

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Averrhoa carambola*  
MONITORADO POR BIOENSAIOS SIMPLES

Trabalho de conclusão de curso –  
Bacharelado em Química, referente  
à disciplina QMC 5510 – Estágio  
Supervisionado.

Aluna: Fernanda Cristina Silva Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente

Florianópolis, novembro de 2004.

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Averrhoa carambola*  
MONITORADO POR BIOENSAIOS SIMPLES**

Trabalho de conclusão de curso –  
Bacharelado em Química, referente à  
disciplina QMC 5510 – Estágio  
Supervisionado.

---

Fernanda Ferreira

Aluna

---

Inês Maria Costa Brighente

Orientadora

## DEDICATORIA

“Ainda não se levantaram as barreiras que digam ao gênio: daqui não passarás.” Beethoven, compositor alemão (1770 – 1827)

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio desde o início para a concretização deste sonho.

## AGRADECIMENTOS

“Há mais coisas a procurar nesse pequeno coração  
faminto do que em todas as estrelas do céu.”

Thomas Hardy, poeta inglês (1840 – 1928)

À Professora Inês e ao professor Moacir pela oportunidade, auxílio e apoio que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Elis, Karen, Kerstin e Ledi, que foram muito mais do que amigas e me ajudaram em todos os momentos; ao Cesar que foi muito importante para mim durante grande parte do curso e aos grandes amigos Maikon e Silvia.

Aos amigos do laboratório: Cristian, Heros, Zeca, Gaucho, Grande, Verdi, Bia, Fabiana M., Fabiana A. e Micheli; que contribuíram para que este trabalho fosse realizado de maneira muito agradável.

Aos meus tios, primos e ao Gabriel que foram fundamentais me amparando e fazendo com que eu tivesse momentos inesquecíveis.

A toda minha família, e em especial aos meus pais e irmãs que tanto amo e que mesmo à distância foram imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

E a todos os colegas e amigos que fiz durante esses quatro anos e que de um jeito ou de outro me ajudaram a chegar até aqui.

## Lista de Abreviaturas

DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
TAS	Teste de Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>
DL <sub>50</sub>	Concentração necessária para provocar óbito em 50% dos organismos
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para provocar 50% de atividade antioxidante
Tween 80	Polissorbato
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de Etila
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
IV	Espectroscopia no Infravermelho
UV	Espectroscopia no Ultravioleta
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
PF	Ponto de fusão
EBH	Extrato Bruto Hidroalcoólico
FH	Fração Hexânica
FAe	Fração Acetato de Etila
FB	Fração n-Butanólica
FAq	Filtrado Aquoso
R	Resina
NG	Não Observou-se Germinação
NI	Não Identificado
MM	Massa Molar

## Lista de Figuras e Tabelas

### FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do DPPH	<b>13</b>
<b>Figura 2:</b> Flores, frutos e folhas de <i>A. carambola</i> .	<b>14</b>
<b>Figura 3:</b> Fluxograma representando a separação do Extrato Bruto em frações.	<b>20</b>
<b>Figura 4:</b> Obtenção da concentração necessária para provocar 50% da atividade antioxidante para o Extrato Bruto (EBH).	<b>22</b>
<b>Figura 5:</b> Obtenção da dose letal 50% para a fração hexânica (FH), frente ao teste de toxicidade com <i>A. salina</i> .	<b>23</b>
<b>Figura 6:</b> Estrutura do $\beta$ -sitosterol.	<b>32</b>
<b>Figura 7:</b> Estrutura Básica de um Flavonóide (Estrutura 1), de uma Flavona (Estrutura 2) e da Apigenina (Estrutura 3).	<b>33</b>
<b>Figura 8:</b> Espectro de UV da fração 4-7 sem (linha vermelha) e com adição de acetato de sódio (linha preta) da Fração acetato de etila de <i>A. carambola</i> .	<b>33</b>

### TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Bioensaio com <i>Artemia salina</i> aplicado ao extrato, frações e sub-frações obtidas a partir da Fração hexânica de <i>A. carambola</i> .	<b>25</b>
<b>Tabela 2:</b> Atividade antioxidante do extrato e frações de <i>A. carambola</i> .	<b>26</b>
<b>Tabela 3:</b> Efeito das frações de <i>A. carambola</i> sobre a germinação de sementes, crescimento de radícula e hipocótilo.	<b>27</b>
<b>Tabela 4:</b> Constituintes da Fração hexânica de <i>A. carambola</i> (Coluna DB1, 60-290 °C a 10 °C / min.).	<b>29</b>
<b>Tabela 5:</b> Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (200 MHz) para $\beta$ -sitosterol (dados experimentais e da literatura) em $\text{CDCl}_3$ .	<b>31</b>
<b>Tabela 6:</b> RMN de $^{13}\text{C}$ para a fração 4-7 em MeOD comparados com Apigenina – 6 – C – $\beta$ – D – Glucopiranosídeo, Isofurcatin (Apigenina – 6 – C – $\alpha$ – L Rhamnopiranosídeo) e Apigenina – 8 – C – $\beta$ – D Glucopiranosídeo.	<b>34</b>

## SUMÁRIO

1. RESUMO	8
2. INTRODUÇÃO	9
2.1. Justificativa	9
2.2. Revisão Bibliográfica	10
2.2.1. Testes Biológicos	10
2.2.1.1. Teste Alelopático	11
2.2.1.2. Teste Antioxidante	12
2.2.1.3. Teste de Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> (TAS)	13
2.2.2. <i>Averrhoa carambola</i>	14
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivos Gerais	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Substâncias utilizadas	18
4.2. Equipamentos	18
4.3. Fracionamento do extrato de <i>Averrhoa carambola</i>	19
4.4. Ensaio de germinação de sementes	21
4.5. Ensaio antioxidantes com DPPH	22
4.6. Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Análise do Bioensaio utilizando <i>Artemia salina</i>	24
5.2. Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante	25
5.3. Análise do Bioensaio para Atividade Alelopática	26
5.4. Estudo Fitoquímico do Extrato de <i>Averrhoa carambola</i>	28
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	41

## 1. Resumo

*Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae), conhecida popularmente como caramboleira, tem seus frutos e folhas usadas na medicina popular.

O chá das folhas é indicado contra diabetes. Alguns estudos fitoquímicos foram desenvolvidos com esta planta, mas raros são os estudos biológicos. Portanto, aplicou-se bioensaios para detectar atividade antioxidante, alelopática e citotóxica ao extrato bruto e frações das folhas de *A. carambola*.

O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas foi seqüencialmente extraído com solventes de polaridade crescente, originando as frações hexânica (FH), acetato de etila (FAe), n-butanólica (FB) e filtrado aquoso (FAq). A atividade antioxidante foi avaliada através da mistura de DPPH 0,004% a soluções dos extratos em diferentes concentrações com posterior leitura em espectrofotômetro a 517 nm. O EBH e FAe apresentaram maior atividade, que pode ser explicada pela presença de substâncias fenólicas, as quais possuem conhecida ação seqüestradora de radicais livres. Avaliou-se a atividade citotóxica utilizando o teste de toxicidade frente a *Artemia salina*. Apreciável letalidade a *A. salina* foi observado apenas com o EBH e FH. A atividade alelopática foi avaliada a partir dos testes de germinação de sementes de *L.sativa* em placas de Petri, na presença de diferentes concentrações dos extratos, comparadas a uma testemunha (água destilada). Em todas as frações, nas concentrações de 0,31 e 0,62%, a inibição de germinação de sementes foi pouco expressiva, porém na concentração de 5%, na FB a inibição de germinação foi de 90%, enquanto que na FAe foi de 100%. Isto indica que estas frações podem conter compostos com potencial ação herbicida. Análise fitoquímica prévia nas FH e FAe mostrou que a FH é composta de ácidos graxos, enquanto que a FAe é composta principalmente por flavonóides.

Considerando que a FH possui atividade citotóxica, e que na FAe foi encontrada expressiva atividade antioxidante e alelopática, pretende-se fazer um estudo fitoquímico mais aprofundado no sentido de isolar os compostos responsáveis por estes efeitos.

**Palavras-chaves:** *A. carambola*, antioxidantes, citotóxico, alelopático.

## 2. Introdução

### 2.1. Justificativa

O desmatamento crescente e desordenado está destruindo uma das maiores fontes de moléculas ativas, a flora tropical. Este acontecimento aliado a grande biodiversidade presente na Flora Catarinense e ao fato de que parte da população trata-se quase que somente com a administração de preparações a partir de plantas, faz com que uma pesquisa fitoquímica direcionada ao isolamento de moléculas biologicamente ativas seja incentivada.

A pesquisa fitoquímica aliada ao biomonitoramento de extratos vegetais se mostra viável e relativamente simples e esta prática é importante, não só para a conservação da flora local, mas também para a indústria na descoberta de novos protótipos para a síntese de compostos com atividade biológica mais potente. Porém, o biomonitoramento dos extratos de plantas só é possível, se o ensaio empregado for rápido, barato, reprodutível e viável em um laboratório de química. Três ensaios que se enquadram nesse perfil são os ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina*, o teste antioxidante usando DPPH e o teste alelopático.

Uma triagem (“screening”) que tem se mostrado eficiente em nosso laboratório é aquela que utiliza toxicidade frente a *Artemia salina*, um microcrustáceo sensível a diversas estruturas químicas. Este bioensaio pode detectar um amplo espectro de atividade e ainda apresenta boa correlação com teste antitumorais. Um outro bioensaio empregado rotineiramente em nosso laboratório, é o teste antioxidante, utilizado para determinar a capacidade de capturar radicais livres de uma amostra vegetal e envolve a medida espectrofotométrica do desaparecimento do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidazil (DPPH), quando este capta um radical hidrogênio de um substrato, geralmente fenólico. Finalmente, usamos também na triagem de extratos vegetais, o teste alelopático, que detecta a presença de substâncias que tem o poder de estimular ou inibir o desenvolvimento de outras plantas (aleloquímicos). Este teste é avaliado através de ensaios de inibição de germinação de sementes e de desenvolvimento da radícula e do hipocótilo.

Sendo assim, o fracionamento do Extrato Bruto de *Averrhoa carambola* foi monitorado através de bioensaios antioxidante, alelopático e teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, na procura de compostos com atividades antioxidante, herbicida e citotóxica.

## **2.2. Revisão Bibliográfica**

### **2.2.1. Testes Biológicos**

As plantas são uma grande fonte de moléculas biologicamente ativas. Evidentemente, quando um pesquisador começa a estudar uma planta com o objetivo de isolar os princípios ativos, não poderá identificar todos os constituintes químicos, que são muito numerosos. Uma planta é uma verdadeira usina química que pode produzir milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica (Hamburger & Hostettmann, 1991). Portanto, é necessário dispor de testes biológicos relativamente simples para localizar a atividade procurada no extrato da planta e nas numerosas frações obtidas nas diferentes etapas de purificação e separação. Estes testes devem ser, também, específicos para um determinado alvo biológico.

A escolha das plantas pode ser baseada no fato destas serem utilizadas na medicina popular. Logo, o estudo destas plantas pode confirmar a medicina folclórica e auxiliar a taxonomia vegetal.

O isolamento de moléculas bioativas pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos. Essas moléculas ainda podem servir de estrutura base para o desenvolvimento de fármacos semi-sintéticos e sintéticos, e estes últimos podem ser mais seletivos e/ou ativos que a molécula original. A orientação dessa síntese é feita através de estudo baseados na relação estrutura e atividade (Franke, 1984; Kubingi, 1993; Cordel, 1995).

### **2.2.1.1. Teste Alelopático**

A alelopatia, termo proposto por Molish, em 1937, refere-se a interações bioquímicas, tanto inibitórias como estimuladoras, entre todos os tipos de plantas (Almeida, 1988; Rice, 1984). Os metabólicos secundários ou produtos naturais envolvidos em alelopatia são denominados aleloquímicos. Muitos metabólicos secundários que são produzidos pelas plantas são prejudiciais a muitas outras espécies de plantas e isto ajuda a reduzir a competição em seus habitats.

Alguns pesquisadores têm mostrado que substâncias químicas liberadas pelas plantas podem causar efeitos indiretos, como inibir o processo de nitrificação e fixação de nitrogênio, ou ainda, alterar uma série de processos fisiológicos (Putnam & Weston, 1986; Einhellig et al., 1985; Putnam & Tang, 1986). As interferências alelopáticas raramente são provocadas por uma única substância, sendo mais comum uma ação aditiva e sinérgica entre várias substâncias (Almeida, 1986).

