

# Caracterização morfo-anatômica e testes fitoquímicos em amostras comerciais de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)

Morphological and anatomical description and phytochemical tests in samples of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)

DOI 10.5935/2446-4775.20160030

<sup>1</sup>NASCIMENTO, Alan M.; <sup>1</sup>TORRES, José C.; <sup>1</sup>MARQUES, Carlos A.\*

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, RJ, Brasil.

\*Correspondências: [carlos.alexandre@ifrj.edu.br](mailto:carlos.alexandre@ifrj.edu.br)

## Resumo

O juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae) é uma espécie endêmica da caatinga, utilizada na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites, úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos e dentífricos. Fragmentos da casca são amplamente comercializados na forma de pós ou “raspas”, o que facilita sua adulteração. Este trabalho tem como objetivo descrever e analisar aspectos morfológicos, anatômicos e fitoquímicos de amostras da casca vendidas no comércio formal e informal. As análises microscópicas e fitoquímicas realizadas permitiram observar que uma das cinco amostras estudadas apresentou adulteração, evidenciada pelo estudo fitoquímico e microscópico. A descrição anatômica da casca, até então inédita, revelou caracteres típicos da família que podem ser usados como diagnósticos, do ponto de vista farmacognóstico.

**Palavras-chave:** *Ziziphus joazeiro*. Testes fitoquímicos. Anatomia da casca.

## Abstract

The juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae) is an endemic species of the Brazilian caatinga used in folk medicine as an expectorant, in the treatment of bronchitis, gastric ulcers, in the manufacture of cosmetics and toiletries. Bark fragments are negotiated in form of powder or “rasps”, which facilitates their adulteration. This study aimed to describe and analyze morphological, anatomical and phytochemical aspects of bark samples sold in the formal and informal trade. Microscopic and phytochemical analyzes allowed to observe that one of the five samples revealed adulteration, evidenced both in phytochemical as microscopic analysis. The anatomical description of the stem bark until then unpublished, revealed typical characters of the family and can be used in its diagnosis.

**Keywords:** *Ziziphus joazeiro*. Phytochemical tests. Bark anatomy.

---

## Introdução

Rhamnaceae compreende 58 gêneros e 900 espécies (Lima, 2006) distribuídas nas regiões temperadas e nos trópicos (Lima e Giulietti, 2014). No Brasil, são registrados 14 gêneros e 47 espécies que ocorrem em todos os domínios fitogeográficos (BFG, 2015). A família é caracterizada pelo hábito herbáceo, arbustivo, arbóreo ou lianescente, flores com pétalas cuculadas, convolutas ou conchiformes, estames opostos às pétalas e disco nectarífero (Lima e Giulietti, 2005; Lima e Giulietti, 2014).

Com nove espécies, *Ziziphus* Mill. é um dos gêneros com maior diversidade para a família no Brasil (BFG, 2015). Dentro do gênero, destaca-se o Juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.). Barroso e colaboradores (1991) relatam, como caracteres marcantes, a presença de folhas trinérveas de nervuras não ramificadas, percorrendo o limbo desde a base até o ápice; a presença de drupas globosas à elipsoides com um a três lóculos, indeiscente; e flores tipicamente dispostas em inflorescências auxiliares ou terminais; de modo que, em *Z. joazeiro*, ocorrem tais caracteres, evidenciando-se indivíduos com até 16 m de altura, apresentando-se como árvores frondosas, com tronco de 39 a 50 cm de diâmetro, ramos armados de fortes espinhos e uma copa mais larga do que alta. As folhas possuem as características diagnósticas do gênero, ressaltando-se as três nervuras principais bem visíveis, partindo da base, o formato elíptico, a textura semicoriácea com tamanho variando de 3 à 7 cm; flores amarelo-esverdeadas, reunidas em inflorescências cimosas e de tamanho pequeno e frutos do tipo drupa, sendo esta globosa, de coloração amarelada, com endocarpo grande, coberto por uma polpa mucilagínosa, branca e doce (LORENZI e MATOS, 2008). Trata-se de uma espécie endêmica, do domínio da Caatinga e que ocorre nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe (BFG 2015).

O Juazeiro possui grande importância econômica e ecológica (OLIVEIRA et al., 2012). A espécie apresenta potencial ornamental, sua madeira pode ser utilizada em construção, marcenaria e na produção de lenha e carvão, suas folhas são utilizadas na alimentação do gado e seus frutos são consumidos tanto pela população do nordeste brasileiro, quanto por aves e outros animais (KATO, 1996).

Todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular, sendo os fragmentos da casca usados como antisséptico bucal, antimicótico, expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas e na fabricação de cosméticos (ALBUQUERQUE et al., 2007; CRUZ et al., 2007, KATO, 1996).

Apesar da ampla utilização dos produtos tradicionais fitoterápicos na medicina popular, como fragmentos de cascas e raspas de juá, podem ocorrer problemas de contaminações durante a obtenção da matéria-prima (Souza-Moreira, Salgado e Pietro, 2010). A falta de conhecimento da espécie correta pelo seu nome científico, contaminações acidentais ou até mesmo a sua adulteração proposital pelos coletores e distribuidores do material, durante a coleta da matéria-prima, ou até mesmo adulteração para aumentar o rendimento do produto final, podem ocasionar riscos ao consumidor, contribuindo negativamente para diminuir a eficácia dos fitoterápicos (LEAL e TELLIS 2015; SOUZA-MOREIRA, SALGADO e PIETRO, 2010). Por tal motivo, a ANVISA faz clara menção à importância do controle de qualidade de drogas vegetais e medicamentos fitoterápicos no Consolidado de Normas da COFID (BRASIL, 2015), onde reporta a necessidade de diversas análises laboratoriais vigentes na RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 (BRASIL, 2014), dentre elas as caracterizações microscópica e macroscópica de tais fitoterápicos, além da

apresentação do perfil cromatográfico da droga vegetal, acompanhado da respectiva imagem em arquivo eletrônico reconhecido pela ANVISA, como comparação que possa garantir a identidade do produto (BRASIL, 2010).

A Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) instrui a execução da análise macroscópica das drogas, quando inteiras, baseando-se na forma; tamanho; cor; superfície; textura; fratura e aparência da superfície. Além disso, recomenda ainda a realização de análises físico-químicas e microscópicas do material vegetal, principalmente quando a amostra estiver rasurada ou em pó. Não obstante, a cromatografia em camada delgada (CCD) também constitui um método bastante útil, por ser: fácil, versátil e rápido, além de proporcionar uma análise qualitativa dos marcadores químicos da droga (SOUZA-MOREIRA, SALGADO e PETRO, 2010).

