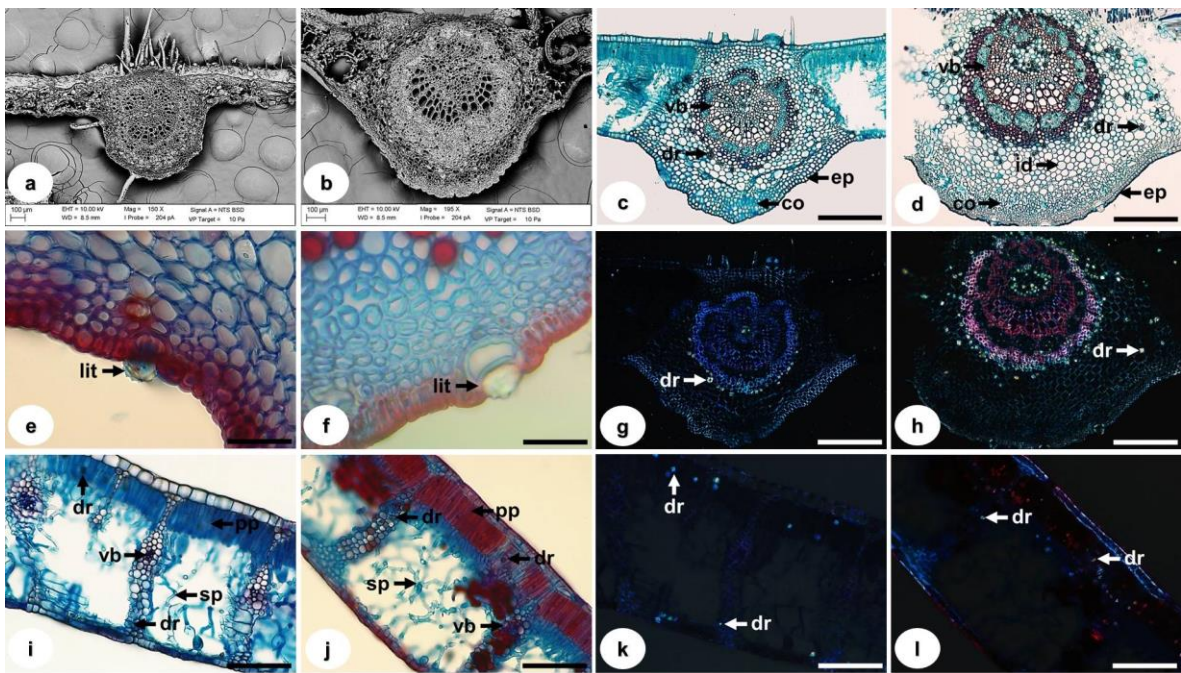


Figure 4

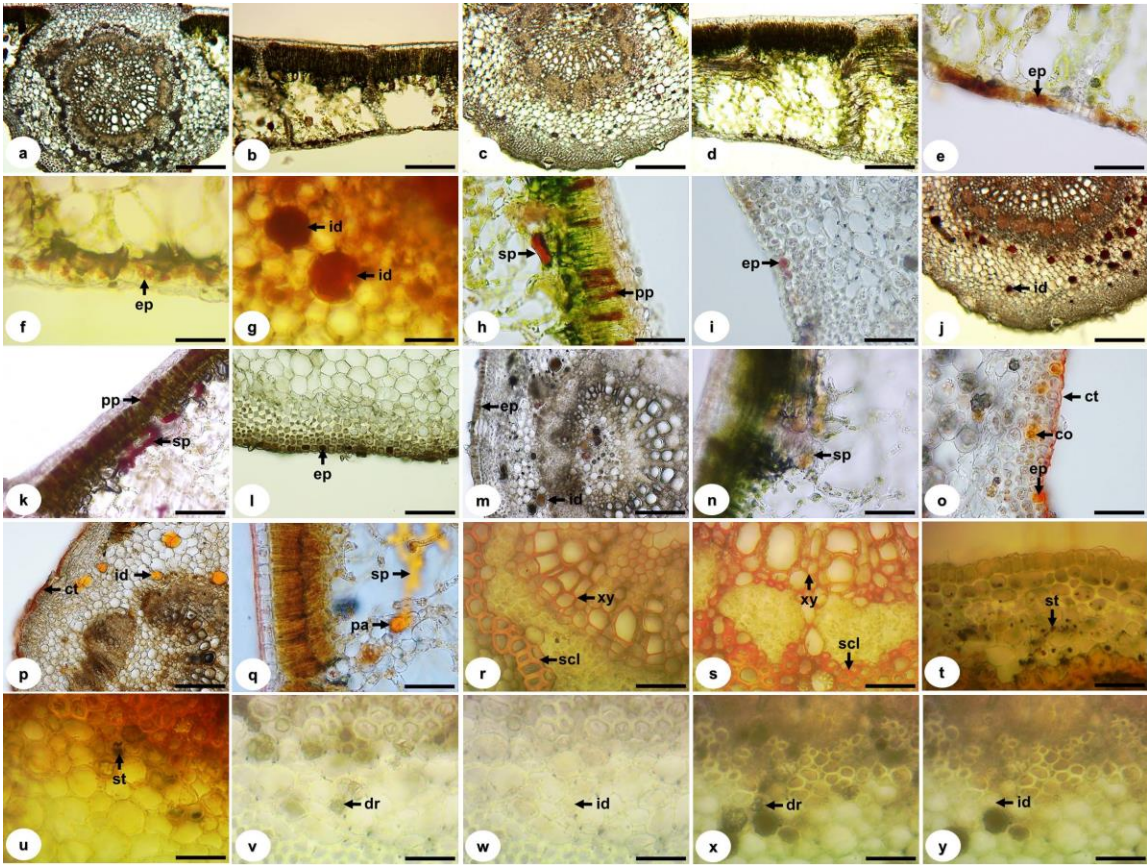
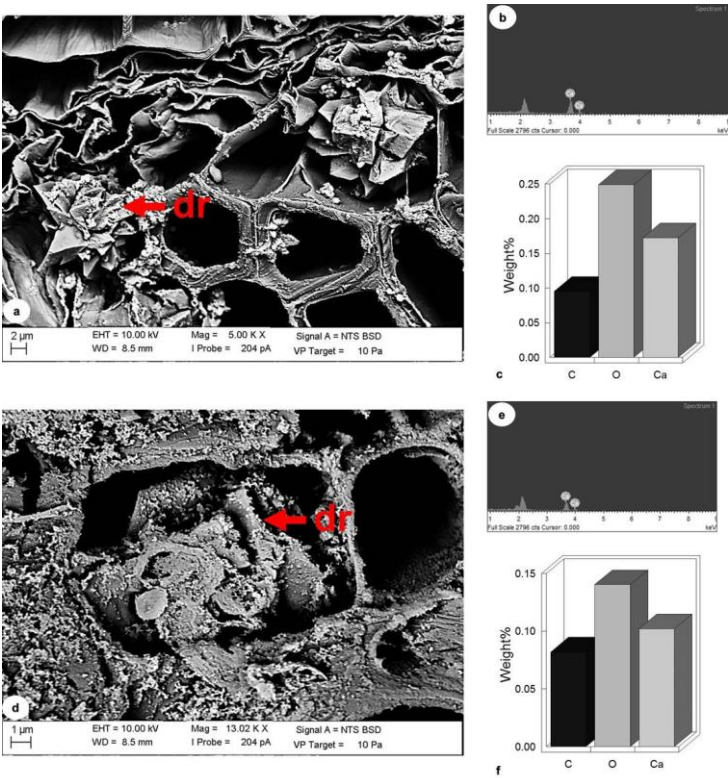


Figure 5



**APÊNDICE B – ARTIGO 2 SUBMETIDO PARA REVISTA PHARMACOGNOSY
JOURNAL**

**Anatomical study and characterization of metabolites in leaves of
Momordica charantia L.**

**Rafaela Damasceno Sá¹, Marília Barbosa Cadena¹, Rafael José Ribeiro Padilha², Luiz
Carlos Alves², Karina Perrelli Randau^{1*}**

¹ Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade
Federal de Pernambuco, Avenida Professor Arthur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE,
Brazil.

² Setor de Microscopia Eletrônica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Author for Correspondence: krandau@hotmail.com / Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de
Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacognosia, Av. Prof. Arthur de Sá S/N, CDU, Recife-PE, Brazil.

CEP: 50740-521.

ABSTRACT

Background: *Momordica charantia* L., (Cucurbitaceae), is an herbaceous plant used for food and traditional medicine. It presents a proven antidiabetic activity in the literature, being a promising species for the development of phytotherapies. **Objective:** The objective was performing an anatomical study and characterizing the metabolites present in leaves of *M. charantia*. **Materials and Methods:** Semipermanent histological slides were prepared for analysis of petiole and leaf blade in optical microscopy, polarization and scanning electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray spectrometry. Maceration and histochemical tests were also performed in the leaf blade. **Results:** The anatomical characterization revealed information about the type of trichomes, cuticle, vascular bundles and arrangement of the idioblasts and tissues that determine the botanical identity of this species. The histochemistry allowed determining the location of the metabolites and, along with the chemical microanalyses, to identify the type of crystal in the leaf blade. **Conclusion:** The results provide support to quality control of the species.

KEYWORDS: Anatomy, Bitter melon, Crystals, Histochemistry, Melão-de-São-Caetano.