A atividade alelopática desempenha um papel relevante no meio ambiente. Muitas plantas produzem substâncias com ação fitotóxica, e isto produz grandes perspectivas na substituição ao uso dos herbicidas sintéticos, mais nocivos ao meio ambiente.

O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição ou algumas vezes a estimulação de germinação de sementes de espécies silvestres ou de culturas, visto que são simples, rápidos e requerem pequenos volumes de solução. Para sementes de culturas, as quais são tratadas para germinar 100%, avalia-se somente a inibição, enquanto que a estimulação causada por muitos aleloquímicos não é detectada. Tal resposta é na maioria das vezes detectada em sementes silvestres (Leather & Einhellig, 1986). Após a germinação das sementes, avalia-se também o desenvolvimento da plântula através da medida do alongamento da radícula e do hipocótilo, que geralmente é mais sensível que os ensaios de germinação.

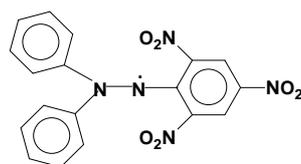
### 2.2.1.2. Teste Antioxidante

O alto consumo de produtos naturais vegetais tem sido associado à baixa incidência de doenças degenerativas, incluindo câncer, doenças do coração, inflamações, artrites, deficiência do sistema imunológico, disfunção muscular e cataratas (Ames, 1983; Ames et al., 1993; Feskanich et al., 2000; Gordon, 1996; Haegele et al., 2000; Halliwell, 1996; Michels et al., 2000).

A literatura tem mostrado que inúmeros metabólitos secundários de plantas, tais como flavonóides, taninos ou mesmo extratos vegetais podem ser utilizados como captadores ou inibidores de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (ERMO) tal como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e radicais hidroxil ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) são freqüentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou de fatores exógenos (Cerutti, 1991). Evidências indicam que radicais livres causam danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Portanto, antioxidantes que podem inibir ou retardar a oxidação de um substrato oxidável na cadeia de reação, seria muito importante na prevenção de certas doenças (Ames et al., 1993; Aruoma, 1998; Jacob & Burri, 1996; Steinberg, 1991; Maxwell & Lip, 1997; Pratico & Delantiy, 2000; Wang et al., 1996).

Os radicais livres são de grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos, levando substâncias de origem natural, com ação antioxidante, a receber atenção especial (Potterat, 1997).

Muitos métodos analíticos foram propostos para determinar e avaliar a atividade antioxidante total de extratos biológicos (Cao et al., 1996; Kantha et al., 1996; Futura et al., 1997). Um método utilizado para determinar a capacidade seqüestrante de radicais livres de uma amostra vegetal envolve a medida espectrofotométrica do cromóforo 1,1-difenil-2-picrilhidazil (DPPH), figura 1 (Bouchet et al., 1998; Cavin et al., 1998).



**Figura 1:** Estrutura do DPPH

Este teste tem a vantagem de medir a capacidade antioxidante em um tempo relativamente curto comparado com outros testes (Leong & Shui, 2002). O efeito da ação oxidante do radical DPPH é devido a sua habilidade de captar hidrogênio (Baumann et al., 1979).

### 2.2.1.3. Teste de Toxicidade frente a *Artemia salina* (TAS)

Este bioensaio detecta um amplo espectro de atividade biológica em diferentes estruturas químicas, podendo ser usado como um substituto barato para os testes de citotoxicidade, que utilizam linhagens de células tumorais (McLaughlin & Hostettmann, 1991; McLaughlin et al., 1991).

Devido a grande sensibilidade da *A. salina*, este bioensaio está estreitamente relacionado com a atividade biológica em geral, pois todo o composto que possui alguma atividade, também apresenta certa toxicidade (Sam et al., 1993; Meyer et al., 1982). Este teste baseia-se na premissa de que compostos bioativos são tóxicos em altas doses e a letalidade de um organismo simples deve ser usada para monitorar o fracionamento de extratos ativos (McLaughlin & Hostettmann, 1991). Através da obtenção experimental da DL<sub>50</sub> (concentração de extrato necessária para provocar óbito em 50% dos organismos).

*Artemia salina* Leach (1812) é um microcrustáceo marinho comumente conhecido por larva de camarão ou nauplius e pertence à subdasse Branchiopoda, ordem Anostraca (Sam, 1993). Os ovos deste microcrustáceo podem ser facilmente adquiridos em lojas de aquários. As larvas desenvolvem-se facilmente, não exigindo condições estéreis, o que torna a execução deste ensaio viável em um laboratório clássico de química (Hamburger & Hostettmann, 1991).

### 2.2.2. *Averrhoa carambola*

Classificação Botânica:

- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida (Dicotiledênea)
- Subclasse: Rosidae
- Ordem: Geraniales
- Família: Oxalidaceae (*Averrhoaceae* Hutch ~ *Geraniaceae*)
- Gênero: *Averrhoa*
- Espécie: *Averrhoa carambola*

A espécie *Averrhoa carambola* L., pertence à família Oxalidaceae e é conhecida popularmente como carambola ou star fruit. As oxalidaceae caracterizam-se como ervas, arbustos ou raramente árvores compreendendo de 7 a 8 gêneros e cerca de 800 espécies. A *A. carambola* é uma árvore perenifólia, de 4-6 m, de copa densas arredondada e baixas, originárias possivelmente da Índia e Malásia. Folhas compostas pinadas, com 5-10 folíolos cartáceos, quase glabros, de 4-6 cm de comprimento. Flores pequenas, de cor purpúrea ou róseas dispostas em racemos axilares curtos. Os frutos são bagas alongadas formadas por cinco gomos salientes, de cor amarelada ou alaranjada, contendo polpa carnosa aromática e agri-doce (Corrêa, 1984, Panizza, 1998). Vide Figura 2.



**Figura 2:** Flores, frutos e folhas de *A. carambola*.

A caramboleira foi introduzida no Brasil, juntamente com o limão caiano (*Averrhoa bilimbi L.*) e outras plantas de origem asiática (Granato, 1919).

As folhas e frutos desta espécie são empregados na medicina caseira em várias regiões do país, sendo considerados: excitante do apetite, anti-disentérica, anti-escorbútica e febrífuga. Recomenda-se o chá de suas folhas para pessoas diabéticas. O seu uso externo, na forma de cataplasma é recomendado para afecções da pele (erupções, pruridos intensos, eczemas e vermelhidão) e contra picadas de inseto (Corrêa, 1926-1975).

Recentemente foi reportado que sucos de carambola causam severos efeitos em pacientes com doenças renais crônicas. Os sintomas variam e incluem insônia, soluços, agitação, fraqueza nos músculos, confusão mental, vários graus de distúrbios da consciência e parada respiratória. A intoxicação pelo fruto é negligenciável em pessoas normais mas torna-se séria em pacientes com doenças renais crônicas. As várias subespécies de carambola contém diferentes toxinas, incluindo uma poderosa neurotoxina que suspeita-se, acumular no sangue, atravessar a barreira hematoencefálica em pacientes com doenças renais graves e eventualmente causam danos irreversíveis.(Yap et al., 2002). Contudo, alguns autores afirmam que o oxalato é o principal agente da neurotoxicidade da carambola e que este é o responsável pelo quadro neuropatológico causado pela intoxicação pelo suco de carambola (Chen et al., 2002). O tratamento para esta intoxicação geralmente é feito com hemodiálise (Neto et al., 2003).

Quimicamente, a *A. carambola* destaca-se pela presença nas folhas, de alcalóides, saponinas, taninos, glicosídeos, ácido oxálico, enxofre e ácido fórmico e, nos frutos, ácidos orgânicos e vitamina C (Panizza, 1998).

MacLeod e Ames (1990) analisaram os componentes voláteis da carambola através de cromatografia gasosa. Dos 178 componentes, cerca de 95% foram identificados e destes, 57 são ésteres e 9 lactonas, que são componentes significativos para a composição do aroma. Junto a estes compostos foram caracterizados também precursores de carotenóides.

A partir do extrato etéreo dos frutos de carambola, Lutz e Wintherhalter (1994) identificaram o álcool dihidroabscícico.

Spripanidkulchai et al. (2001) publicaram um estudo no qual realizaram uma investigação da atividade diurética de algumas plantas medicinais

Tailandesas, entre elas a *Averrhoa carambola*. Este estudo mostrou que os galhos de *A. carambola* não apresentam atividade diurética.

Damasceno e colaboradores (2002) investigaram o extrato aquoso das folhas de carambola, obtidas comercialmente através de farmácias de manipulação. Segundo os autores, este extrato não controlou a hiperglicemia, hiperfagia, polidipsia e poliúria de ratas com diabetes induzida por streptozotocina. Já a infusão das folhas secas de *A. carambola* na concentração de 2g%, mostrou um efeito redutor sobre os níveis plasmáticos de glicose (Dalla Martha, 2002).

Em estudos realizados mais recentemente Chau et al. (2004) evidenciaram através de alguns testes *in vitro*, que as frações insolúveis ricas em fibras da carambola possuem um potencial efeito hipoglicêmico, e este efeito se deve ao fato destas fibras adsorverem a glicose, retardar a difusão e adiar a liberação da glicose a partir do amido e inibir a atividade da alfa amilase. Ainda em seu trabalho, Shui e Leong (2004) mostraram que a carambola (fruto) é uma boa fonte natural de antioxidantes e pode efetivamente capturar radicais livres. O fruto é rico em vitamina C, que é um bom antioxidante, porém este composto contribui somente com uma pequena parte para a atividade antioxidante total. Estes autores concluíram que no fruto da carambola, a atividade antioxidante é atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes. Já, Luximon-Ramma et al. (2003) observaram que os frutos de carambola são ricos em compostos fenólicos totais, apresentando também elevada capacidade antioxidante, com efeito benéfico a saúde humana.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Vários são os estudos realizados com os frutos de *Averrhoa carambola*, mas poucos estão voltados para a detecção de metabólitos secundários nas folhas e galhos, assim como a aplicação de testes biológicos a esta parte do vegetal. Considerando este fato, o objetivo central deste trabalho é o desenvolvimento do estudo fitoquímico de *A. carambola* biomonitorado pelos bioensaios de atividade alelopática, atividade antioxidante usando DPPH e teste de toxicidade frente a *Artemia salina*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- i) Preparar o extrato bruto das folhas de *Averrhoa carambola*;
- ii) Particionar o extrato bruto com diferentes solventes a fim de obter as frações em quantidades expressivas de extrato para posterior estudo fitoquímico.
- iii) Aplicar os ensaios de toxicidade frente a *Artemia salina*, atividade antioxidante usando DPPH e atividade alelopática ao extrato bruto e frações.
- iv) Fracionamento das frações obtidas a partir do Extrato Bruto com a finalidade de isolar seus principais constituintes químicos.
- v) Determinação estrutural dos possíveis constituintes químicos isolados.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Substâncias utilizadas**

Os solventes utilizados, como etanol, metanol, hexano, acetato de etila foram obtidos comercialmente. Tween 80 (polioxietilensorbitano monooleato) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foram obtidos pela Aldrich. Os demais reagentes usados eram de pureza analítica e foram utilizados sem tratamento prévio.

O sal marinho e cistos de *Artemia salina* foram obtidos comercialmente na loja de aquário “Botiquário”, em Florianópolis.

As sementes de *Lactuca sativa* Var. Grand rapids, Lote 13158-LW (pureza 100,0 % e germinação 95 %) também foram obtidas comercialmente em lojas agropecuárias.

No fracionamento cromatográfico foi usada sílica gel como fase estacionária. Nas cromatografias em coluna foi usado sílica gel Carlo Erba de granulometria 0,05:0,20 mm. Para cromatografias em camada delgada analítica foram usadas cromatoplasmas de alumínio cobertas com sílica gel 60 em uma camada de 0,2 mm de espessura (Merk). Os reveladores utilizados foram soluções reagentes de anisaldeído sulfúrico, sulfato de cério dissolvido em ácido sulfúrico 65% e cloreto férrico (5%).

### **4.2. Equipamentos**

Os espectros de Infravermelho foram realizados em espectrofotômetro infravermelho, PERKIN ELMER – FT 16 PC. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em Espectrômetro UV-VIS, HITACHE 2000. Os espectros de massas foram obtidos por inserção direta (prob) em um espectrômetro SHIMADZU QP-2000 A, com ionização sob impacto de elétrons a 70 eV. Já para determinação estrutural utilizou-se RMN em Espectrômetro BURKER AC 200 MHz na Central de Análises do Departamento de Química desta Universidade.