Assim, o presente estudo tem o objetivo de descrever e comparar caracteres macromorfológicos, anatômicos e fitoquímicos da casca e das folhas de espécimes de *Ziziphus joazeiro* obtidas no comércio formal, informal e coletados em populações naturais para detectar a presença de caracteres diagnósticos e metabólitos característicos, que possam ser utilizados no controle de qualidade de amostras dessa espécie, em consonância com a legislação vigente.

## Material e Métodos

### Coleta do material

Foram obtidas cinco amostras de *Ziziphus joazeiro* Mart., sendo duas delas em fragmentos grosseiros de casca, obtidas no comércio informal, com um erveiro na Estação Ferroviária de Nilópolis, RJ (1) e com um erveiro, nos Arredores do Mercado Municipal Antônio Franco, em Aracaju, SE (3). Além disso, obtiveram-se outras duas amostras em pó, uma delas no comércio formal, localizado à Avenida Getúlio Vargas, no Centro de Nilópolis, RJ (2), e outra no comércio informal, também obtida nos Arredores do Mercado Municipal Antônio Franco, em Aracaju, SE (4). Uma quinta amostra (5), adotada como padrão de comparação, inclusive para fins de identificação, foi coletada na zona do brejo, no município de Alagoa Grande, PB, cuja exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UFRJ, sob o número RFA 40.634. Nesta última, coletaram-se fragmentos de casca e folhas do mesmo indivíduo, as quais foram previamente identificadas como *Ziziphus joazeiro*.

### Descrição macromorfológica

A caracterização macroscópica das amostras de cascas obtidas (materiais 1 a 5, descritos no item anterior) foi realizada por meio de observação com o auxílio de um microscópio estereoscópico Bioval EL224, comparando-se com os caracteres morfológicos descritos por Oliveira, Akisue e Akisue (1991), Metcalfe e Chalk (1950) e Carvalho (2007). Do mesmo modo, analisaram-se as folhas coletadas do mesmo indivíduo de onde se obteve as amostras de casca número (5), provenientes de Alagoa Grande, PB, na zona do brejo, as quais foram adotadas como padrão, tendo em vista sua importância na identificação e caracterização do material botânico estudado.

## Descrição micromorfológica

Para a análise em microscopia fotônica da matéria-prima vegetal em pó (materiais 2 e 4), foram adotados dois procedimentos distintos, adaptados de Kraus e Arduin (1997). No primeiro, todas as amostras foram clarificadas com a mistura de ácido acético e peróxido de hidrogênio na proporção volumétrica 1:1, lavadas em água destilada, desidratadas em etanol 70% em água e coradas com safranina hidroalcoólica 1%, sendo montados em lâminas semipermanentes, usando-se glicerina 50% em água.

No segundo procedimento, as amostras de fragmentos da casca (1, 3 e 5) foram imersas durante 72h usando-se a *mistura de Jeffrey*, uma solução de ácido nítrico 10% e ácido crômico 10% na proporção volumétrica 1:1, ou utilizando etilenodiamina 10%. Por fim, o material foi macerado manualmente, com auxílio de graal e pistilo de porcelana, sendo em seguida lavados em água destilada, filtrados, desidratados, corados e montados em lâminas semipermanentes de maneira semelhante ao procedimento anterior (JOHANSEN, 1940).

Foram ainda reservadas frações de cada amostra, sem passar pelos processos supracitados, sendo estas consideradas como controle, a fim de avaliar a eficácia de cada método.

As folhas adotadas como padrão foram analisadas ao microscópio fotônico após serem diafanizadas com hipoclorito de sódio 5% em estufa aquecida à 60°C durante 10 min seguida por três lavagens em água destilada, durante 5 min cada, sob aquecimento em estufa à 60°C, conforme referem Kraus e Arduin (1997). Posteriormente, estas foram parcialmente desidratadas em etanol 70% e coradas com safranina hidroalcoólica 1% durante 2min, para, enfim, serem montadas em lâminas semipermanentes, usando-se glicerina 50% ou gelatina glicerinada de Kaiser como meio de montagem (Johansen, 1940), onde foram examinadas as características anatômicas, tanto na face abaxial quanto na adaxial.

No procedimento para obtenção dos cortes anatômicos, os fragmentos de casca foram lapidados em formato de paralelepípedo, amolecidos em etilenodiamina 10% durante 72h, lavados três vezes em água destilada com ciclos a cada 24h e emblocados em polietileno glicol peso molecular 1500, conforme a metodologia proposta por Barbosa e colaboradores (2001).

Estes blocos foram montados em suporte de madeira nas disposições longitudinal tangencial, radial e transversal. Para a confecção dos cortes histológicos, os blocos foram seccionados com espessura entre 25 e 45 µm em micrótomo rotativo da marca Yadi modelo YD-315 com navalhas de aço Leica, em virtude da grande maciez apresentada pelo material botânico. Em seguida, os cortes obtidos tiveram a resina removida por água destilada, sendo submetidos à desidratação por etanol 70% em água. Os cortes foram corados com safrablau (1 parte de safranina para 9 partes de azul de astra), segundo Bukatsch (1972) e montados em lâminas semipermanentes com glicerina 50% ou com gelatina glicerinada de Kaiser, segundo Johansen (1940). Para medições na casca foram utilizados ocular e/ou régua micrométrica PZO, além do software presente no microscópio eletrônico de varredura. Todos os cortes obtidos foram fotografados usando-se máquina digital acoplada ao microscópio fotônico Alltion Co., série ABM100 ou ao microscópio fotônico binocular Ernst Leitz Wetzlar dfv.

Para análise ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), foram obtidos cortes no plano tangencial, seguindo a metodologia já descrita. Os cortes foram montados em fita dupla face da marca 3M e grafite coloidal em *stubs* de alumínio com diâmetro de 12,7 mm, ambos da marca Ted Pella Inc., sendo analisados

no MEV Phenom World, modelo Pro X, com porta amostra redutor de carga, sem necessidade de metalização das amostras, o canhão de elétrons foi configurado no modo Image em 10 kV, para geração de eletromicrografias, e 15 kV para microanálise de raios-x (EDS).

### Estudo fitoquímico

A partir dos materiais vegetais descritos anteriormente, prepararam-se extratos etanólicos por meio da metodologia de Kato (1996) adaptada. A partir de 10 g, cada amostra triturada manualmente foi submetida a extração com 40 mL etanol P.A. em frascos separados, à frio, durante 72 h, sem agitação. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até o volume próximo de 5 mL. Estes foram submetidos aos testes fitoquímicos de precipitação, segundo Barbosa e colaboradores (2001), para detecção de: saponinas, pelo teste de formação de uma coluna de espuma; flavonoides, por meio da reação de Shinoda; fenóis e taninos, pela reação à solução de cloreto férrico 2%; alcaloides, pelos reativos de Mayer e Bouchardat; e esteroides e triterpenos, com a reação de Liebermann-Bouchard (BARBOSA et al., 2001; KATO, 1996; MATOS, 1997).