INTRODUCTION

The family Cucurbitaceae contains species of economic importance in Brazil, especially those belonging to the genera *Cucurbita* L., *Momordica* L., *Fevillea* L. and *Sechium* P. Br.^[1] *Momordica* species are vegetable crops which comprise of medium sized plants that are widely distributed throughout tropical and subtropical regions.^[2] Among them stands out *Momordica charantia* L., a climbing herbaceous plant, 3-4 m long. It is commonly known as

“bitter gourd” or “bitter melon” in English and “melão-de-São-Caetano” in Brazil, where it is cultivated for consumption as fruits and vegetables.^[3-4] It is also a very common weed in orchards, coffee plantations, over fences and wastelands.^[5]

The leaves of the species is used in folk medicine as an antidiabetic^[5-6] and for malaria,^[7] worms,^[8-9] itchy skin,^[10-11] external inflammations,^[12] rheumatism^[9,13] and indigestion^[14]. According to Mentreddy^[15] *M. charantia* is probably the most researched plant among the plants known for their antidiabetic activities. There are several review studies on the antidiabetic potential of the species and also on other activities.^[3,16,17,18,19,20,21,22] The species is one of 71 species of plants present in the National Relation Medicinal Plants of Interest to Unified Health System, that have the potential to become a phytotherapeutic.^[23,24] With the purpose of contributing to the quality control of raw material of medicinal importance, this study had the objective of performing an anatomical study and characterizing the metabolites present in leaves of *M. charantia*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Adult leaves of specimens of *Momordica charantia* L., Cucurbitaceae, were collected in the neighborhood of Várzea (8°02'34.5"S, 34°56'52.9"W), Recife, Pernambuco, Brazil. A voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), under collection number 89980.

Anatomical characterization – optical microscopy

Cross-sections were obtained by hand, using a common razor blade, at the middle region of petiole and leaf blade fixed in FAA 50%.^[25] For leaf blade were also performed paradermal sections on the adaxial and abaxial faces. All sections were decolorized with sodium hypochlorite solution (50%),^[26] followed by washing with distilled water. Lastly, cross-sections were stained with safranin and astra blue^[27] and paradermal sections were stained with methylene blue (1%).^[28] Then, semipermanent histological slides were prepared containing the sections of botanical material, following common plant anatomy procedures.^[25,29] The analysis of the semipermanent histological slides were conducted on images in software (Toup View Image), obtained by digital camera coupled to an optical microscope (Alltion). Measurements of diameter of the crystals were determined using the LAS EZ program and the mean and standard deviation were calculated.

Anatomical characterization – polarized light microscopy

Semipermanent histological slides were prepared with cross-sections of leaf blades obtained by the same method used for the analysis in optical microscopy, however, the material was not stained.^[30] For the analysis of the slides was used a polarized microscope (Leica DM750M) coupled with digital camera (Leica ICC50 W), through which images were processed in software (LAS EZ).

Anatomical characterization – Scanning Electron Microscopy

Samples of fresh leaf blades were fixed in 2.5% glutaraldehyde (buffered with 0.1M sodium cacodylate) and post-fixed using 2% osmium tetroxide solution (buffered with 0.1M sodium cacodylate). After dehydration in ethanol series, the material was submitted to critical point

drying (Bal-Tec CPD 030) and mounted onto SEM stubs, using double-sided adhesive tape and sputter-coated with gold (Leica EM SCD 500).^[31] Finally, the samples were examined with a scanning electron microscope (Quanta 200 FEG) in the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Maceration

The maceration was performed using fresh leaf blades fragments that were disintegrated with the mixture of 10% nitric acid and 10% chromic acid (1:1), according to the method of Jeffrey.^[25] Semipermanent histological slides were prepared and images were obtained by digital camera coupled to an optical microscope (Alltion).

Histochemical characterization

Histochemical tests were made on cross-sections of fresh leaf blades obtained by hand, using a common razor blade.^[25] The specific reagents used were: potassium dichromate (10%) for phenolic compounds,^[32] Sudan III for lipophilic substances,^[29] Dragendorff's reagent for detecting alkaloids,^[33] vanillin chloridric for tannins,^[34] antimony trichloride for triterpenes and steroids,^[35] phloroglucinol for lignin,^[25] Lugol's iodine reagent for starch^[25] and hydrochloric acid (10%) to establish the nature of the crystals.^[36]

Analysis of the elemental composition of crystals

Cross-sections of leaf blades were processed following the same methodology described for the analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM). The chemical microanalyses by Energy

Dispersive Spectroscopy (EDS) were done with X-ray detector attached to the Zeiss-EVO-LS15 scanning electron microscope.