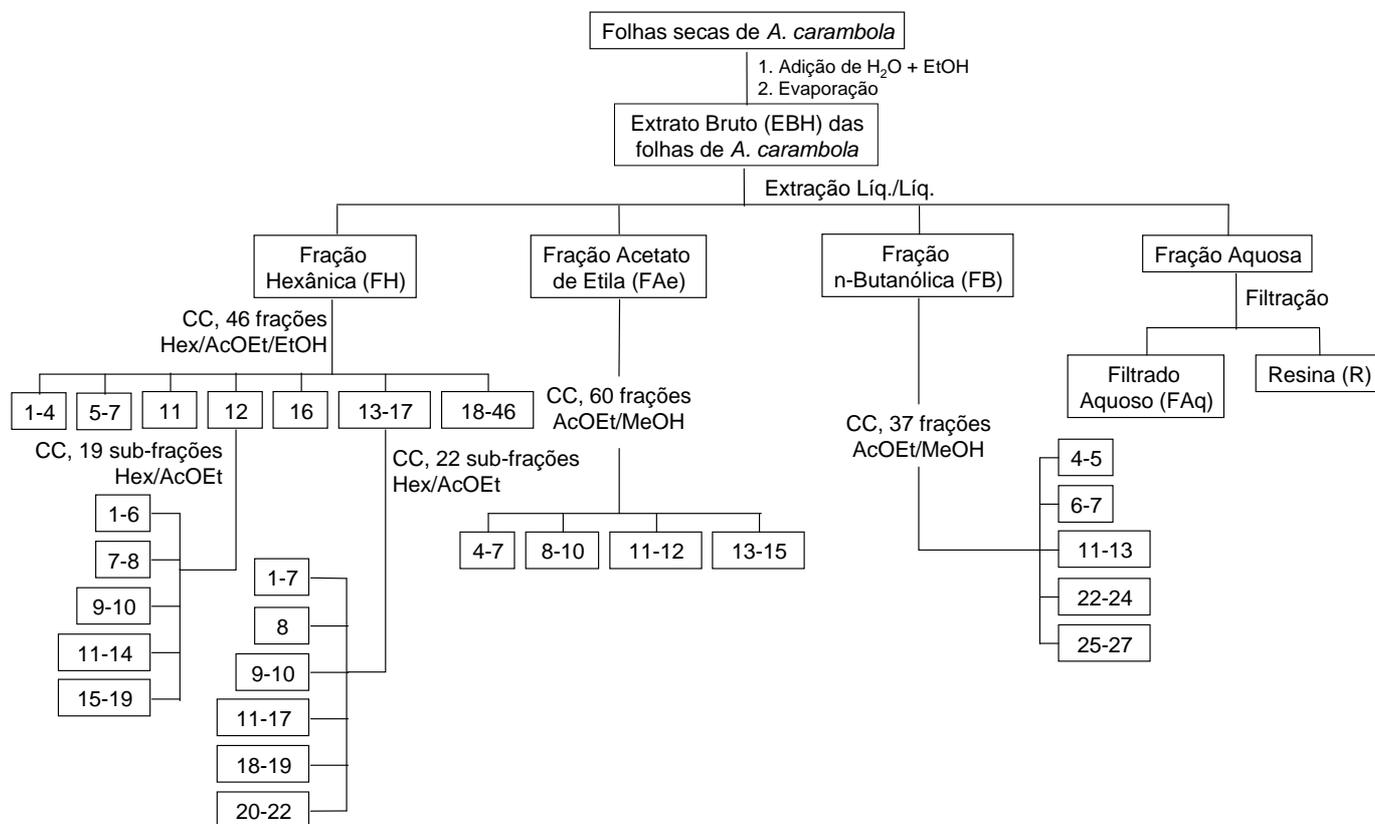
### 4.3. Fracionamento do extrato de *Averrhoa carambola*

As folhas da espécie vegetal após a coleta foram secas à sombra, trituradas e extraídas por maceração em solução hidroetanólica (20:80) por 15 dias. Posteriormente, o extrato bruto foi concentrado sob pressão reduzida e a temperatura controlada (50°C), até 1/3 de seu volume. Este extrato foi então particionado em funil de separação com solventes de distintas polaridades como hexano, acetato de etila, n-butanol, formando as frações: i) hexânica (FH), ii) acetato de etila (FAe), iii) butanólica (FB) e fração aquosa. Nesta última fração observou-se a precipitação de uma resina após alguns dias em repouso, sendo filtrada e obtida a resina (R) e filtrado aquoso (FAq). Todas estas frações foram concentradas até a completa eliminação do solvente, sendo simultaneamente monitorados quanto suas atividades biológicas (alelopática, antioxidante e citotóxica), conforme pode ser observado na Figura 3.

A Fração Hexânica (FH) de *A. carambola* foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel segundo o fluxograma mostrado na Figura 3. A eluição da coluna foi realizada utilizando o seguinte sistema de solventes em ordem crescente de polaridade, hexano/acetato de etila/etanol. As sub-frações foram coletadas e concentradas em um evaporador rotatório e transferidas para frascos menores. As frações foram reunidas de acordo com monitoramento por CCD, de acordo com o perfil cromatográfico. Algumas destas frações foram analisadas por métodos espectroscópicos como infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13 (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas (CG-EM).

A Fração Acetato de etila (FAe) foi também submetida a cromatografia em coluna, sendo utilizados como eluente acetato de etila/metanol (Fig. 3). Seguiu-se o mesmo procedimento da coleta das sub-frações da fração hexânica, e a mesma metodologia para a análise das frações reunidas. Algumas das sub-frações obtidas do fracionamento cromatográfico apresentaram-se de forma cristalina, sendo então submetidas a análises espectroscópicas, tais como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM).

A Fração Butanólica (FB) seguiu o mesmo procedimento das anteriores para o fracionamento, resultando em 37 frações que estão sendo analisadas.



**Figura 3:** Fluxograma representando a separação do Extrato Bruto em frações.

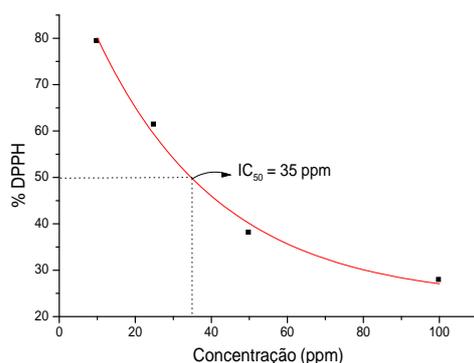
#### 4.4. Ensaio de germinação de sementes

Utilizou-se para os testes de germinação, sementes de *Lactuca sativa* (alface), que é uma dicotiledônea e pertence à família Compositae. Estas sementes foram usadas como indicadores da presença de aleloquímicos, conforme metodologia utilizada por Nishimura et al. (1984) com modificações. Os extratos de *A. carambola* foram dissolvidos em solventes apropriados (etanol ou metanol) nas concentrações desejadas (0,31 – 5,00 %). Impregnou-se discos de papel filtro Whatman N° 1 (5,5 cm de diâmetro) com 1 mL do extrato da planta. Após a evaporação do solvente, os papéis filtro impregnados foram colocados em placas de Petri (6,0 cm de diâmetro) e adicionou-se 1,5 mL de Tween 80 (100 µg mL<sup>-1</sup>), deixando-se em repouso por uma noite. No dia seguinte, cada disco de papel filtro recebeu 25 sementes de *Lactuca sativa*, distribuídas sem obedecer a um espaçamento uniforme, com 3 repetições cada. As sementes de alface foram previamente esterilizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (10%) durante 5 minutos. Utilizou-se um controle negativo, seguindo procedimento similar, porém na ausência do extrato da planta. A germinação foi conduzida em fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro e a 25°C, sendo os discos de papel filtro regados diariamente com água destilada. As leituras para a avaliação da germinação de sementes foram diárias, sendo que, para padronização do teste, observou-se a germinação até o 5° dia. Como critério de germinação foi estabelecido a protusão radicular.

Com relação ao bioensaio de desenvolvimento da plântula, efetuou-se as medidas do comprimento da radícula e do hipocótilo com ajuda de uma régua, após 5 dias de semeadas as sementes, sendo estes resultados comparados com os controles negativos (testemunha).

#### 4.5. Ensaio antioxidantes com DPPH

Esta técnica baseia-se no método de Cavin et al. (1998) e Bouchet et al. (1998 a e b). O ensaio consiste em fazer uma solução metanólica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) 0,004% preparada momentos antes do uso e de soluções de diferentes concentrações das frações ou extrato bruto (200, 100, 50, 25, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A mistura de 2 mL de solução de DPPH com 1 mL da amostra vegetal, foi agitada e após 30 minutos, foi feita a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, comparando-se esta leitura a um branco, que consistiu na solução de DPPH na ausência do extrato vegetal. A percentagem de atividade antioxidante é dada pela fórmula  $(A_o - A_i / A_o) \times 100$ , onde,  $A_o$  e  $A_i$  correspondem a absorvância da solução na ausência e presença do extrato de planta. O gráfico da % de decréscimo na absorvância do DPPH em função da concentração do extrato vegetal, fornece a  $IC_{50}$ , a concentração de extrato necessária para causar 50% de atividade antioxidante (Fig. 4).



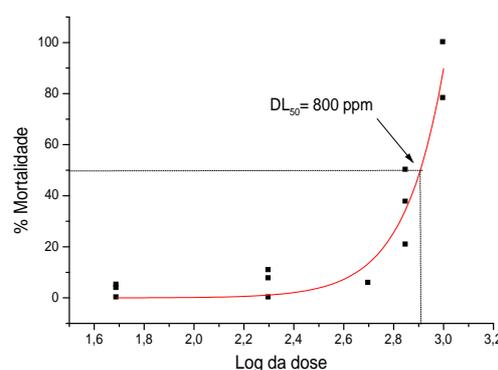
**Figura 4:** Obtenção da concentração necessária para provocar 50% da atividade antioxidante para o Extrato Bruto (EBH).

#### 4.6. Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*

O extrato bruto e frações foram avaliados pelo teste de toxicidade frente *A. salina* segundo a metodologia de Meyer et al. (1982) com modificações. Estes foram dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de  $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$  que foi diluído nas concentrações desejadas para o teste (100, 200, 500, 700 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A toxicidade do extrato bruto e frações foi medida em solução de água marinha com 1% de Tween 80 (v/v). Cada concentração é feita em triplicata e estas foram acompanhadas do controle positivo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), cuja toxicidade está entre 20 e 40 ppm segundo a literatura (Sam, 1993), e controle negativo (etanol). Entre seis a dez larvas foram usadas em cada teste, sendo os sobreviventes contados após 24 horas em contato com os extratos.

A concentração para matar 50% das larvas após o tempo de exposição, a  $\text{DL}_{50}$  crônica, foi determinada através de um gráfico de mortalidade (%) em função do logaritmo da dose, conforme se observa na Fig. 5. Este método é descrito por Reed-Muench (Ipsen & Feigl, 1970; Miya et al., 1973). O desvio padrão e o intervalo de confiança 95% foram também determinados (Sam, 1993).



**Figura 5:** Obtenção da dose letal 50% para a fração hexânica (FH), frente ao teste de toxicidade com *A. salina*.

## 5. Resultados e discussão

Na literatura foram encontrados poucos estudos com a espécie *A. carambola*, esta tem seus frutos e folhas utilizados na medicina popular como excitantes do apetite, anti-disentérica e anti-escorbútica, suas folhas também são recomendadas para pessoas diabéticas. Visando encontrar atividade nas folhas de *A. carambola*, foram aplicados bioensaios simples, a fim de monitorar o fracionamento do extrato vegetal.

### 5.1. Análise do Bioensaio utilizando *Artemia salina*

O bioensaio que utiliza *Artemia salina* tem sido adotado em laboratórios de fitoquímica para avaliar a atividade citotóxica. Este bioensaio apresenta também boa correlação com outros ensaios biológicos.

Foram submetidos a este ensaio os extratos brutos das folhas de *A. carambola*, assim como as frações (FH, FAe e FB) obtidas a partir deste extrato. Neste bioensaio, considera-se uma planta com atividade citotóxica, quando o valor  $DL_{50}$  for menor que 1000 ppm (Meyer et al., 1982). Na Tabela 1 encontram-se os valores da  $DL_{50}$ .