Para a análise por cromatografia em camada delgada dos extratos, seguiu-se a metodologia de Kato (1996) com modificações. Foram utilizadas, como fase estacionária, placas de alumínio revestidas com sílica gel 60G e revelador F<sub>254</sub> da Merck, em sistemas de eluição com polaridade variada e reveladores químicos mais específicos, conforme descrito na (TABELA 1).

**TABELA 1.** Sistemas cromatográficos utilizados nos testes fitoquímicos realizados.

Placa	Eluente	Revelador
1	Clorofórmio-acetato de etila (9:1)	Anisaldeído sulfúrico
2	Hexano-acetato de etila (3:7)	Anisaldeído sulfúrico
3	Clorofórmio-ácido acético glacial-metanol-água (64:32:12:8)	NP/PEG
4	Clorofórmio-acetato de etila (9:1)	Vanilina sulfúrica
5	Hexano-acetato de etila (3:7)	Vanilina sulfúrica
6	Clorofórmio-ácido acético glacial-metanol-água (64:32:12:8)	Vanilina sulfúrica
7	Tolueno-acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica
8	Acetato de etila	Dragendorff modificado

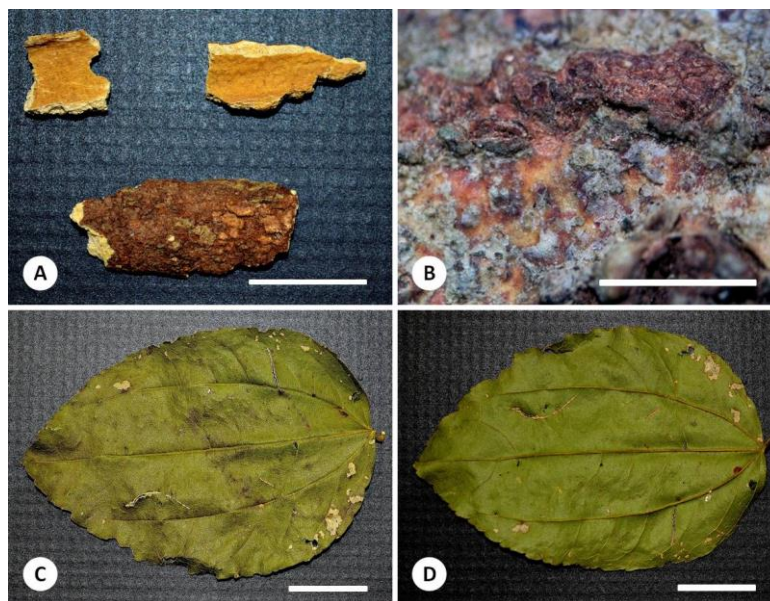
## Resultados e Discussão

### Descrição macromorfológica

Todas as cascas, observadas ao microscópio estereoscópico, possuem fragmentos com formato encurvado, com uma face côncava e outra convexa. Oliveira, Akisue e Akisue (1991) afirmam que as cascas podem ser classificadas em quatro categorias: 1 – planas, 2 – encurvadas, 3 – canaletadas (forma de canal ou goteira) ou 4 – em forma de canudo (quando as margens se recobrem). Dessa forma, todas as amostras analisadas enquadram-se no padrão 2 (FIGURA 1A). Da mesma maneira, encontra-se uniformidade nos aspectos externos das cascas dos materiais 1 e 5 que possuem ritidoma de cor cinza escuro à castanho, consistência rígida, pouco desenvolvida e textura rugosa, além de apresentar placas quadradas e uniformes no ritidoma, medindo entre 1 à 3 mm de largura (FIGURA 1B), enquadrando-se na descrição feita por Carvalho (2007). Já a casca 3 teve boa parte de seu súber removido mecanicamente, por raspagem, de maneira intencional.

Quanto ao aspecto da superfície interna, todos os fragmentos apresentaram-se em conformidade com as características descritas na literatura, apresentando textura rugosa, coloração amarela, variando-se a tonalidade e fratura levemente fibrosa, de acordo com os padrões descritos por Oliveira, Akisue e Akisue (1991), com pequenos grupos contendo essas estruturas, visíveis nitidamente a olho nu. Esses fatores indicam, portanto, a autenticidade de todas as amostras de fragmentos da casca.

**FIGURA 1** – A: Amostra1, evidenciando os aspectos gerais da casca nas faces interna e externa. Barra = 2 cm. B: Detalhe do ritidoma. Barra = 1 cm. C: Face adaxial da folha de *Ziziphus joazeiro*. D: Face abaxial da folha de *Ziziphus joazeiro*. Barras = 1 cm.



A análise das folhas ao microscópio estereoscópico (**FIGURA 1C e 1D**) mostrou que estas apresentam consistência membranácea a levemente coriácea, formato ovalado a elíptico, com base cordada a obtusa, ápice curto-acuminado, margem finamente serrada, face adaxial e abaxial glabrescente, com três nervuras inferiormente pubescentes bem visíveis, partindo da base; pecíolo medindo de 0,5 cm a 0,8 cm de comprimento, pubescente; e estípulas com 1,0 mm a 1,5 mm de comprimento e 0,8 mm a 1,0 mm de largura, o que está de acordo com as descrições de Joly (1976), Souza e Lorenzi (2008), Carvalho (2007) e Gonçalves e Lorenzi (2011).

### Descrição micromorfológica

A observação das lâminas foliares, ao microscópio óptico, revelou a presença, na face adaxial, de células epidérmicas com paredes sinuosas e ausência de tricomas. No mesófilo, há ocorrência de drusas de oxalato de cálcio dispersas pelo parênquima paliçádico e cristais prismáticos margeando as nervuras principais da folha. Na face abaxial, nota-se a presença de numerosos estômatos anomocíticos e raros tricomas tectores (**FIGURA 4A, B e C**).