RESULTS

The petiole of *M. charantia*, in cross-section, has a convex shape with two ribs on the adaxial face and a triangular shape on the abaxial face (Figure 1A). The epidermis is composed of a single layer of cells and covered with a thin cuticle (Figure 1B). In the epidermis are stomata (Figure 1C), non-glandular and glandular trichomes (Figure 1D,E). The non-glandular trichomes are uniseriate and multicellular (Figure 1D) and the glandular trichomes has uniseriate pedicel and multicellular head (Figure 1E).

The angular collenchyma is discontinuous, observed below the epidermis and composed by one to three layers of cells (Figure 1A,B). The vascular system is constituted by seven bicollateral bundles, arranged in an almost closed circle, being five bundles in the central region of the petiole and two bundles in the ribs (Figure 1A,B). In the parenchyma are observed druses (Figure 1F).

In frontal view, in optical microscopy, the leaf blade of *M. charantia* is hypostomatic (Figure 2G,H), with anomocytic stomata on the abaxial face (Figure 2H). The epidermal cells have strongly sinuous walls on both sides (Figure 2G,H) and, in SEM, it is verified that they are covered by slightly striated cuticle (Figure 2I). In optical microscopy and in SEM it is also observed, between epidermal cells, some crystalliferous idioblasts in groups of two, three, four, five and six (Figure 2H,J,K,L,M) and the same types of non-glandular and glandular trichomes found in the petiole (Figure 2N,O,P,Q,R,S). The trichomes are more frequent in the region of the midrib (Figure 2R,S).

FIGURE 1

In cross-section, analyzed under optical microscopy, the midrib of *M. charantia* shows a shape that varies from plane-convex to biconvex (Figure 2A). In the latter case, the convexity of the adaxial face is discrete. The epidermis is uniseriate, with cells with external curved periclinal walls, covered with thin cuticle (Figure 2A). One to two layers of collenchyma are situated below the adaxial epidermis (Figure 2A). In the abaxial region, a discontinuous stratum of collenchyma may also occur in subepidermal position (Figure 2A).

A bicollateral vascular bundle is located in the central parenchyma region of the midrib (Figure 2A). The mesophyll of *M. charantia*, in cross-section visualized in optical microscopy, is dorsiventral, containing a layer of palisade parenchyma and up to five layers of spongy parenchyma (Figure 2B). In the abaxial epidermis are inserted idioblasts that have in their interior agglomerated crystals (Figure 2B), which are also visualized in polarized microscopy (Figure 2C). The mean diameter of the crystals was $47,28 \pm 6,05$.

In maceration of the leaf blade, in optical microscopy, were identified fragments of epidermal tissue of the abaxial face of the leaf blade, where stomata and idioblasts are visualized (Figure 2D). The idioblasts can also be identified when they are separated from the epidermal tissue, in groups, in the same way as they are observed in the paradermal sections, as shown in the Figure 2D,E,F,G,H. Vessel elements of the helical type were also identified in maceration (Figure 2I).

FIGURE 2

The Figure 3A shows cross-section of the leaf blade without addition of reagent. Phenolic compounds were found in the epidermal cells (Figure 3B). Besides phenolic compounds,

other group of metabolites demonstrated in epidermal cells of the leaf blade of *M. charantia* was alkaloids (Figure 3C).

Sudan III revealed lipophilic substances in the cuticle (Figure 3D). The phloroglucinol reagent showed the presence of lignin in the xylem (Figure 3E). Starch was found in cells of parenchyma in midrib (Figure 3F). The Figure 3G shows the presence of crystals in the idioblasts and Figure 3H shows the dissolution of the crystals with the test of hydrochloric acid (10%), indicating that they are of calcium oxalate.

The microanalyses performed by SEM-EDS in the crystals present in the idioblasts (Figure 3I) revealed peaks of absorbance for calcium, carbon and oxygen, confirming that they are formed of calcium oxalate (Figure 3J,K).

FIGURE 3

DISCUSSION/ CONCLUSION

In the present study it was found that the petiole of *M. charantia* has a convex shape with two ribs on the adaxial face and a triangular shape on the abaxial face. *M. tuberosa* Cogn. also has a triangular shape on the abaxial face, but on the adaxial face it has a convex shape.^[37] Săvulescu and Hoza^[38] observed that the cuticle is thin in the petiole of *M. charantia*, while Coutinho *et al*^[39] described the cuticle as slightly thickened. The presence of collenchyma in the petiole may be a useful feature to distinguish species of *Momordica*. Aguoru and Okoli^[40] analyzed seven species of *Momordica*, including *M. charantia*. The authors verified that *M. cabrae* (Cogn.) C.Jeffrey and *M. foetida* Schumacher et Thonn. do not have collenchyma, *M. angustisepala* Harms has only one layer of this tissue, *M. cissoides* Planch. ex Benth. and *M. multiflora* Hook.f. exhibit one to two layers, *M. charantia* exhibit two layers and *M.*

balsamina L. has three layers of collenchyma. Săvulescu and Hoza^[38] found seven bicollateral bundles in the central region of the petiole and two bicollateral bundles in the ribs of *M. charantia*. In the study of Aguoru and Okoli,^[40] with species of *Momordica*, it was shown that the number of bicollateral bundles ranges from six to eighteen.