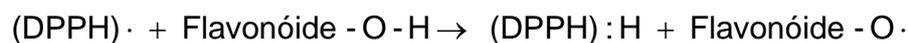
Com base nos resultados representados na tabela abaixo, pode-se observar que a fração hexânica e o extrato bruto apresentaram toxicidade frente ao ensaio com *Artemia salina*. Já as frações n-butanólica e acetato de etila não apresentaram atividade significativa frente a este bioensaio. Sendo assim, a fração hexânica foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC), tendo suas sub-frações reunidas por análise de cromatografia em camada delgada (CCD). A toxicidade destas sub-frações foi testada e os resultados apresentados na tabela 1. As frações 8-10 foram as que apresentaram maior toxicidade frente a este ensaio, tendo as frações 18-24 apresentado pouca atividade. As demais frações não apresentaram toxicidade significativa.

**Tabela 1:** Bioensaio com *Artemia salina* aplicado ao extrato, frações e sub-frações obtidas a partir da Fração hexânica de *A. carambola*.

Extrato/fração	DL <sub>50</sub> , µg mL <sup>-1</sup>
Extrato bruto	980
Fração hexânica	800
Fração acetato de etila	> 1000
Fração n-butanólica	> 1000
Sub-frações obtidas da Fração hexano	
2	> 1000
5-7	> 1000
8-10	560
18-24	900
25-28	> 1000
40-46	>1000

## 5.2. Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante

O bioensaio que utiliza o radical livre DPPH é utilizado para determinar a possível atividade antioxidante de extratos vegetais. Este radical é relativamente estável, de forte coloração azulada e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o metanol. A ação seqüestrante de radicais livres do DPPH deve-se a reação deste com compostos, geralmente fenólicos, pela abstração de um átomo de hidrogênio, de acordo com a seguinte equação:



A solução metanólica de DPPH 0,004% é progressivamente descorada com a adição do extrato, e, quanto maior for a atividade antioxidante do extrato, maior será a descoloração da solução.

A atividade antioxidante do extrato bruto, resina e frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica das folhas de *Averrhoa carambola* pode ser observadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Atividade antioxidante do extrato e frações de *A. carambola*.

Concentração do extrato, $\mu\text{g mL}^{-1}$	% Atividade antioxidante				
	EBH	FH	FAe	FB	R
10	20,7	1,2	13,9	2,0	2,8
25	38,7	3,7	31,7	10,5	7,3
50	62	6,1	55,8	19,9	14,6
100	72,2	12,9	70,4	36,1	21,4
200	71,7	21,4	72,5	42,9	29,8

A  $\text{IC}_{50}$ , que é a concentração necessária para que se obtenha 50% de atividade, pode ser determinada somente para o extrato bruto (35 ppm) e para a fração acetato de etila (43 ppm). Pode-se dizer que a atividade antioxidante da resina e das frações hexânica e n-butanólica é baixa para a maior concentração testada (200 ppm).

### 5.3. Análise do Bioensaio para Atividade Alelopática

Para realizar o ensaio de germinação de sementes a fim de avaliar a atividade alelopática, foram submetidos ao teste: resina e frações obtidas a partir do EBH de *A. carambola*. O efeito destes extratos sobre a germinação de sementes de alface (*L. sativa*), assim como sobre o desenvolvimento da plântula, isto é, crescimento da radícula e hipocótilo, estão mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Efeito das frações de *A. carambola* sobre a germinação de sementes, crescimento de radícula e hipocótilo.

[hexânica], g%	%Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	102	62	111
0,62	96	27	75
1,25	100	6	60
2,50	75	8	90
5,00	75	17	69
[Acetato de etila], g%	%Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	102	65	131
0,62	96	54	107
1,25	69	48	99
2,50	31	12	66
5,00	NG	-	-
[n-Butanólica], g%	%Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	96	50	60
0,62	104	57	74
1,25	52	62	68
2,50	94	18	53
5,00	10	3	36
[Resina], g%	%Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	85	25	48
0,62	96	85	68
1,25	90	44	56
2,50	94	31	57
5,00	63	5	48

NG: não observou-se germinação

Em todas as frações, nas concentrações de 0,31 e 0,62%, a inibição de germinação de sementes foi pouco expressiva, porém na concentração de 5%, na fração n-butanólica, a inibição de germinação foi de 90%, enquanto que na

fração acetato de etila não se observou germinação. Isto indica que estas frações podem conter compostos com potencial ação herbicida.

Quanto ao desenvolvimento da plântula, as frações e a resina inibiram mais o crescimento da radícula que do hipocótilo, sendo a fração acetato de etila a mais ativa, onde na concentração de 5,00 g% não observou-se desenvolvimento da plântula, seguida pela fração n-butanol, com 97% e 64% de inibição de crescimento da radícula e hipocótilo, respectivamente. A fração hexânica e resina mostraram uma inibição no crescimento radicular de 83% e 95% na concentração de 5,00 g %, respectivamente. Já para o crescimento do hipocótilo observou-se um efeito inibitório de 31%, 64% e 52% na concentração de 5,00 g % para as frações hexânica, n-butanólica e resina, respectivamente.

#### **5.4. Estudo Fitoquímico do Extrato de *Averrhoa carambola***

Após fracionamento da fração hexânica, através de cromatografia em coluna de sílica gel e análise por cromatografia em camada delgada (CCD) as 46 frações coletadas puderam ser reunidas conforme perfil cromatográfico (Ver fluxograma pág. 20).

As frações 5-7 e 16 foram encaminhadas para análise por CG-EM. Os cromatogramas gasosos destas frações mostraram que estas são constituídas por uma mistura de compostos (Fig. 1 e 2 Anexo).

Através de comparação entre os espectros de massas destes constituintes com espectros armazenados em biblioteca computadorizada, segundo banco de dados Wiley-Windows, pode-se identificar alguns destes constituintes (Tabela 4).

A partir da fração 12 obtida da fração hexânica foi realizada outra cromatografia em coluna, sendo que desta foram obtidas 19 sub-frações, reunidas pela análise do comportamento frente a CCD. Depois de reunidas, as sub-frações 7-8 e 11-14 foram encaminhadas para análise por CG-EM (Anexo Fig. 3 e 4). Os resultados da análise por CG-EM estão sumarizados na Tabela 4.

**Tabela 4** : Constituintes da Fração hexânica de *A. carambola* (Coluna DB1, 60-290 °C a 10 °C / min.).

<b>FRAÇÃO HEXÂNICA</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>Nome do composto</b>
<b>Fração 5-7</b>		
1	8,73	NI
2	13,63	Ácido hexadecanóico
3	15,20	Hidrocarboneto insaturado MM=256
4	15,50	Ácido octadecanóico
5	18,10	Ftalato
6	22,66	Vitamina E
7	24,63	NI
<b>Fração 12</b>		
Sub-fração 7-8		
1	14,73	NI
2	21,86	$\gamma$ -tocoferol
3	11,83	Ftalato
4	8,20	NI
Sub-fração 11-14		
1	11,16	Ácido tetradecanóico
2	11,66	Octadeceno
3	13,50	Ácido hexadecanóico
4	15,23	Eicosano
5	15,40	Ácido octanóico
<b>Fração 16</b>		
1	24,40	Esterol de MM=414
2	34,23	NI
3	47,80	NI

NI = Não identificado.

Os ácidos carboxílicos lineares e saturados representam uma boa parte destas frações, não sendo, no entanto, de importância para contribuição à atividade biológica. MacLeod & Ames (1989) analisando os componentes voláteis da carambola (fruto), identificaram 45,21% de hidrocarbonetos alifáticos e 29,39% de ácidos graxos, sendo que o ácido hexadecanóico correspondeu a 12,30% do total dos constituintes identificados. O ftalato identificado nas frações analisadas, provavelmente constitui um artefato derivado do uso de plastificantes em vasilhas e filmes poliméricos. O  $\gamma$ -tocoferol e a vitamina E também foram identificados na fração 12.

As demais frações obtidas da fração hexânica foram purificadas com carvão ativado com posterior filtração em coluna cromatográfica de sílica gel, rendendo diferentes sub-frações, porém em nenhuma delas obteve-se

compostos em forma de cristal sendo, portanto descartadas para um estudo posterior.

A coluna das sub-frações 13 – 17 obtidas da fração hexânica apresentou 22 frações que foram reunidas por semelhança em CCD e encontram-se representadas na Figura 3 (Fluxograma pág 20).

Após várias recristalizações a fração 8 apresentou-se como um composto cristalino de coloração branca e ponto de fusão (132-134)°C. Este composto foi analisado através de diferentes métodos espectroscópicos. A espectroscopia de IV (Fig. 5 Anexo) mostrou bandas de absorção em 3426 e 2936  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de grupos OH e CH respectivamente. Pode-se observar que a banda referente ao estiramento da ligação CH é relativamente bem mais intensa que a do grupo OH. O elevado valor do ponto de fusão e a presença de muitas ligações CH em relação a OH, sugerem a presença de esteróides.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 6 Anexo) mostrou sinais para hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$  em 5,36 ppm, típico de uma dupla trissubstituída e para hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado em 3,50 ppm. Entre 0,68 a 2,29 ppm observam-se sinais relativos a hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^3$ . Análise destes sinais sugere a presença de uma estrutura esteroidal, contendo um grupo –OH e uma dupla ligação. Os dados referentes a esta análise estão relacionados na Tabela 5.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig. 7 Anexo) mostrou sinais em 140,7 ppm (C) e 121,7 ppm (CH) confirmando a presença de uma ligação dupla trissubstituída. O sinal em 71,83 ppm relativo a carbono oxigenado confirma o grupo hidroxila. Os demais sinais se encontram entre 57 e 11 ppm. A comparação destes dados com dados da literatura permitiu identificar este composto como sitosterol (Tabela 5). O sitosterol, mostrado na figura 6, já tinha sido anteriormente isolado de *A. carambola* (Jabbar, 1994).

Análise do espectro de massas (Fig. 8 Anexo) mostrou o íon molecular em m/e 414. O fragmento em m/e 396 corresponde a  $[\text{M}^+]-18$ , isto é, perda de água. O fragmento em m/e 381 corresponde a perda de água e de  $-\text{CH}_3$  do esqueleto do sitosterol. Em m/e 273 observa-se a perda da cadeia lateral ( $\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ ) do sitosterol ( $[\text{M}^+]-141$ ). A perda da cadeia lateral +  $\text{H}_2\text{O}$  é observado em m/e 255, enquanto que em m/e 213 observa-se a perda da cadeia lateral,

parte do ultimo anel (anel D) e H<sub>2</sub>O. Os dados condizem com a literatura (Gershengorn, 1986).

Finalmente, a confirmação da estrutura proposta foi feita através de cromatografia em camada delgada (CCD) em três diferentes solventes, a amostra juntamente com um padrão conhecido de sitosterol. O mesmo índice de retenção (R<sub>F</sub>) nos diferentes sistemas de solvente, mostrou tratar-se do sitosterol.

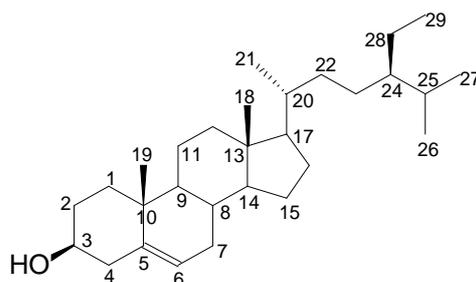
**Tabela 5:** Dados espectroscópicos de RMN de H<sup>1</sup> e de C<sup>13</sup> (200 MHz) para sitosterol (dados experimentais e da literatura) em CDCl<sub>3</sub>.

H – n <sup>o</sup>	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>1</sup> H	C – n <sup>o</sup>	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>13</sup> C
	Dados experimentais	Literatura <sup>a</sup>		Dados experimentais	Literatura <sup>b</sup>
1		1,15; 1,89	1	37,25	37,22
2	1,876;1,573	1,85; 1,56	2	31,65	31,63
3	3,501	3,53	3	71,83	71,80
4	2,294	2,28	4	NO	42,19
5		-	5	140,73	140,72
6	5,36	5,36 <i>d</i> (J = 5Hz)	6	121,73	121,71
7		1,53	7	31,93	31,87
8		1,93	8	31,90	31,87
9		0,98	9	50,14	50,10
10		-	10	36,50	36,48
11		1,51	11	21,09	21,07
12		1,19; 2,03	12	39,77	39,74
13		-	13	42,31	42,26
14		1,00	14	56,75	56,73
15		1,13; 1,61	15	24,31	24,29
16		1,35; 1,61	16	28,25	28,22
17		1,10	17	56,05	56,02
18		0,680 <i>s</i>	18	11,98	11,84
19		1,009 <i>s</i>	19	19,40	19,39
20		1,37	20	36,14	36,12
21		0,922 <i>d</i> (J = 7Hz)	21	18,78	18,76
22		1,04; 1,35	22	33,94	33,91
23		1,20	23	26,07	26,02
24		0,97	24	45,83	45,81
25		1,70	25	29,15	29,11
26		0,836 <i>d</i> (J = 7 Hz)	26	19,82	19,80
27		0,814 <i>d</i> (J = 7 Hz)	27	19,01	19,01
28		1,27	28	23,05	23,04
29		0,846 <i>t</i> (J = 7 Hz)	29	11,98	11,97

<sup>a</sup> David Nes, W. Norton, R. A. and Benson, M. Carbon-13 NMR Studies on sitosterol biosynthesized from [<sup>13</sup>C] Mevalonates. *Phytochemistry*, **31** (3), p. 805-811, 1992.