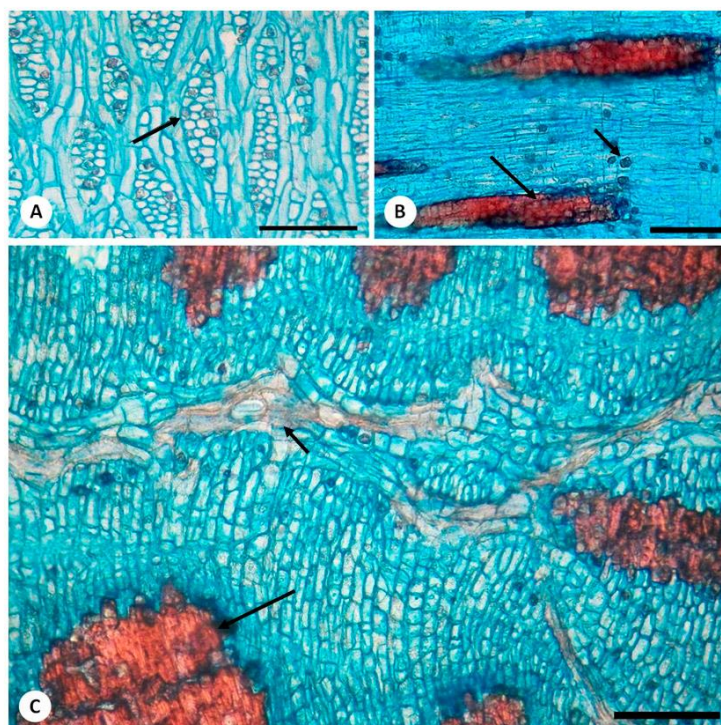
No material controle, a anatomia da casca revelou caracteres diagnósticos. O câmbio vascular apresenta drusas de oxalato de cálcio nas iniciais radiais (**FIGURA 2A**), que se tornam abundantes e bem visíveis nas demais regiões da casca. Raramente ocorrem drusas nas iniciais fusiformes. Por vezes, as esclereídes formam idioblastos a partir das iniciais radiais, sempre em células que contêm cristais prismáticos. Esses



grupos de braquiesclereídes tornam-se numerosos nas outras regiões da casca e estão aleatoriamente distribuídos, podendo ser vistos nitidamente nos três planos de corte.

Em secção tangencial pode-se ver cordões estreitos, constituídos de fibras e outra células com paredes esclerificadas e aspecto retangular, por vezes alongadas, contendo 2 ou 3 células de largura. Grandes grupos de esclereídes distribuem-se em meio às demais células (**FIGURA 2C**). Por vezes, nota-se a presença de fibras que contêm cristais prismáticos. Os elementos de tubo crivado, melhor visualizados neste plano por microscopia eletrônica de varredura, apresentam dimensões médias de 122  $\mu\text{m}$  de comprimento por 20  $\mu\text{m}$  de largura e placas crivadas que medem até 34  $\mu\text{m}$ . Estas células sempre se encontram margeadas por outras de natureza parenquimática, contendo cristais prismáticos no seu interior, formando uma bainha cristalífera ao redor dos elementos condutores (**FIGURA 5A**).

**FIGURA 2** – A: Secção longitudinal tangencial, mostrando o câmbio vascular de aspecto típico, evidenciando a presença de drusas nas iniciais radiais (seta). Barra = 150  $\mu\text{m}$ . B: Secção radial da casca de *Ziziphus joazeiro*, evidenciando grupos de fibras com cristais prismáticos (seta maior) e; drusas nas demais células (seta menor) do floema. Barra = 150  $\mu\text{m}$ . C: Detalhe mostrando os estreitos cordões de células esclerificadas e fibras (seta menor) e grandes grupos de esclereídes encontrados no floema (seta maior). Barra = 200  $\mu\text{m}$ .

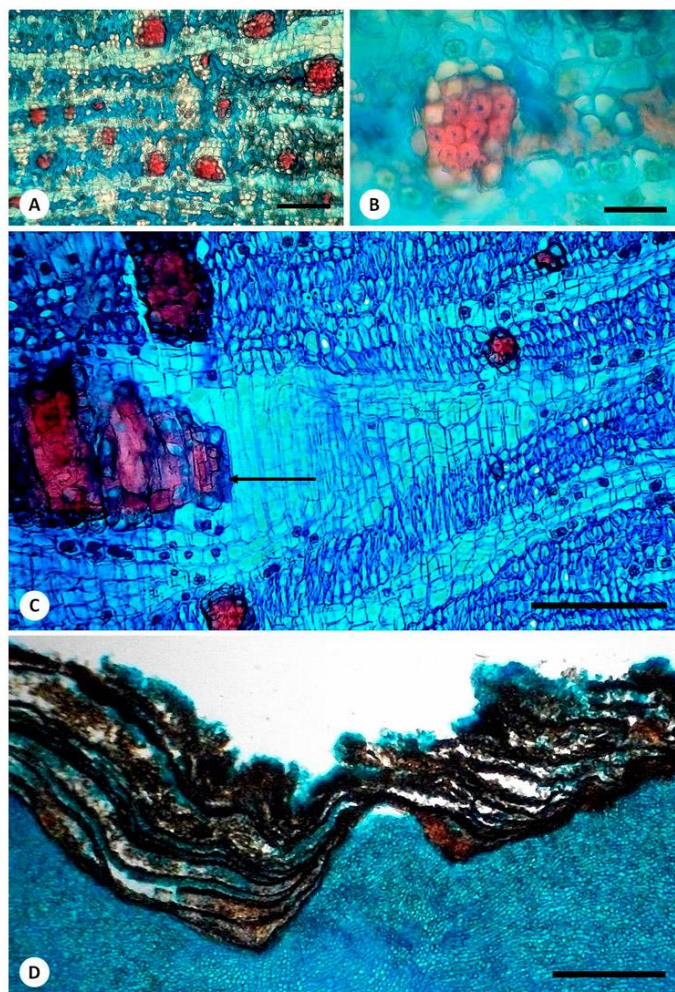


No plano radial, os grupos de fibras, mencionados anteriormente, podem ser claramente vistos, distribuindo-se no sentido das demais células que formam os cordões parenquimáticos (**FIGURA 2B**). Essas fibras são gelatinosas, o que pode ser evidenciado pela observação das mesmas em corte transversal (**FIGURA 3B**). Os raios parenquimáticos possuem de 5 a 17 estrados celulares com espessura que varia de 10 a 36  $\mu\text{m}$ , com espessura média de 20  $\mu\text{m}$ . Muitas dessas células armazenam drusas, já observadas desde as iniciais radiais, conforme mencionado (**FIGURA 2B**). É comum a ocorrência de grãos de amido em células parenquimáticas, evidenciadas pelo teste com Lugol, ocorrendo sem localização preferencial na casca.

No corte transversal, os raios têm, em geral, aspecto sinuoso (**FIGURA 3A**). O parênquima axial possui, em média, três células de espessura. Antes de sofrerem alargamento possuem largura mínima de 26  $\mu\text{m}$ . Depois, possuem média de 127  $\mu\text{m}$  e máxima de 300  $\mu\text{m}$ . Durante seu desenvolvimento, algumas dessas regiões se tornam bem dilatadas pelo desenvolvimento de grandes idioblastos no seu interior, formados por esclereídes, muitos deles, contendo cristais prismáticos (**FIGURA 3C**). Esses raios mais dilatados, em geral, se anastomosam. Nesse plano de corte, pode-se ver que grupos de fibras e esclereídes ocupam os espaços entre os raios, em meio ao parênquima axial, já os maiores grupos de idioblastos medindo, em média, 28  $\mu\text{m}$ , ocupam o interior do raio, conforme já mencionado (**FIGURA 3C**). O padrão de distribuição dos dois tipos de cristais se mantém.