According to Metcalfe and Chalk,^[41] non-glandular and glandular trichomes are common in the family Cucurbitaceae and, in the present study, they were visualized in the petiole and in the leaf blade of *M. charantia*. The trichomes are more frequent in the region of the midrib, corroborating the data found by Coutinho *et al.*^[39] Daleffi Zocoler *et al.*^[42] and Poyraz and Derdovsk^[43] cited only the presence of non-glandular trichomes on the leaf blade of the species. Coutinho *et al.*^[39] also studying the leaf blade of *M. charantia*, evidenced the same types of trichomes described in the present study.

In Cucurbitaceae, the stomata are of the anomocytic type and may be present on both sides of the leaf blade or restricted to the abaxial face Metcalfe and Chalk.^[41] Daleffi Zocoler *et al.*^[42] and Săvulescu and Hoza^[38] described a bicollateral vascular bundle in the central midrib of the leaf blade of the plant. However, Coutinho *et al.*^[39] reported that there are one to three vascular bundles. In the case of three vascular bundles, the central one is bigger and is of the bicollateral type and the other adjacent ones are collaterals. When there is only one vascular bundle, this is always bicollateral.

In *M. tuberosa*, the palisade parenchyma presents two layers of cells and the idioblasts are inserted in both faces of the epidermis,^[37] making these characters useful for differentiation of *M. charantia*. Analyzing the powder of the leaf blade of *M. tuberosa*, Kumar *et al.*^[37] cited that the idioblasts appear in pairs or, occasionally, in groups of more than three idioblasts.

They were not found in the literature histochemical studies with leaves of *M. charantia*. However, phytochemical studies in the literature indicate the presence of flavonoids, tannins, terpenes and alkaloids.^[44,45] In the present study, tannins and terpenes were not evidenced.

This divergence with the literature can be explained by the difference in sensitivity between the histochemical and phytochemical techniques employed.

According to Metcalfe and Chalk,^[41] in the family Cucurbitaceae are found cystoliths of calcium carbonate. However, the microanalyses by SEM-EDS and the histochemical test showed that the crystals present in the leaf blade of the species are of calcium oxalate. Calcium oxalate crystals are common in plants, are present in various forms and come from the combination of the oxalic acid resulting from the metabolism with the calcium ions absorbed by the plants.^[46] The most common forms are druses, raphides, crystalline sand and prismatic crystals. However, the crystal shape observed in the leaf blade of *M. charantia* is an exception. The diversity of shapes and sizes of calcium oxalate crystals, as well as their prevalence, is correlated with their diverse functions in plants, such as cellular ion balance, osmotic regulation, vegetable defense against herbivory, tissue mechanic support, detoxification of aluminum and heavy metals, capture and reflection of solar energy.^[46,47]

This study was intended to contribute a little more to the anatomy of *M. charantia*, a species already widely studied and used medicinally, without the pretension to exhaust, but to add. With the use of different microscopy techniques, new characters were described for *M. charantia*, hitherto not observed in the previous studies on the species.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support in the form of fellowship awards. They also thanks to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia (FACEPE) for research funding (APQ- 0220-4.03/15) and to CETENE for the analysis in SEM.

REFERENCES

1. Souza VC, Lorenzi H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2005.
2. Nagarani G, Abirami A, Siddhuraju P. Food prospects and nutraceutical attributes of *Momordica* species: a potential tropical bioresources - a review. Food Sci Hum Wellness 2014;3:117-126.
3. Beidokht MN, Jäger AK. Review of antidiabetic fruits, vegetables, beverages, oils and spices commonly consumed in the diet. J Ethnopharmacol 2017;201:26-41.
4. Lorenzi H, Lacerda MTC, Bacher LB. Frutas no Brasil: nativas e exóticas (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2015.
5. Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Plantarum; 2002.
7. Santos MRA, Lima MR, Oliveira CLLG. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. Rev Bras Pl Med 2014;16:707-720.
8. Aguiar LCGG, Barros RFM. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). Rev Bras Pl Med 2012;14:419-434.
9. Messias MCTB, Menegatto MF, Prado ACC, Santos BR, Guimarães MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. Rev Bras Pl Med 2015;17:76-104.

10. Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, Amorim ELCA. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 2007;110:76-91.
11. Liporacci HSN, Simão DG. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais nos quintais do Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba, MG. *Rev Bras Pl Med* 2013;15:529-540.
12. Cordeiro JMP, Félix LP. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba. Brasil. *Rev Bras Pl Med* 2014;16:685-692.
13. Oliveira FCS, Barros RFM, Moita Neto JM. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. *Rev Bras Pl Med* 2010;12:282-301.
14. Gomes TMF, Lopes JB, Barros RFM, Alencar NL. Plantas de uso terapêutico na comunidade rural Bezerro morto, São João da Canabrava, Piauí, Brasil. *Gaia Scientia* 2017;11:253-268.
15. Mentreddy SR. Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. *J Sci Food Agric* 2007;87:743-750.
16. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 2004;93:123-132.
17. Gupta M, Sharma S, Gautam AK, Bhadauria R. *Momordica charantia* Linn. (karela): nature's silent healer. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2011;11:32-37.
18. Joseph B, Jini, D. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pac J Trop Dis* 2013;3:93-102.
19. Panday DR, Rauniar GP, Panday KR. *Momordica charantia* (karela): and antidiabetic. *World J Pharm Sci* 2015;4:84-99.
20. Upadhyay A, Agrahari P, Singh DK. A review on salient pharmacological features of *Momordica charantia*. *Int. J. Pharm* 2015;11:405-413.

21. Ahmad N, Hasan N, Ahmad Z, Zishan M, Zohrameena S. *Momordica charantia*: for traditional uses and pharmacological actions. J Drug Deliv Ther 2016;6:40-44.
22. Tan SP, Kha TC, Parks SE, Roach PD. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: a review. Food Rev Int 2016;32:181-202.
23. Brasil. Plantas de interesse ao SUS. Ministério da Saúde; 2009.
24. Marmitt DJ, Rempel C, Goettert MI, Silva A,C. Revisão sistemática sobre a produção científica de plantas medicinais da RENISUS voltadas ao Diabetes mellitus. Caderno Pedagógico, Lajeado 2015;12:87-99.
25. Johansen DA. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill; 1940.
26. Kraus JE, Arduin M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR; 1997.
27. Bukatsch F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 1972;61:255.
28. Krauter D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. Mikrokosmos, 1985;74:231-233.
29. Sass JE. Botanical microtechnique. Ames: Iowa State College Press; 1951.
30. Zhang J, Lu H, Huang L. Calciphytoliths (calcium oxalate crystals) analysis for the identification of decayed tea plants (*Camellia sinensis* L.). Sci Rep 2014;4:1-9.
31. Haddad A, Sessos A, Attias M, Farina M, Nazareth MM, Silveira M, et al. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica; 1998.
32. Gabe M. Techniques histologiques. Paris: Masson & Cie; 1968.
33. Yoder LR, Mahlberg PG. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Am J Bot 1976;63:1167-1173.

34. Mace MZ, Howell CR. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Can J Bot* 1974;52:2423-2426.
35. Mace ME, Bell AA, Stipanovic RD. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. *Phytopathology* 1974;64:1297-1302.
36. Jensen WA. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman & Co; 1962.
37. Kumar P, Rao D, Bilakanti L, Setty R. (2010). Pharmacognostical studies on *Momordica tuberosa* Cogn. *Pharmacogn J* 2010;2:28-33.
38. Săvulescu E, Hoza G. Research results regarding the anatomy of *Momordica charantia* L. specie. *Lucrări științifice USAMVB, Seria B, LIV* 2010;694-700.
39. Coutinho DF, Florêncio JC, Aguiar LR, Rodrigues KAF, Vilanova CM, Borba ERC. Estudo farmacobotânico das folhas de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Visão Acadêmica* 2009;10:7-17.
40. Aguoru CU, Okoli BE. Comparative stem and petiole anatomy of West African species of *Momordica* L (Cucurbitaceae). *Afr J Plant Sci* 2012;6:403-409.
41. Metcalfe CR, and Chalk L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press; 1950.
42. Daleffi Zocoler AM, Mourão KSM, Mello JCP, Marques LC. Contribuição ao controle de qualidade farmacognóstico das folhas e caules de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L. – Cucurbitaceae). *Acta Farm Bonaer* 2006;25:22-27.
43. Poyraz IE, Derdovski C. Morpho-anatomical investigations on *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Anadolu Univ J of Sc. and Technology – C – Life Sci and Biotech* 2016;5:23-30.

44. Alencar NL, Araújo TAS, Amorim ELC, Albuquerque UP. The inclusion and selection of medicinal plants in traditional pharmacopoeias - evidence in support of the diversification hypothesis. *Econ Bot* 2010;64:68-79.
45. Rodrigues KAF, Dias CN, Florêncio JC, Vilanova CM, Gonçalves JRS, Moraes DFC. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia*. *Cadernos de Pesquisa* 2010;17:69-76.
46. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol* 2005;56:41-71.
47. Franceschi VR, Horner HTJr. Calcium oxalate in plants. *Bot Rev* 1980;46:361-427.