<sup>b</sup> De-Eknamkul, W. and Potduang, B. Biosynthesis of -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, **62** (3), p. 389-398, 2003.

NO Não observado



**Figura 6:** Estrutura do -sitosterol.

A fração acetato de etila também foi fracionada por cromatografia em coluna, obtendo-se inicialmente 60 frações (Ver fluxograma pág. 20), as quais foram reunidas segundo semelhança pela CCD.

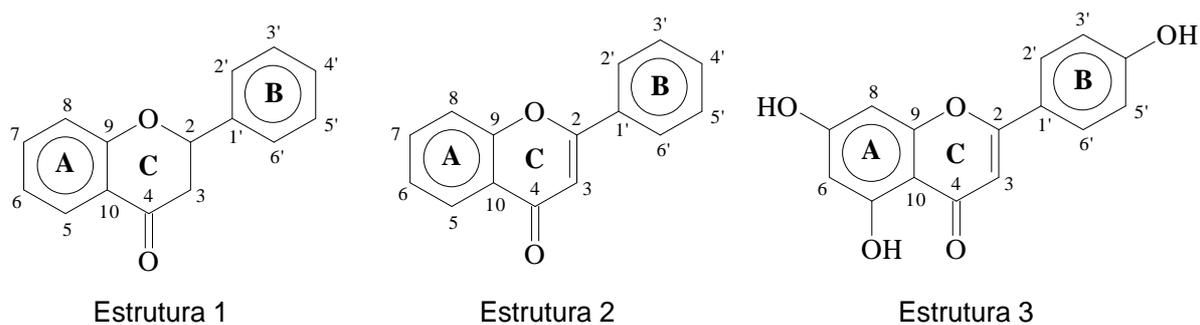
As frações 4-7 quando analisadas por CCD apresentaram apenas uma única mancha ( $R_f = 0,80$  em 80/20 AcOEt/MeOH) se tratando, portanto, de uma amostra pura.

O espectro de UV desta fração sugere a presença de flavonóides, mostrando dois picos com  $\lambda_{max}$  em 272 (banda II) correspondente ao anel A e 336 nm (banda I) correspondente ao anel B (Estrutura 1 da Figura 7). À solução metanólica desta fração, adicionou-se separadamente, metóxido de sódio, que ioniza todos os grupos hidroxílicos do flavonóide, com posterior deslocamento da banda; acetato de sódio que ioniza apenas os -OH fenólicos mais ácidos e cloreto de alumínio que indica a presença de grupos orto-hidroxílicos.

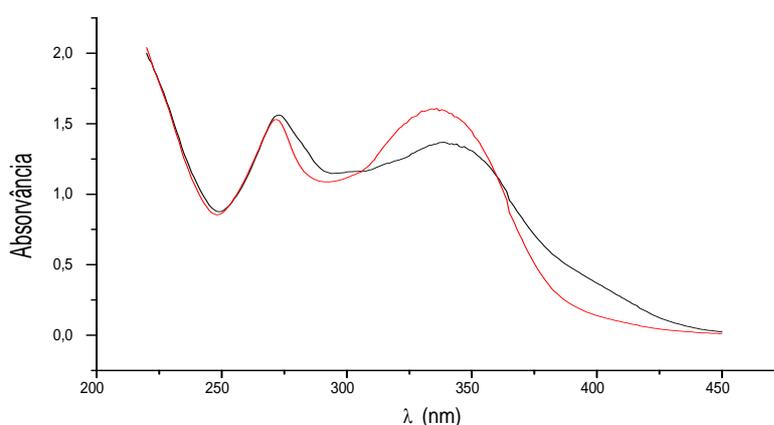
Na Figura 8, pode-se observar que com adição de acetato de sódio (linha preta) houve um deslocamento de 3 nm na banda (I) indicando que o anel aromático possui um substituinte na posição 4'.

Com adição de metóxido de sódio, uma base mais forte, observou-se um ombro em 331 nm e deslocamento batocrômico de 61 nm e 8 nm nas bandas I e II respectivamente, indicando que tanto o anel A quanto o anel B possuem grupos -OH fenólicos.

A adição de cloreto de alumínio mostrou a presença de um ombro em 303 nm e deslocamento batocrômico de 9 nm nas bandas I e II. O espectro encontra-se representado na Figura 8.



**Figura 7:** Estrutura Básica de um Flavonóide (Estrutura 1), de uma Flavona (Estrutura 2) e da Apigenina (Estrutura 3).



**Figura 8:** Espectro de UV da fração 4-7 sem (linha vermelha) e com adição de acetato de sódio (linha preta) da Fração acetato de etila de *A. carambola*.

O espectro de IV desta fração apresentou um perfil característico de flavonóide glicosilado com uma banda larga e intensa em  $3395\text{ cm}^{-1}$  relativa a vibração da ligação O–H, e carbonila de flavonóide em aproximadamente  $1640\text{ cm}^{-1}$  e bandas de estiramento C–C aromático na região de  $1590\text{ cm}^{-1}$ , o espectro encontra-se representado na Figura 9 do Anexo.

O alto valor de seu ponto de fusão em torno de  $230^{\circ}\text{C}$  com posterior caramelização indica uma possível presença de açúcar ligado ao esqueleto do flavonóide.

**Tabela 6:** RMN de  $^{13}\text{C}$  para a fração 4-7 em MeOD comparados com Apigenina – 6 – C – – D – Glucopiranosídeo, Isofurcatin (Apiogenina – 6 – C – alfa – L Rhamnospiranosídeo) e Apigenin – 8 – C – – D Glucopiranosídeo.

	Apigenina – 6 - C - $\beta$ - Glc	Apigenina – 6 - C - $\alpha$ - Rham	Apigenina – 8 - C - $\beta$ - Glc	<b>Dados experimentais</b> <b>Proposição</b>
<b>Açúcar</b>				
C1''	79	77,3	78,8	79,99
C2''	73,4	74,5	73,9	75,11
C3''	70,7	74,3	71,4	73,48
C4''	70,7	72,2	70,8	72,30
C5''	81,3	72,0	81,9	72,14
C6''	61,6	18,3	61,5	18,27 e 19,67
<b>Aglicona</b>				
C2	163,8	164,1	164,0	166,62
C3	102,9	102,8	102,6	101,09
C4	181,9	182,0	181,9	184,5
C5	156,9	158,2	155,8	169,0
C6	108,8	108,0	98,9	101,4 (ou C8)
C7	163,8	163,8	162,5	163,16
C8	94,2	95,1	104,2	80,62 (ou C6)
C9	161,3	156,6	160,6	NO
C10	103,5	103,2	104,2	NO
C1'	121,2	121,3	121,8	123,42
C2'	128,4	128,7	128,5	129,96
C3'	116,3	116,2	116,0	117,50
C4'	160,6	161,4	160,9	159,31
C5'	116,3	116,2	116,0	117,50
C6'	128,4	128,7	128,5	129,96

Referência: AGRAWAL, P. K. Carbon-13 of flavonoids: Studies in organic chemistry, p.300. Elsevier science, New York, 1989.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 10 Anexo) também apresenta um perfil de flavonóide glicosilado, onde podemos observar sinais típicos de açúcar na região de 3-5 ppm, dois dubletes centrados em 0,835 e 1,44 ppm (ver espectro em acetona- $d_6$ , Fig. 11 Anexo) com constante de acoplamento de 6,2 e 5,8 Hz

respectivamente, sugerindo a presença de duas ramnosos. Na região de hidrogênio aromático pode-se observar um par de dubletes centrados em 7,12 ppm ( $J = 8,6$  Hz) e em 8,06 ppm ( $J = 8,6$  Hz) com integração de dois hidrogênios cada que pode ser atribuído ao anel B *p*-substituído de um flavonóide. Dois singletes centrados em 6,73 ppm e 6,83 ppm que podem ser atribuídos ao H-3 e H-6 (ou H-8) respectivamente de uma flavona (Figura 7, Estrutura 2) com o anel A trissubstituído, sugerindo se tratar da Apigenina (Figura 7, Estrutura 3).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 12 Anexo) observa-se dois sinais para - $\text{CH}_3$  em 19,53 e 18,40 ppm confirmando a presença de duas ramnosos e os demais sinais do açúcar aparecem na região de 70 a 80 ppm. Os sinais na região de aromáticos estão de acordo com a presença de um esqueleto flavonoídico semelhante a apigenina, conforme comparação com os dados da literatura (Tabela 6).

O espectro de DEPT (Fig. 13 Anexo) não mostra nenhum sinal de  $\text{CH}_2$ , mas mostra duas metilas, de duas ramnosos e os sinais de CH na região acima de 70 ppm no espectro. Portanto a estrutura não é conclusiva, mas provavelmente se trata de uma apigenina C-ramnosídeo, onde propõe-se que uma das ramnosos esteja ligada diretamente no C-6 ou C-8 da aglicona.

## 6. Conclusões

Através do estudo fitoquímico do extrato bruto e frações de *Averrhoa carambola* biomonitorado pelos bioensaios de atividade alelopática, atividade antioxidante usando DPPH e teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, pode-se concluir:

O extrato bruto e a fração hexânica apresentaram toxicidade frente ao ensaio com *Artemia salina*, indicando potencial atividade citotóxica. Já as frações n-butanólica e acetato de etila não apresentaram atividade significativa frente a este bioensaio.

A atividade antioxidante concentrou-se no extrato bruto e fração acetato de etila, sugerindo que nesta fração há uma maior concentração de compostos fenólicos.

As frações acetato de etila e n-butanólica apresentaram maior efeito alelopático, inibindo tanto a germinação de sementes de alface, quanto o desenvolvimento da plântula.

Análise fitoquímica prévia da fração hexânica mostrou que esta é composta principalmente, por ácidos graxos, vitamina E e  $\beta$ -sitosterol.

Através do fracionamento cromatográfico e análises espectroscópicas na fração acetato de etila observou-se que nesta existe a presença de flavonóides glicosilados.

Portanto, os bioensaios de bancada utilizados mostraram-se efetivos como ensaios rotineiros, bem como rápidos e baratos sendo assim viáveis para a introdução em um laboratório de química de produtos naturais. Estes bioensaios forneceram subsídios para se dar maior atenção às frações que demonstraram atividade.

Assim, deve-se incentivar o isolamento dos compostos responsáveis pelos efeitos de inibição na germinação de sementes e de atividade antioxidante, no sentido de obter herbicidas e antioxidantes naturais, bem como submeter os compostos (ou frações) que foram ativas frente a *A. salina* a ensaios mais elaborados como os que utilizam células tumorais, com a finalidade de encontrar novos fármacos citotóxicos.

## 7. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, P. K. Carbon-13 of flavonoids: Studies in organic chemistry, p.300. Elsevier science, New York, 1989.

ALMEIDA, F.S. *A alelopatia e as plantas*. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), **53**, p.60, 1988.

ALMEIDA, F.S. Efeitos alelopáticos de resíduos vegetais. *Pesquisa agropecuária Brasileira*, Brasília, **26**, n.2, p.221-236,1991.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens - Oxygen Radicals And Degenerative Diseases. *Science*, **221**, p.1256-1263, 1983.

AMES, B.N. et al. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, p.7915-7922, 1993.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **75**, p.199-212, 1998.

BAUMANN, J.; et al. Prostaglandin synthetase inhibiting O<sub>2</sub> radical scavenging properties of some flavonoids and related phenolic compounds. *Nauny-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **308**, 27, 1979.

BOUCHET et al. Radical scavenging activity and antioxidant properties of tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). *Phytotherapy research*, **12** (3), p.159-162, 1998.

CAO, G.H.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **44** (11), p.3426-3431, 1996.

CAVIN, A., et al. Use of on-flow LC/H-1 NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. *Journal of Natural Products*, **61**, p.1497-1501, 1998.