O floema não colapsado apresenta, em média, área de aproximadamente 156  $\mu\text{m}$ , já o floema colapsado, apresenta área total média de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . Nesta região, também se observam os idioblastos de esclereídes alargando o raio, mas poucas fibras. Na região mais externa da casca, observa-se o desenvolvimento de um ritidoma de aspecto irregular, consistindo de células da periderme e de tecidos por elas globadas e cujas camadas se formam e se esfoliam sequencialmente (**FIGURA 3D**).

**FIGURA 3** – (A) Fotomicrografia da secção transversal da casca, mostrando uma visão geral do floema não colapsado, em objetiva de 4x. Barra = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Pequeno grupo de fibras gelatinosas, parcialmente circundadas por cristais. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Detalhe do floema não colapsado. A seta indica um grupo de esclereídes, muitos deles, contendo cristais prismáticos. Barra = 25  $\mu\text{m}$ . (D) Ritidoma em detalhe. Barra = 500  $\mu\text{m}$ .



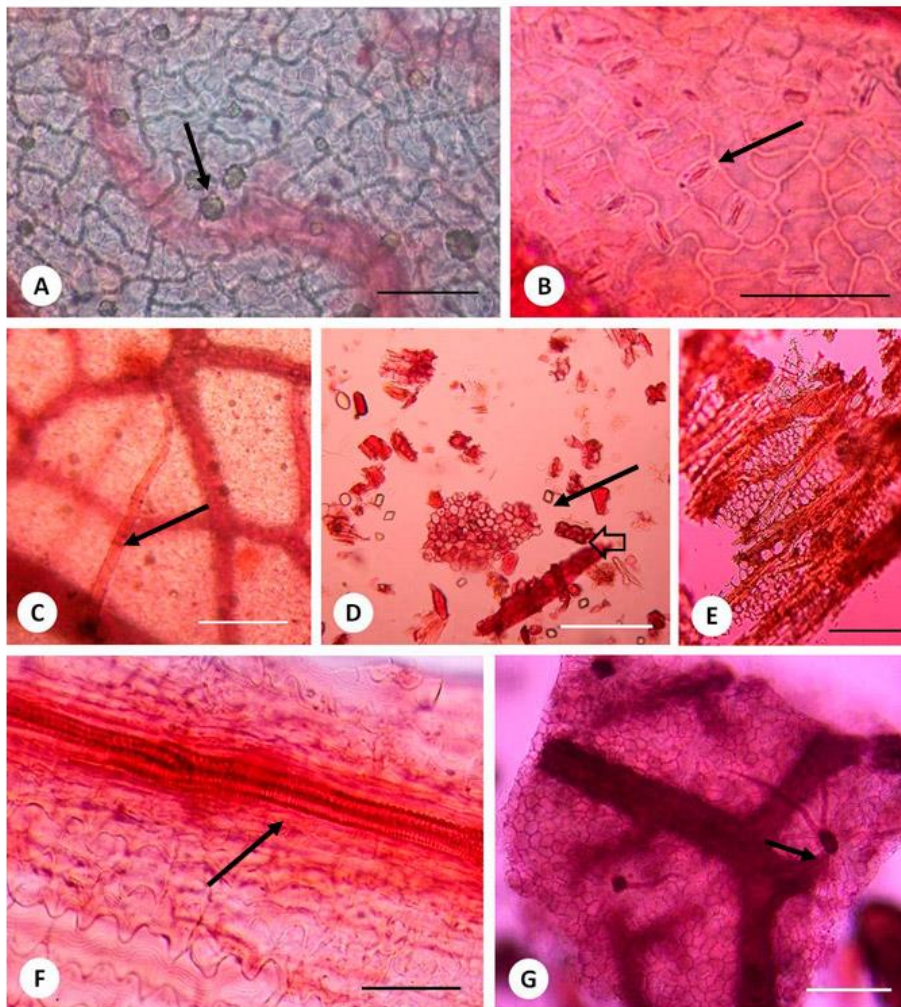


Oliveira, Akisue e Akisue (1991) descreveram a anatomia da casca de *Rhamnus purshiana* D.C. (cáscara-sagrada) e *R. frangula* L. (Rhamnaceae), popularmente conhecido como “amieiro-preto”. Alguns aspectos anatômicos bem semelhantes puderam ser observados entre essas espécies e a espécie estudada, tais como a presença de uma bainha cristalífera, a presença de drusas de oxalato de cálcio no floema e os raios parenquimáticos (medulares) estreitos. Entretanto, em *R. frangula*, ocorrem caracteres bem distintos, como a presença de um súber bem mais espesso e de uma região maciça de colênquima formada por células poliédricas com numerosos cristais de oxalato de cálcio e glândulas mucilaginosas, alongadas no sentido transversal. Dessa forma, pode-se considerar que os caracteres anatômicos da casca podem até servir para auxiliar na diferenciação de espécies, de um mesmo gênero, dentro da família Rhamnaceae. A presença maciça de cristais também merece destaque, como caráter marcante, incluindo a relação existente entre a presença de cristais e a formação de esclereídes, conhecida desde a década de 1930. Milanez (1932) estabeleceu uma correlação entre a presença desses cristais e o espessamento das paredes celulares e, ainda, sugeriu que os cristais sejam responsáveis pela formação de esclereídes em algumas famílias de dicotiledôneas, fato também visto na espécie estudada.

A análise microscópica dos materiais clarificados e macerados (**MATERIAIS 2 e 4**) (**FIGURAS 4D – 4G**), revelou a presença de fragmentos que possuíam os caracteres típicos da espécie. Contudo, além dos fragmentos de floema e das demais regiões da casca, foram encontrados no material 2, fragmentos contendo elementos de vaso espiralado (**FIGURA 4F**), além de outros fragmentos foliares contendo células de paredes retas à levemente sinuosas, com estômatos anomocíticos e tricomas tectores estrelados (**FIGURA 4G**) que, por vezes, se assemelham ao padrão anatômico compatível com a epiderme foliar de *Peumus boldus*. Por transparência, foi possível, inclusive, ver as células parenquimáticas globosas, semelhantes à idioblastos oleíferos. Esse padrão anatômico, encontrado nesses fragmentos, difere muito dos caracteres encontrados na epiderme foliar de *Z. joazeiro*, onde a folha é glabrascente, exceto sobre nervuras (**FIGURA 4C**) e onde se encontra uma grande quantidade de drusas no parênquima lacunoso e cristais prismáticos, principalmente nas nervuras.