Figure 1: Cross-sections of the petiole and frontal view and SEM of the leaf blade of *Momordica charantia* L.

Petiole: **A,B,C,D,E,F**. Leaf blade: **G**. adaxial face. **H,I**. abaxial face. **J**. idioblasts in groups of three. **K**. idioblasts in groups of four. **L**. idioblasts in groups of five. **M**. idioblasts in groups of six. **N,O**. non-glandular trichome in adaxial face. **P**. glandular trichome in abaxial face. **Q**. glandular trichome in adaxial face. **R,S**. trichomes in midrib. co: collenchyma, ct: cuticle, dr: druse, ep: epidermis, gt: glandular trichome, id: idioblasts, ng: non-glandular trichome, sta: stomata, vb: vascular bundle. Bars: **A**. 500 μm ; **B**. 200 μm ; **O,S**. 100 μm ; **C,D,E,F,G,H,J,K,L,M,N,P,R**. 50 μm ; **I,Q**. 25 μm .

Figure 2: Cross-sections and maceration of the leaf blade of *Momordica charantia* L.

A. midrib. **B**. mesophyll. **C**. idioblasts in polarized microscopy. **D**. maceration showing stomata and idioblasts in groups of two. **E**. idioblasts in groups of three. **F**. idioblasts in groups of four. **G**. idioblasts in groups of five. **H**. idioblasts in groups of six. **I**. vessel element. co: collenchyma, ep: epidermis, id: idioblasts, pa: parenchyma, pp: palisade parenchyma, sp: spongy parenchyma, sta: stomata, vb: vascular bundle, ve: vessel element. Bars: **A**. 200 μm ; **B,D,E,F,G,H,I**. 50 μm ; **C**. 40 μm .

Figure 3: Histochemistry, scanning electron micrograph and elemental composition of the crystals of the leaf blade of *Momordica charantia* L.

A. control. **B**. potassium dichromate (10%). **C**. Dragendorff's reagent. **D**. Sudan III. **E**. phloroglucinol. **F**. Lugol's iodine reagent. **G,H**. hydrochloric acid (10%). **I**. idioblast in mesophyll. **J**. analysis of elemental composition of the crystal. **K**. percentage of the chemical constituents of the crystal. ct: cuticle, ep: epidermis, id: idioblasts, st: starch, xy: xylem. Bars: **A**. 200 μm ; **B,C,D,E,F,G,H**. 50 μm ; **I**. 40 μm .