CHAU, C. et al. Insoluble fiber-rich fractions derived from *Averrhoa carambola*: hypoglycemic effects determined by in vitro methods. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37** (3), p. 331-335, 2004.

CHEN, C.L.; et al. Neurotoxic effects of carambola in rats: The role of oxalate. *Journal of The Formosan Medical Association*, **101** (5), p. 337-341, 2002.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**, p.1585-1612, 1995.

CORRÊA, M.P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Vol. II, p. 3, Ministério da Agricultura, RJ, 1984.

DALLA MARTHA, R. C. et al. Atividade hipoglicêmica de *Averrhoa carambola* L. usada em Manaus como antidiabético. *Newslab. Brasil*, **38**, p.142-148,2000.

DAMASCENO, D. C. et al. Estudos dos Extratos de folhas de *Averrhoa carambola* e *Eugenia jambolana*, obtidas em farmácias de manipulação, sobre o diabete experimental. *Revista Brasileira de Toxicologia*, **15** (1), 2002. Disponível on-line em: <http://www.sbtox.org.br/revistaArtigo.Asp?IdArtigo=2>

DAVID NES, W. NORTON, R. A. and BENSON, M. Carbon-13 NMR Studies on sitosterol biosynthesized from [13C] Mevalonates. *Phytochemistry*, **31** (3), p. 805-811, 1992.

DE-EKNAMKUL, W. and POTDUANG, B. Biosynthesis of -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, **62** (3), p. 389-398, 2003.

EINHELLIG, F.A.; et al. Effects of allelochemicals on plant-water relationships. *Chemistry of allelopathy: biochemical interaction among plants*. Washington: American Chemical Society, p.181-195, 1985.

FESKANICH, D.; et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, p.1812-1823, 2000.

FRANKE, R.; Theoretical drug design methods. *Pharmacochemistry*, Elsevier, Berlin, **7**, p. 412, 1984.

FURUTA, S.; et al. Fluorometric assay for screening antioxidative activity of vegetables. *Journal of Food Science*, **62** (3), p. 526-528, 1997.

GRANATO, L.; *Cultura da caramboleira*. São Paulo: Poci & Companhia, 1919.

HAEGELE, A.D.; et al. Plasma Xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **9**, p.421-425, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Ver. Nutr.*, **16**, p. 33-50, 1996.

HAMBURGER, M. and HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, p.3864-3874, 1991.

IPSEN, J. and FEIGL, P. *Bancroft to Biostatistics*, 2<sup>nd</sup> ed., Harper & Row, New York, Cap. 15, 1970.

JABBAR, A.; et al. 3-Hydroxymethyl-2-Furfural From *Averrhoa carambola*. *Fitoterapia*, **66** (4), p. 377, 1995.

JACOB, R.A. and BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63** (6), p.s985-s990, 1996.

KANTHA, S.S.; et al. A sensitive method to screen for hydroxyl radical scavenging activity in natural food extracts using competitive inhibition ELISA for 8-hydroxy deoxyguanosine. *Biotechnol. Tech.*, **10** (12), p.933-936, 1996.

KORBES, I. C. V. *Manual de Plantas Mediciniais*. Equipe técnica de assessor Ed., 44. ed, Paraná, 1993.

KUBINGI, R.H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, VHC, Germany, 1993.

LEATHER, G.R. and EINHELLIG, F.A. Bioassays in the study of allelopathy. In: PUTNAM, A.R.; TANG, C. (Eds.). *The science of allelopathy*. New York: A. Willey-Interscience Pub., **8**, p.133-145, 1986.

LUTZ, A. and WINTERHALTER, P. Dihydroabscissic alcohol from *Averrhoa carambola* fruit. *Phytochemistry*, **36** (3), p. 811-812, 1994.

LUXIMON-RAMMA, A.; et al. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of The Science of Food And Agriculture*; **83** (5), p. 496-502, 2003.

MacLEOD, G. and AMES, J.M. Volatile componentes of star fruit. *Phytochemistry*, **29** (1), p.165-172, 1990.

MAXWELL, S.R.J. and LIP, G.Y.H. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **44**, p.307-317, 1997.

McLAUGHLIN, J.L. and HOSTESTTMANN, K. *Methods in Plant Biochemistry*. Ed. Academic Press, London, Vol. 6, 1991.

McLAUGHLIN, J.L., CHANG, C-J. and SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: An update in studies in natural products chemistry. Amsterdam: Ed. Atta-ur-Rhman, Elsevier, Science Publishers B.V., Vol 9, 1991.

MEYER, B.N., et al. *Brine shrimp*: a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Médica*, **45** (1), p.31-34, 1982.

MICHELS, K.B.; et al. Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, p.1740-1752, 2000.

MIYA, T.S., et al. *Laboratory Guide in Pharmacology*, 4<sup>a</sup> ed., Burgess Publishing, Minneapolis, p.127, 1973.

NETO, M.M.; et al. Intoxication by star fruit (*Averrhoa carambola*) in 32 uraemic patients: treatment and outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*; **18** (1); p. 120-125, 2003.

NISHIMURA, H.; et al. Allelopathic effects of p-menphane-3,8-diols in *Eucalyptus citriodora*. *Phytochemistry*, **23**, p.2777-2779, 1984.

PANIZZA, S. *Plantas que Curam (Cheiro de Mato)* – 3ª edição. IBRASA, São Paulo, 1998.

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*, **1** (4), p.415-440, 1997.

PRATICO, D. and DELANTY, N. Oxidative injuri in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *American Journal of Medicine*, **109**, p.577-585, 2000.

PUTNAM, A.R. and TANG, C.S. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. *The science of allelopathy*. New York: John Willey, p.171-188, 1986

RICE, E.L. *Allelopathy – an overview* 2 ed. Academic Press: New York, p.422, 1984.

SAM, T.W. Toxicity testing using the Brine shrimp: *Artemia salina*. Em: *Bioactive natural products*. COLEGATA, S.M. e MOLYNEUSE, R.J. Ed: CRC Press Inc., USA, cap. 18, p. 441, 1993.

SHUI, G.H. and LEONG, L. P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1022** (1-2), p. 67-75, 2004.

SHUI, G.H. and LEONG, L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **977** (1), p. 89-96, 2002.

SPRIPANIDKULCHAI et al. Diuretic effects of selected Thai indigenous medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **75** (2-3), p. 185-190, 2001.

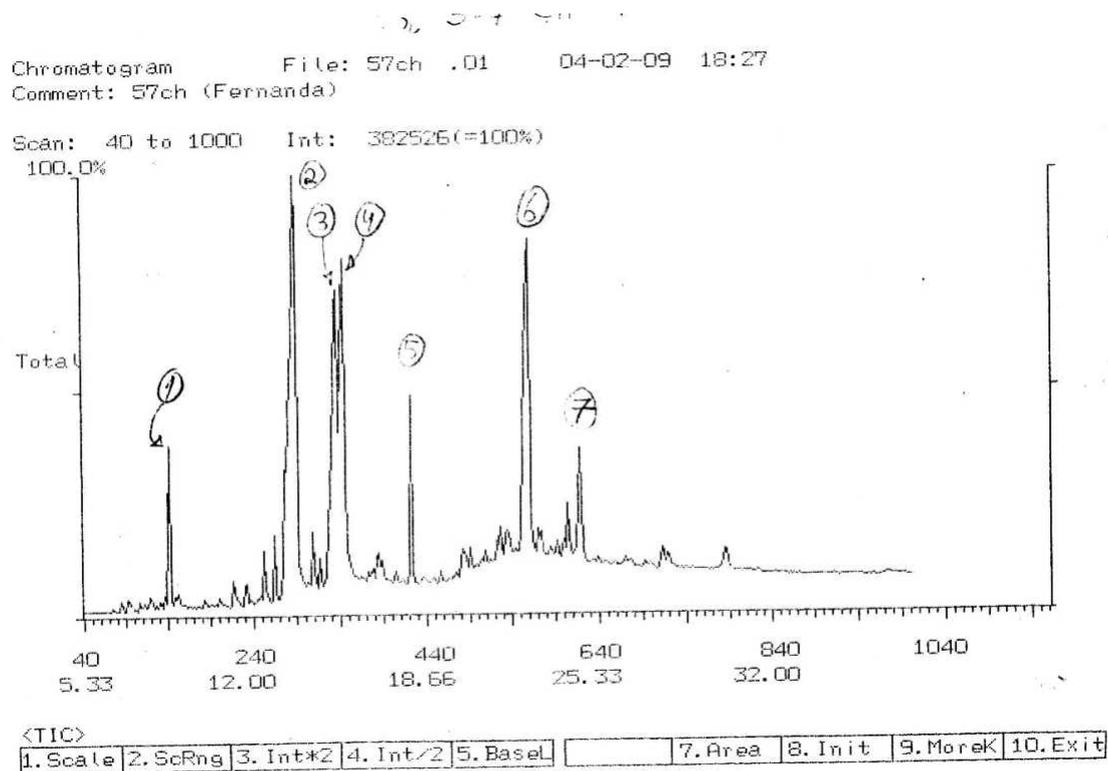
STEINBERG, D. Antioxidants and atherosclerosis: a current assessment. *Circulation*, **84**, p.1420-1425, 1991.

WANG, H.; et al. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agriculture and Food Chem.*, **44**, p.701-705, 1996.

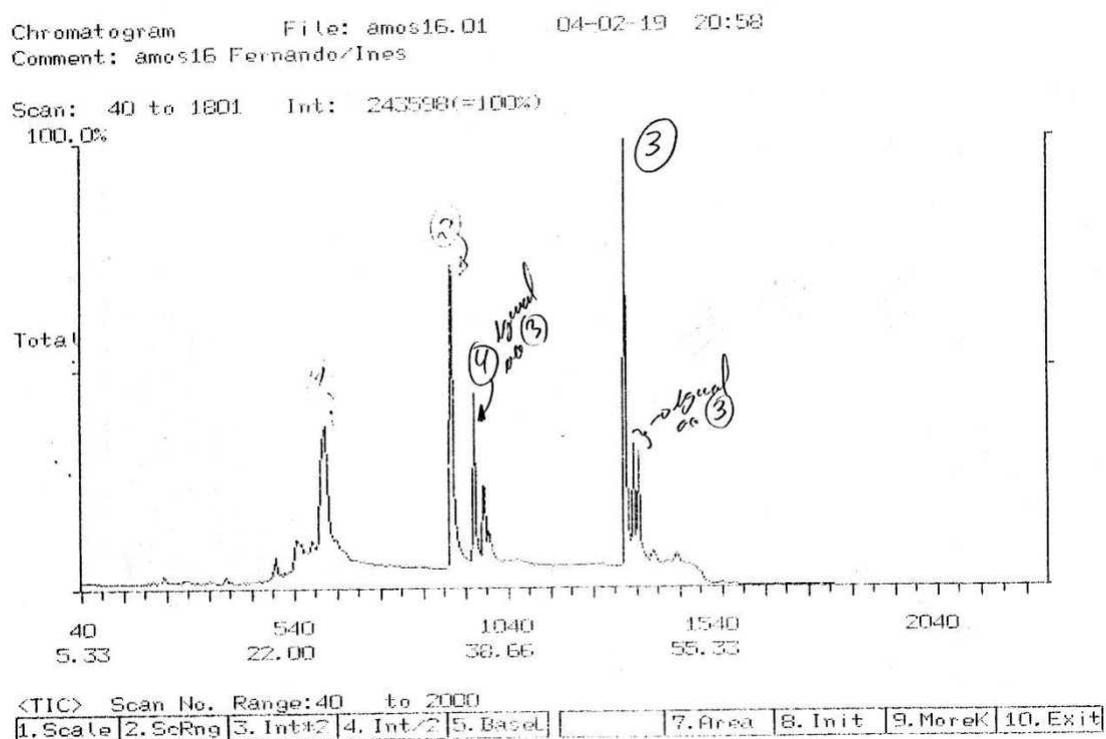
WESTON, L.A. and PUTNAM, A.R. Inhibition Of Legume Seedling Growth By Residues And Extracts Of Quackgrass (Agropyron-Repens). *Weed Science*, **34**, p.366-372, 1986 .

YAP, H.J; et al. Star fruit: A neglected but serious fruit intoxicant in chronic renal failure. *Dialysis & transplantation*, **31** (8), p.564, 2002.