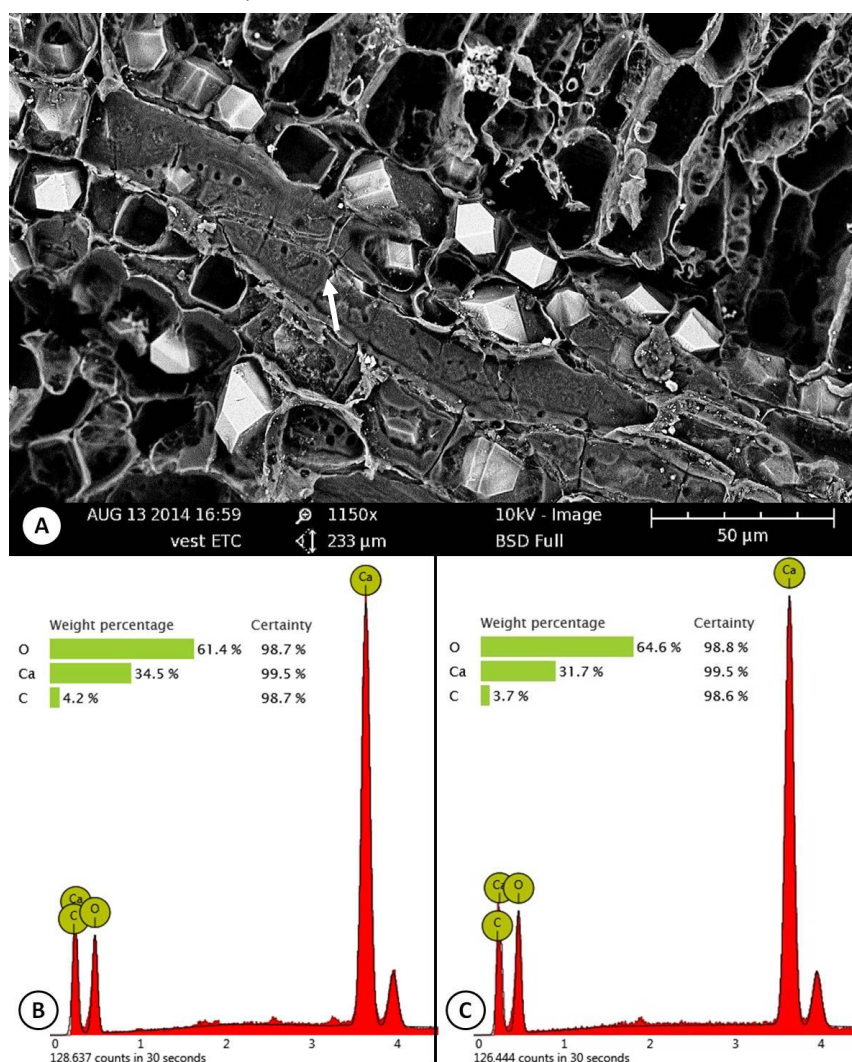
No que se referem aos métodos de maceração e clarificação, notou-se que estes foram prejudiciais aos caracteres anatômicos mais “delicados”, destruindo-os total ou parcialmente, fator prejudicial à análise que pode conduzir o analista a interpretações errôneas, caso ele desconheça a estrutura anatômica do material íntegro.

**FIGURA 4** – A: Corte paradérmico da folha de *Ziziphus joazeiro*, evidenciando a presença de drusas no mesofilo (seta), vistas na face adaxial. Barra = 75 µm. B: Estômatos anomocíticos (seta) presentes na face abaxial da epiderme. Barra = 75 µm. C: Tricoma tector simples (seta) na face abaxial da epiderme. Barra = 150 µm. D: Vista geral do material macerado, evidenciando a presença de cristais (seta), esclereídes (seta vazada) e células parenquimáticas. Barra = 150 µm. E: Detalhe de um fragmento do câmbio vascular no material macerado. Barra = 50 µm. F: Diferentes fragmentos foliares encontrados na amostra 2, evidenciando a presença de elementos de vaso espiralado (seta) em F (Barra = 50 µm) e tricomas estrelados (seta) em G (Barra = 150 µm).



A microanálise de raios-x (EDS) do material padrão (casca número 5) e dos demais fragmentos de cascas, excluindo-se os pulverizados, mostrou que os cristais prismáticos são compostos por oxalato de cálcio (**FIGURA 5B**), quando comparados os espectros obtidos no material estudado com cristais de oxalato de cálcio penta hidratado usado como padrão (**FIGURA 5C**). ESAU (1974) afirma que, à exceção do cristal do tipo cistólito, composto por carbonato de cálcio, todos os demais tipos de cristal são formados por oxalato de cálcio. Logo, a análise por EDS corroborou com tal informação.

**FIGURA 5** – A: Eletromicrografia de varredura evidenciando elementos de tubo crivado (seta), margeados por cristais prismáticos. Barra = 50 µm. B: Espectro de EDS do cristal prismático presente na casca de *Ziziphus joazeiro*. C: Espectro de EDS do padrão de oxalato de cálcio penta hidratado.



### Estudo fitoquímico

Na (TABELA 2), abaixo, encontra-se um panorama dos resultados obtidos nos testes de precipitação, valendo ressaltar a uniformidade dos demais resultados, principalmente no que diz respeito à presença de saponinas, fenóis e taninos e esteroides e triterpenóides, em todas as amostras. Os extratos, ao serem submetidos aos testes de precipitação revelaram que, na reação de Shinoda, o extrato 2 obteve uma leve coloração rosada, indicando a presença de flavonoides.

O extrato 5, proveniente da folha do *Z. joazeiro*, quando submetido a reação de Shinoda, não indicou presença de flavonoides, sugerindo que a amostra 2 pode ter sido contaminada por partes de outras espécies. Isso é corroborado pela análise microscópica do material 2, onde os caracteres anatômicos dos fragmentos foliares se mostram diferentes dos observados no padrão foliar de *Z. joazeiro*.

Devido à grande concentração de clorofila nas cascas usadas como padrão (5), os precipitados encontrados nos dois testes para alcaloides apresentaram uma coloração esverdeada, fator que inviabilizou a utilização dos mesmos. Entretanto a cromatografia em camada fina esclareceu a presença de tais metabólitos.