Figure 1

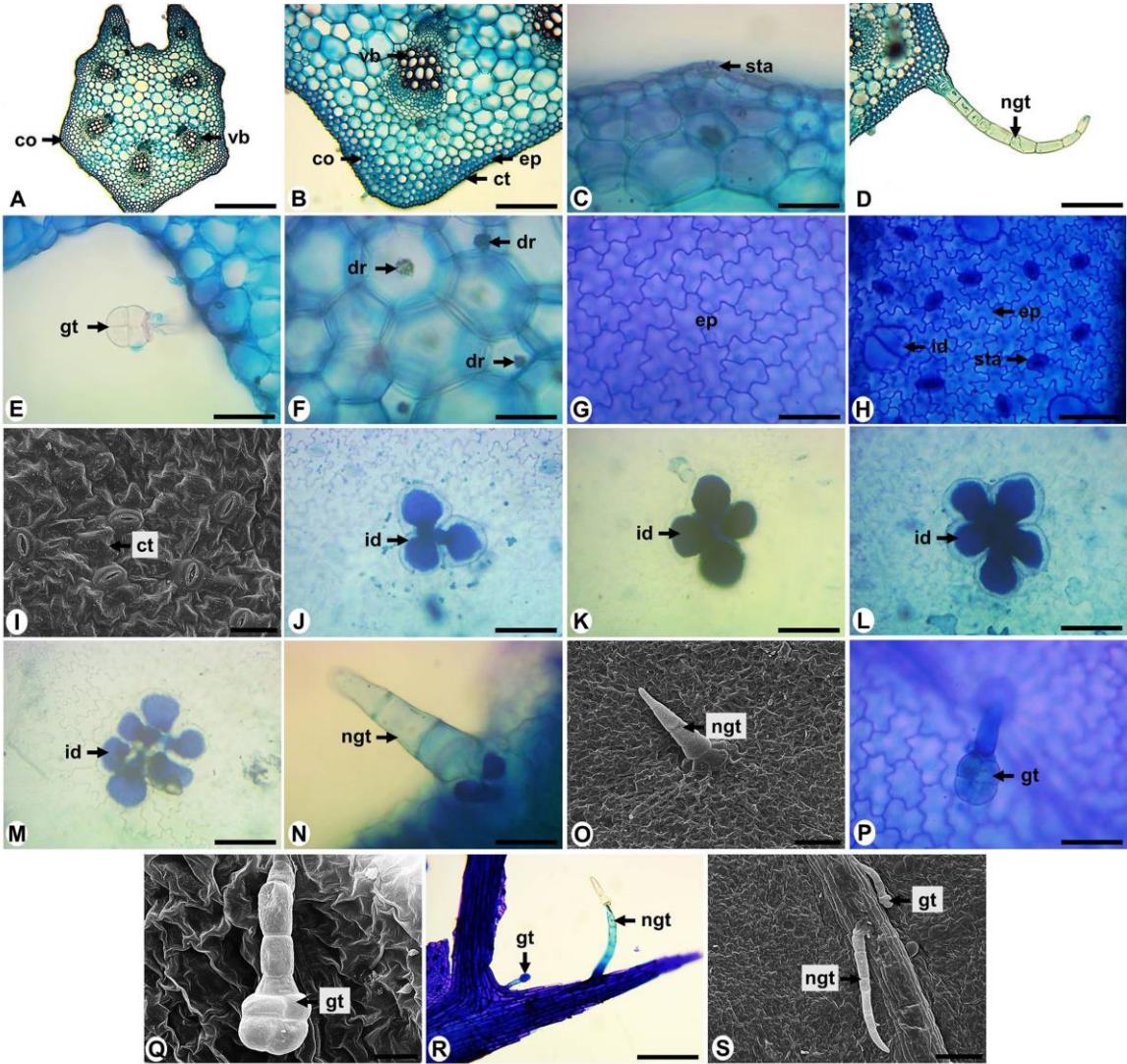


Figure 2

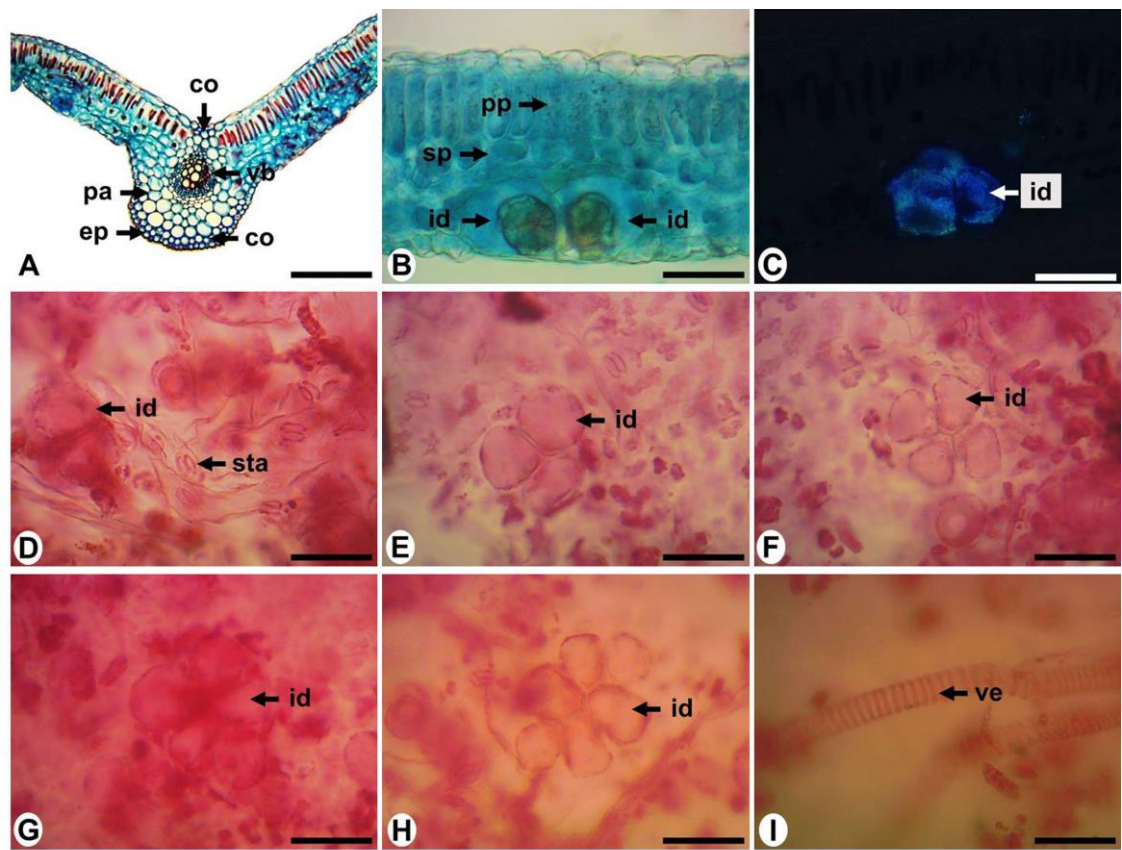


Figure 3