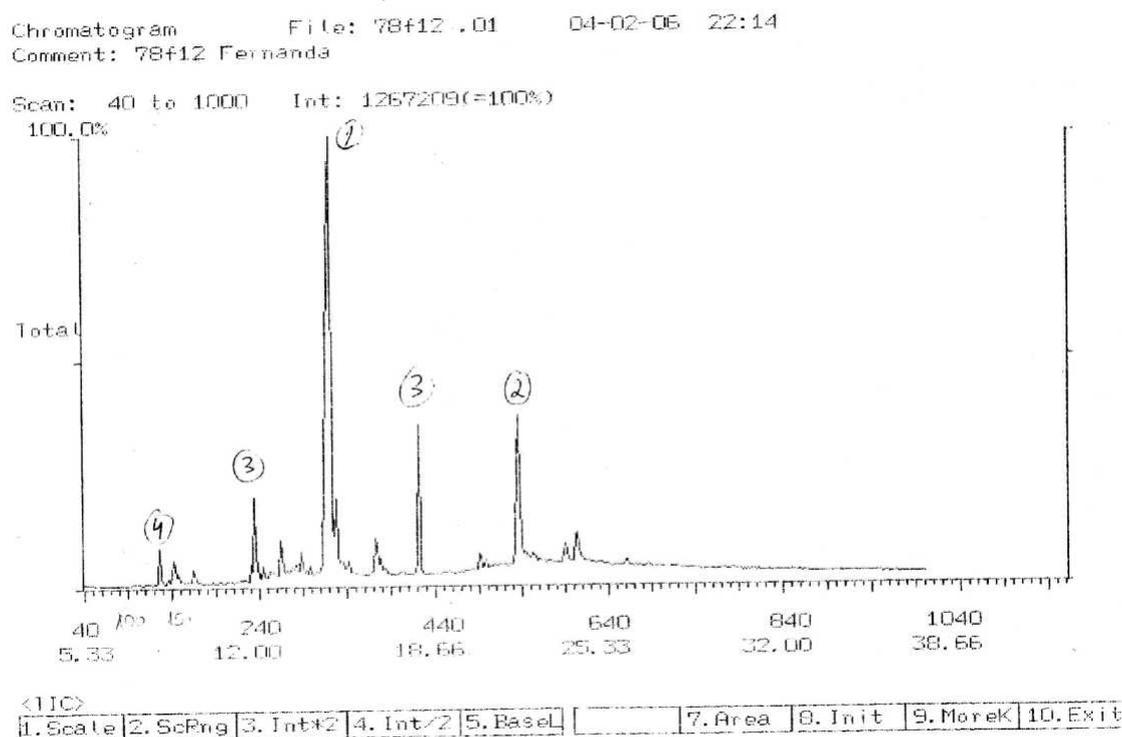
## **8. ANEXOS**



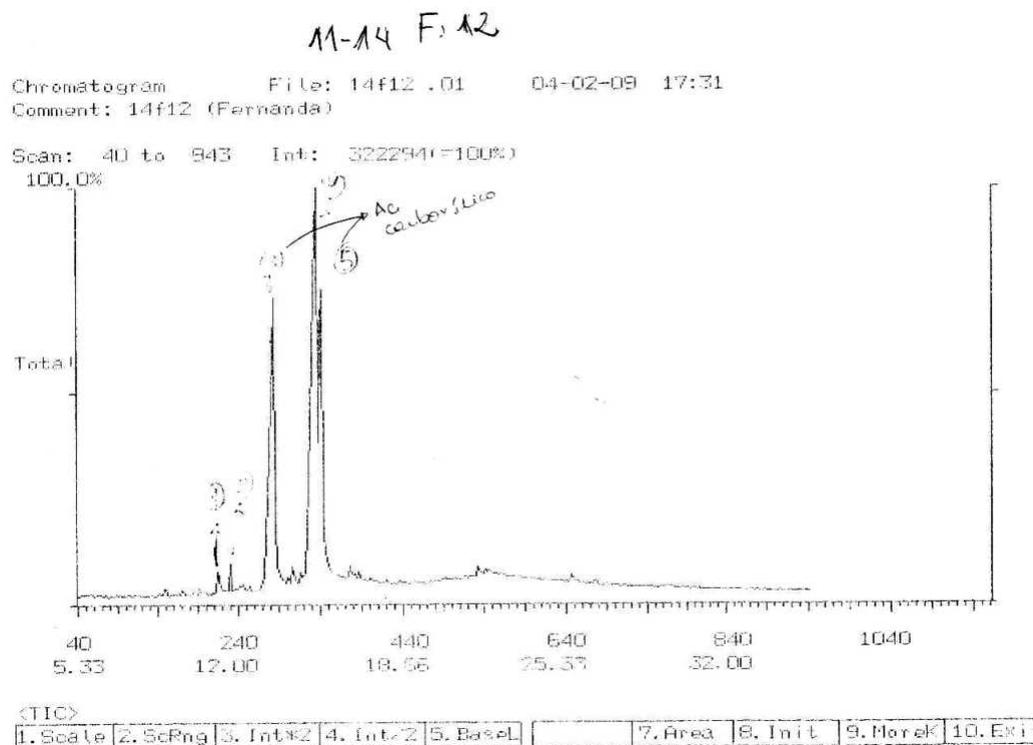
**Figura 1:** Cromatograma gasoso da **Fração 5-7** da Fração Hexânica de *A. carambola* (coluna DB1 , 60-290° C, 10° / min.).



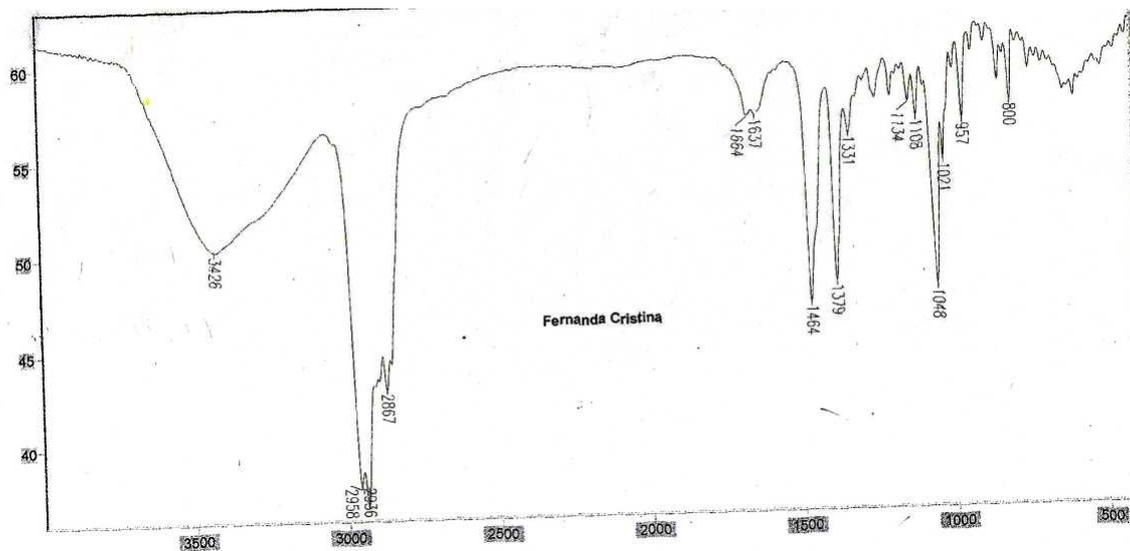
**Figura 2:** Cromatograma gasoso da **Fração 16** da Fração Hexânica de *A. carambola* (coluna DB1 , 60-290° C, 10° / min.).



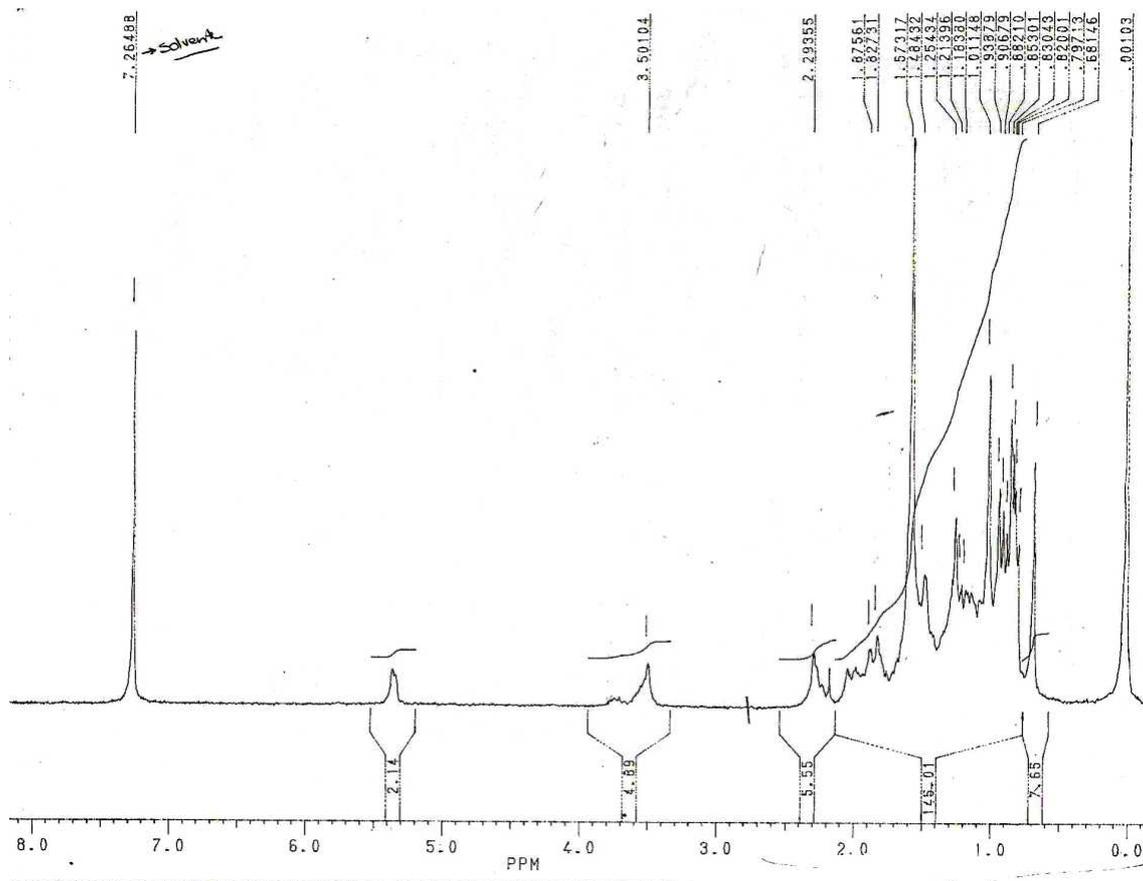
**Figura 3:** Cromatograma gasoso da **sub-fração 7-8 (Fração 12)** da Fração Hexânica de *A. carambola* ( coluna DB1 , 60-290° C, 10° / min.).



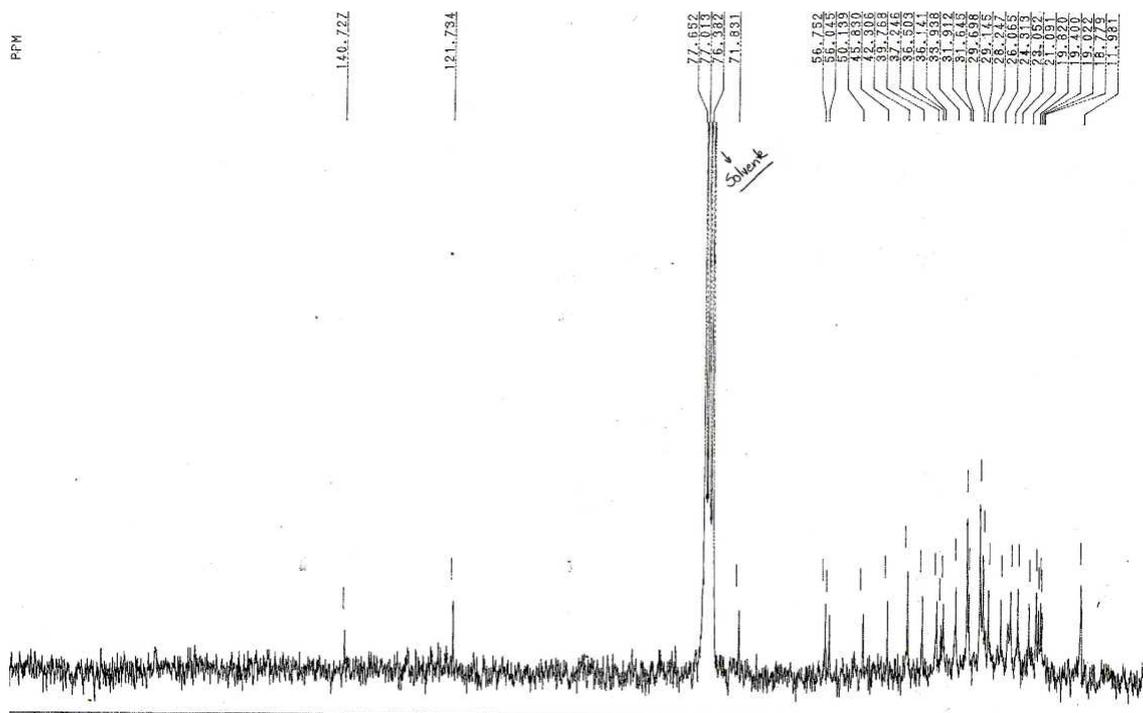
**Figura 4:** Cromatograma gasoso da **sub-fração 11-14 (Fração 12)** da Fração Hexânica de *A. carambola* ( coluna DB1 , 60-290° C, 10° / min.).