**TABELA 2** - Resultados dos testes fitoquímicos. (+) = presença; (-) = ausência; (\*) = resultado indeterminado.

Metabólitos	Extratos				
	1	2	3	4	5
Saponinas	+	+	+	+	+
Flavonoides (Shinoda)	-	+	-	-	-
Fenóis e taninos	+	+	+	+	+
Alcaloides (Bouchardat)	+	+	+	+	*
Alcaloides (Mayer)	+	+	+	+	*
Esteroides e triterpenoides	+	+	+	+	+

Na cromatografia em camada delgada, todos os extratos apresentaram um perfil cromatográfico próximo ao do padrão (5), o que indica autenticidade em todas as amostras, conforme observado na (TABELA 3). Entretanto, nota-se uma variação na intensidade ou presença de bandas (vide TABELA 3). Essa variação nas taxas de determinados metabólitos, é influenciada pela idade do espécime e por fatores climáticos e geográficos como sazonalidade, disponibilidade hídrica e nutrição do solo (GOBBO-NETO e LOPES, 2006). Apesar dessas discrepâncias, todas as amostras apresentaram em sua composição os triterpenos: ácido betulínico, ácido oleanólico e lupeol; representados pelas manchas violáceas mais intensas, nessa ordem de eluição, além das saponinas, representadas pelas manchas de colorações marrom e cinza, marcadores da espécie descritos por Kato (1996), e também detectados neste estudo, em condições específicas de gradiente de polaridade e reveladores.

**TABELA 3** - Resultados da cromatografia em camada delgada. (++++) = Muito intenso, (+++) = Intenso, (++) = Moderado, (+) = fraco, (-) = Ausente e (\*) = Indeterminado.

Placa	Metabólitos	Extratos				
		1	2	3	4	5
1	Ácido oleanólico	++++	++++	+++	++	+
	Ácido betulínico	+++	+++	+	+	+
	Lupeol	+	+	-	-	-
2	Ácido oleanólico	++++	++++	++	+	+
	Ácido betulínico	++	+++	-	-	-
	Lupeol	++	+	-	-	-
3	Flavonoides	+++	++++	++	+	+++
4	Ácido oleanólico	++++	++++	+++	++	+
	Ácido betulínico	+++	+++	+	+	-
	Lupeol	+	+	-	-	-
5	Ácido oleanólico	++++	++++	++	+	+
	Ácido betulínico	++	+++	+	+	+
	Lupeol	++	+	+	-	-
6	Saponinas	++++	+++	++++	++	+
7	Óleos essenciais	*	*	*	*	*
8	Alcaloides	++	++	++	++	++

Para a detecção de óleos essenciais, notou-se que o gradiente de eluição empregado foi ineficiente, dada a complexidade das matrizes analisadas, a polaridade dos marcadores fitoquímicos e a coloração dos *spots* em comparação com as placas 4 e 5, também reveladas com vanilina sulfúrica. Levando em consideração esses fatores, o resultado dessa análise foi considerado como indeterminado (**TABELA 3**).

Já o ensaio cromatográfico para alcaloides revelou a presença dessa classe em todas as amostras. Entretanto ao comparar a corrida dos *spots* referentes aos extratos e o padrão de cafeína, nota-se o avanço do padrão e a retenção dos demais alcaloides em suas respectivas origens. Além de Kato (1996), Tschesche e colaboradores (1981) já haviam evidenciado a presença de alcaloides, como por exemplo, a anfibina-D, em Rhamnaceae e, especificamente, em *Z. joazeiro*, ao passo que outros metabólitos dessa classe, como a cafeína, ocorrem em quantidades reduzidas, de maneira que não são detectados pela metodologia empregada.

Foi observada uma variação nos resultados obtidos para os ácidos oleanólico e betulínico e o lupeol (**TABELA 3**). Essa variação pode ocorrer graças ao estresse causado pela temperatura ambiente, que influencia diretamente o metabolismo (SUZUKI e MITTLER, 2006) e inviabiliza a utilização destes metabólitos como marcadores para o controle de qualidade de amostras de *Ziziphus joazeiro*.

Apesar da grande semelhança estrutural entre os marcadores supracitados e a jujubogenina, saponina isolada na casca de *Z. joazeiro* (TRIGUEIRO, 1981 *apud* HIGUSHI, 1984), nota-se que esta está ligada à um glicosídeo que a estabiliza e, conseqüentemente, altera a sua polaridade frente as fases estacionária e móvel. Esse fator explicaria a retenção da saponina à origem da corrida cromatográfica em todas as amostras nas placas 1, 2, 4, 5 e 7, enquanto os demais marcadores destacam-se em posições diferentes nas cromatoplas. Entretanto, ao ser submetida à um gradiente de eluição com caráter mais polar, essas saponinas são carregadas e separadas de maneira satisfatória.

Na placa 3 nota-se a presença de flavonoides, já esperados, em todas as amostras e no padrão, visto que os testes preliminares indicaram a presença de compostos fenólicos. Entretanto, ao observar as marcas fluorescentes reveladas por NP/PEG sob luz UV 254nm, nota-se que, no extrato 2, existe a presença de outros flavonoides além daqueles encontrados nos demais extratos, confirmando o resultado positivo na reação de Shinoda.

## Conclusões

Considerando-se todos os resultados obtidos, foi possível concluir que a análise anatômica revelou a presença de caracteres que servirão para uma diagnose mais segura e precisa, tais como: presença de uma bainha cristalífera, margeando os elementos de tubo crivado; a presença maciça de cristais prismáticos e drusos de oxalato de cálcio, presentes desde o câmbio vascular e nas outras regiões no floema, estando presentes, inclusive, no interior das esclereides; os raios parenquimáticos estreitos, por vezes alargados pelos grandes idioblastos, também presentes no floema não colapsado, além da presença de ritidoma. Na morfologia externa, a presença do ritidoma na face externa, contrastando com o tom amarelo (forte) da face interna auxiliam na identificação macroscópica. Pode-se contar ainda com os caracteres morfológicos e macroscópicos da folha, principalmente o formato ovalado a elíptico, com base cordada a obtusa, ápice curto-acuminado, margem finamente serrada, com três nervuras bem visíveis na face inferior, partindo da base da lâmina foliar.



As amostras, de modo geral, são autênticas. Entretanto, uma das amostras adquiridas no comércio formal apresentou inconformidades, tanto nos parâmetros fitoquímicos quanto nos aspectos microscópicos, sendo estes: a presença de elementos foliares pertencentes à outra espécie, resultado positivo para flavonoides na reação de Shinoda, que não são característicos desta espécie. Em contrapartida, é preciso que as amostras revelem resultado positivo nos testes com saponinas (principal marcador), fenóis e taninos, esteroides e triterpenóides que também são típicos.

É de fundamental importância, em um trabalho com viés farmacognóstico, o cruzamento dos dados obtidos nas análises químicas e microscópicas, visto que estes se complementam, esclarecendo melhor, tantos os parâmetros relativos a autenticidade, quanto a origem da contaminação ou adulteração.