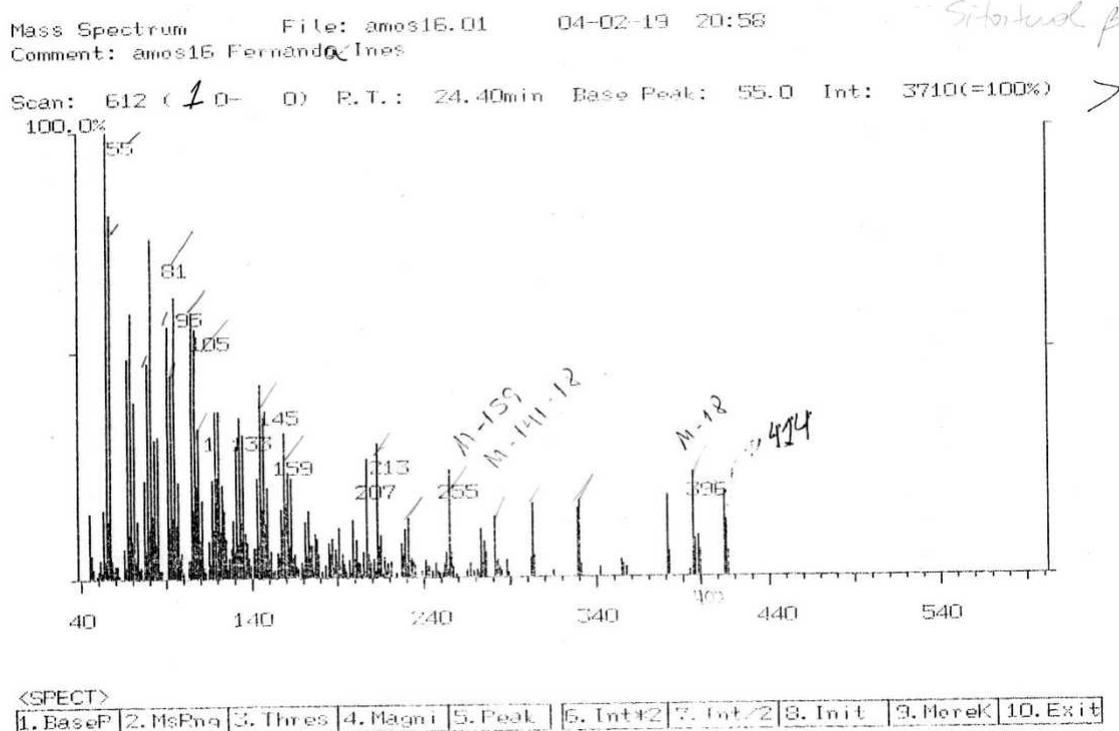
**Figura 5:** Espectro de IV da sub-fração 8 (Fração 13-17) da Fração Hexânica de *A. carambola* (Pastilha de KBr).



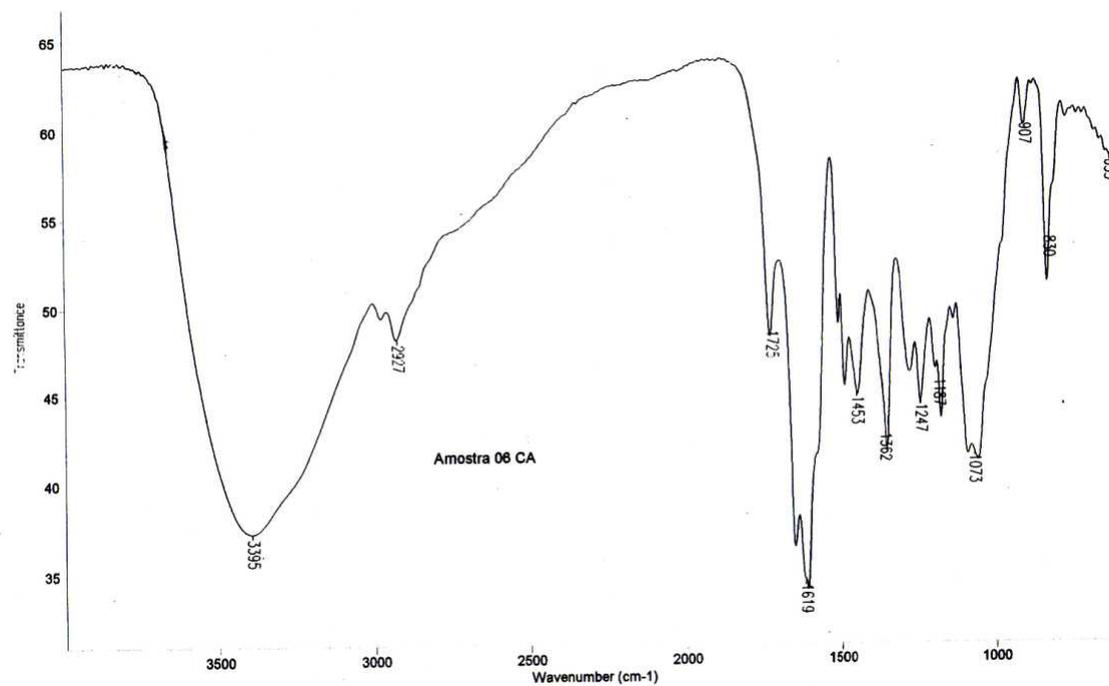
**Figura 6:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da sub-fração 8 (Fração 13-17) da Fração Hexânica de *A. carambola* ( $\text{CDCl}_3$ ).



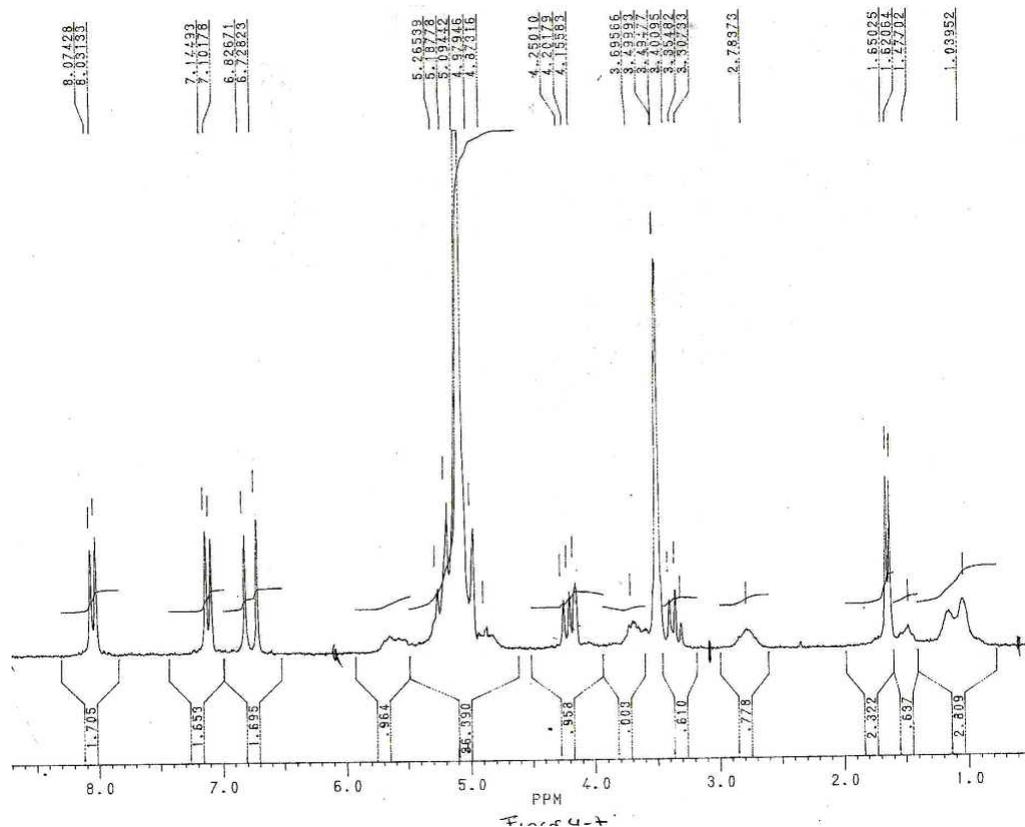
**Figura 7:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da **sub-fração 8 (Fração 13-17)** da Fração Hexânica de *A. carambola* ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 8:** Espectro de Massa da **sub-fração 8 (Fração 13-17)** da Fração Hexânica de *A. carambola*.

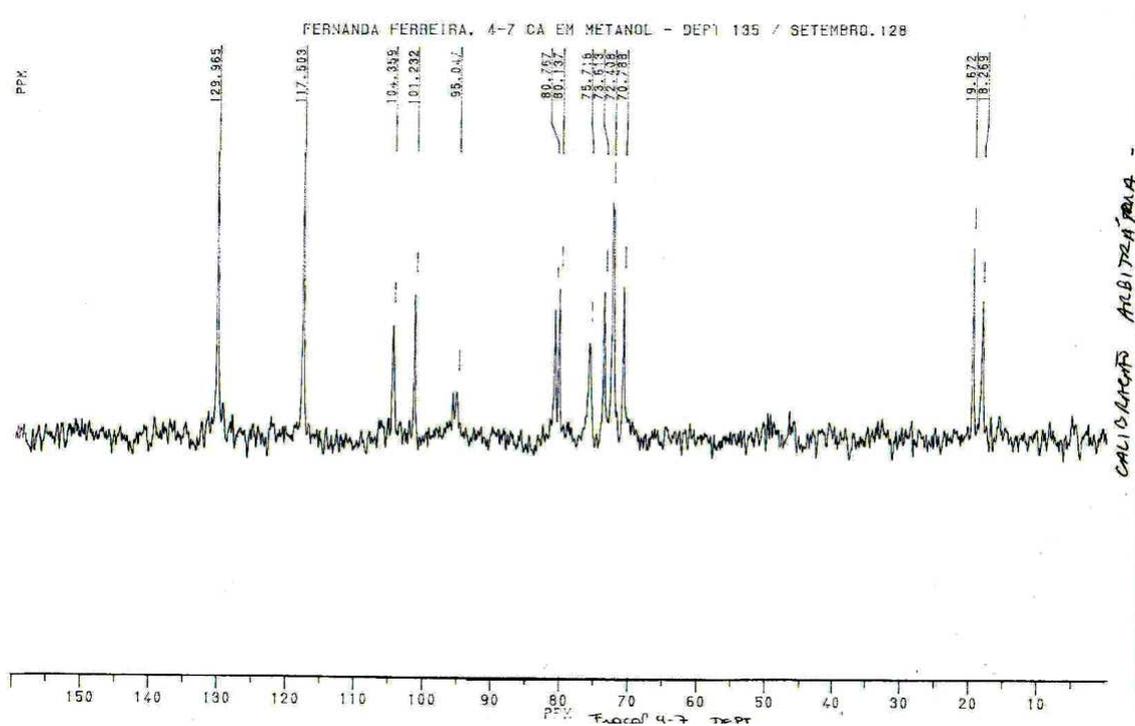


**Figura 9:** Espectro de IV da fração 4-7 obtida da coluna da fração Acetato de Etila de *A. carambola* (Pastilha de KBr).



**Figura 10:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração 4-7 obtida da coluna da fração Acetato de Etila de *A. carambola* (MeOD).





**Figura 13:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  da fração 4-7 obtida da coluna da fração Acetato de Etila de *A. carambola* (MeOD).