## Agradecimentos

Ao IFRJ, pelo financiamento do trabalho, através do edital PROCIÊNCIA e pela bolsa de iniciação científica (PIBIC) do primeiro autor.

## Referências

- ALBUQUERQUE, U. P., MUNIZ-DE-MEDEIROS, P., ALMEIDA, A. L., MONTEIRO, J. M., LINS-NETO, E. M. F., GOMES-DE-MELO, J., SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. Elsevier. *Journal of Ethnopharmacology*, v.114, p.325–354. USA. 2007. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
- BARBOSA, W. L. R., QUINARD, E., TAVARES, I. C. C., PINTO, L. N., OLIVEIRA, F. Q., OLIVEIRA, R. M. *Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais*. Edição Revisada. Centro de Ciências da Saúde – UFPA, Belém. 2001.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., ICHASO, C. L. F., COSTA, C. G., GUIMARÃES, E. F., LIMA, H. C. *Sistemática de angiospermas do Brasil*, v.2. Editora UFV: Viçosa, 1991. ISBN 8572691278.
- BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. IPJBRJ. *Rodriguésia*, v. 66, n.4, p.1085-1113. Rio de Janeiro. 2015. ISSN 0370-65830. [[CrossRef](#)].
- BRASIL, ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. V.1. Brasília, 524 p. Brasília, DF. 2010.
- BRASIL, ANVISA. *RDC Nº 26*, de 13 de Maio de 2014. 2014. Brasília, DF. [[Link](#)].
- BRASIL, ANVISA. Consolidado de Normas da COFID (Versão V). Brasília, DF. 2015. [[Link](#)].
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Microkosmos*, v. 61, n. 8, p. 255. Berlin. 1972. ISSN: 0026-3680.
- CARVALHO, P. E. R. *Ziziphus joazeiro*. Embrapa Florestas. *Circular Técnica*, n. 139. 8p. 2007.
- CRUZ, M. C., SANTOS, P. O., BARBOSA, A. M. JR., MÉLO, D. R., ALVIANO, C. S., ANTONIOLLI, A. R., ALVIANO, D. S., TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular

treatment of mycoses. Elsevier. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p.409–412. 2007. ISSN 0378-8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

ESAU, K. *Anatomia das plantas com sementes*. Edgard Blucher: São Paulo, SP. ISBN 8521201028. 1974.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. SBQ. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381. São Paulo. 2007. ISSN 1678-7064. [[CrossRef](#)]

GONÇALVES, E; LORENZI, H. *Morfologia Vegetal – Organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares*. 2ª ed. Plantarum: Nova Odessa. 2011. ISBN 9788586714382.

HIGUSHI, R., KUBOTA, S., KOMORI, T., KAWASAKI, T., PANDEY, V. B., SINGH, J. P., SHAH, A. H. Triterpenoid saponins from the bark of *Ziziphus joazeiro*. Elsevier. *Phytochemistry*, Oxford. v.23, n.2, p.2597-2600, USA. 1984. ISSN 0031-9422. [[CrossRef](#)].

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York, Mc Graw Hill Book Co. Inc., 523p. 1940.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 3ª ed. Editora Nacional: São Paulo, ISBN 8504002314. 1976.

KATO, E. T. M. Estudo farmacognóstico da droga e do extrato fluido da raspa-de-juá – *Ziziphus joazeiro* Martius. *LECTA-USF*, v. 14, n.1, p.09-27. 1996.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal*. EDUR: Seropédica, 1997. ISBN 8585720115.

LEAL; L.; TELLIS, C. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: Uma breve revisão. Farmanguinhos/Fiocruz. *Revista Fitos*, v.9, n.4, p.261-264. Rio de Janeiro. 2015. [[CrossRef](#)].

LIMA, R. B. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. IPJBRJ. *Rodriguésia*, v.57, n.2, p.247-249. Rio de Janeiro. 2006. ISSN 0370-65830.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M. Rhamnaceae. In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. *Instituto de Botânica*, v.4, p. 331-341. São Paulo. 2005.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M. Synonymies and typification of the Rhamnaceae of Brazil. SciELO. *Acta Botanica Brasilica*, v.28, n.3, p.376-381. Feira de Santana. 2014. ISSN 0102-3306. [[CrossRef](#)].

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. 2ª ed. Plantarum: Nova Odessa, SP. 2008. ISBN 9788586714283.

MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Ed. UFC: Fortaleza, CE. ISBN 9788572820264. 1997.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons*. V. I. Oxford Univ. Press: Oxford. 1950.

MILANEZ, F. R. Ação modificadora do oxalato de cálcio sobre as estruturas celulares. CPDOC-FGV. *Revista Florestal*, v.2, n.3, p.5-12. Rio de Janeiro. 1932.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; DIÓGENES, F. É. P.; MEDEIROS-FILHO, S. Atividade alelopática de extratos de diferentes partes de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. – Rhamnaceae). *SciELO. Acta Botanica Brasilica*, v.26, n.3, p.685-690. 2012. ISSN 0102-3306. [[CrossRef](#)].

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia*. Ed. Atheneu: São Paulo, SP. 1991. ISBN 8573790660.

RICHTER, H. G.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C.; ALVES, E. S.; LUCHI, A. E.; COSTA, C. G. Padronização de critérios para a descrição anatômica da casca: lista de características e glossário de termos. *Instituto Florestal*, n. 16, p.1-25. 1996.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II*. 2ª ed. Plantarum: Nova Odessa, SP. ISBN 8586714216. 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H. R. N., PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *SciELO. Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v.20, n.3. p. 435-440. Curitiba. 2010. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].

SUZUKI, N., MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Wiley. Physiologia Plantarum*, v. 126. p.45- 51. USA. 2006. ISSN 1399-3054. [[CrossRef](#)].

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2013. ISBN 9788536327952.

TSCHESCHE, R.; SHAH, A.H.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; RADLOFF, M.; ECKHARDT, G. Alkaloids of Rhamnaceae. Part 33. *Pharmazie*, v. 36, n.7, p. 511. USA. 1981. ISSN 0031-7144.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant and drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2ª ed. Springer: Berlin. 1996. ISBN 3540586768. [[CrossRef](#)]

---

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Histórico do artigo:** Submissão: 17/05/2016 | Aceite: 29/11/2017 | Publicação: 23/05/2017

**Como citar este artigo:** NASCIMENTO, Alan M.; TORRES, José C.; MARQUES, Carlos A. Caracterização morfo-anatômica e testes fitoquímicos em amostras comerciais de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). *Revista Fitos*. v.10,n.4. p. 417-432. Rio de Janeiro. 2016. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/343>>. Acesso em: 11 maio 2017.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

---