

Efeito do extrato bruto hidroalcoólico e de frações de folhas da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) no metabolismo glicêmico de ratos *Wistar*

Marilene Provasi¹, Carlos Eduardo de Oliveira², Luís Cláudio Fernandes³, Osvaldo Tchaikovski³, Roberto Barbosa Bazotte¹, Lucia Elaine Ranieri Cortez⁴ e Diógenes Aparício Garcia Cortez^{2*}

¹Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEM). ²Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), ³Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil. ⁴Universidade Paranaense (Unipar), Umuarama, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: dagcortez@uem.br

RESUMO. As folhas de carambola (*Averrhoa carambola* L.) são utilizadas na fabricação do fitoterápico Glico-Vitae[®], indicado no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Em nossos estudos, ratos machos *Wistar* que receberam, por via intragástrica, o extrato bruto liofilizado (EC) e as frações de EC (20 mg/kg), durante duas semanas, apresentaram redução da glicemia. Mas, diferentemente da insulina, o EC e suas frações não estimularam a síntese de glicogênio e a produção de lactato em músculo sóleo isolado. Da fração mais ativa, empregando métodos espectroscópicos de EM, RMN¹H e RMN¹³C, foram isoladas três frações semipurificadas majoritárias e, por comparação com os dados da literatura, foram identificadas como misturas complexas de açúcares.

Palavras-chave: *Averrhoa carambola* L. Oxalidaceae, carambola, atividade hipoglicemiante, açúcares.

ABSTRACT. Effect of Hydroalcoholic extract and fractions of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) leaves on the glycemic metabolism of *Wistar* rats. Carambola (*Averrhoa carambola* L.) leaves have been used for the production of Glico-Vitae[®], a phytotherapeutic medicine indicated for type 2 diabetes mellitus. Male *Wistar* rats, which received intragastric administration of the liophilized extract (EC) and fractions of EC (20 mg/kg) during 2 weeks, showed decreased ($p < 0.05$) blood glucose levels. However, in contrast to insulin, EC and its fractions neither increased the glycogen synthesis or the lactate production in isolated soleus muscle. In addition, by using spectroscopic methods (MS, NMR¹H and NMR¹³C) a mixture of complex sugars were obtained from the fraction with the highest activity.

Key words: *Averrhoa carambola* L. Oxalidaceae, carambola, hypoglycemic activity, sugars.

Introdução

Duas espécies do gênero *Averrhoa* se destacam por suas propriedades medicinais. O extrato etanólico de folhas da *Averrhoa bilimbi* apresenta propriedades hipoglicêmicas, hipotrigliceridêmicas, antioxidante e antiaterogênica em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (Pushapara *et al.*, 2000). Frações semipurificadas das folhas dessa espécie também demonstraram uma ação hipoglicemiante em ratos diabetizados com estreptozotocina (Pushapara *et al.*, 2001).

Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae) é uma árvore frutífera de pequeno porte cultivada em todo país, cujas folhas são empregadas popularmente como

antidiabético. É provavelmente originária da Índia e foi introduzida no Brasil em 1817. A raiz e as folhas dessa árvore são descritas na farmacopéia indiana (Corrêa, 1926). Os seus frutos apresentam grande quantidade de ácido oxálico, sendo utilizados popularmente como estimulante do apetite, antidesintérico, antiescorbútico e febrífugo. Pacientes com problemas renais dependentes de hemodiálise sofreram intoxicação após a ingestão do suco de fruta de carambola. Essa intoxicação foi atribuída à presença de uma hipotética neurotoxina encontrada nos frutos (Neto *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000). Em contraste ao fruto, o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas apresenta ausência de toxicidade aguda e atividade anti-

hiperglicemiante em ratos (Provasi et al., 2001). Neste estudo, com base no uso popular e nas informações oferecidas pela literatura, decidimos investigar se folhas de *Averrhoa carambola* L. utilizadas na preparação do fitoterápico Glico-Vitae® apresentam atividade antidiabética, bem como determinar a composição química da fração ativa.

Material e métodos

Procedimentos Experimentais Gerais

Os espectros de RMN de ^1H de (300 e 400 MHz) e de ^{13}C (75,5 MHz e 100,6 MHz) foram obtidos em espectrômetro Gemini 300 e Bruker WH 400, com a utilização de CD_3OD como solvente de TMS como referência interna. Os espectros de massa por *electrospray* foram obtidos em espectrômetro Micromass Quattro LC, Autospec-Micromass EBE. As separações cromatográficas foram realizadas em filtração com gel de Sephadex LH-20 e coluna por adsorção empacotadas com sílica gel 60 (70-230 e 230-400 mesh-ASTM, Merck).

Análise de cromatografia em camada delgada (CCD) (Wagner et al., 1984)

Sistema cromatográfico: cromatofolhas AL TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck)- 10X10 cm- 0,2 mm; fase móvel: n-butanol/ácido acético/água (25:5:2); visualização: em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm; revelador: reagente de vanilina-ácido sulfúrico.

Obtenção do extrato bruto

Foram utilizados 1000 mL do extrato das folhas de *Averrhoa carambola* L. de nome comercial Glico-Vitae® fornecido pela indústria de fitoterápicos Extratus, Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil (lote: n° 5009037, com data de fabricação de 13/7/00). A liofilização desse extrato resultou uma massa de 158 g de um pó marrom (EC), o qual foi armazenado a -15°C em dessecador.

Extração e fracionamento

O extrato EC (100 g) foi fracionado inicialmente em coluna de sílica gel (164 g) a vácuo, com a utilização como fase móvel: acetato de etila/metanol (1:1); metanol e metanol/água (9:1). O solvente foi eliminado em evaporador rotativo à pressão reduzida com a obtenção, respectivamente, das frações Fr1 (45,3 g), Fr2 (28,4 g) e Fr3 (24,0 g). Essas frações foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD). A fração mais ativa Fr3 (2,5 g) foi cromatografada em gel de filtração de

Sephadex LH20. Como fase móvel, foram utilizados: metanol; metanol/água (5% a 20%); acetato de etila; clorofórmio/metanol (50:50), e obteve-se 55 frações. Estas frações foram analisadas em CCD e as frações 22 a 27 (1,2 g) foram reunidas. Essa fração reunida foi recromatografada em gel de Sephadex LH20 e eluída com metanol. Obtiveram-se 25 frações, as quais, após análise por CCD, resultaram em três subfrações Faç1 (147 mg), Faç2 (262 mg) e Faç3 (44 mg). As subfrações se revelaram como uma mancha única de cor amarelada em CCD nas condições preestabelecidas acima. Após a análise dos espectros de ESI-MS, ESI-MS/MS MS, RMN ^1H e RMN ^{13}C e, por comparação com dados da literatura, pôde-se sugerir que as subfrações Faç1, Faç2 e Faç3 são misturas complexas de açúcares.

Efeito do tratamento crônico com água (CTR: grupo controle), EC e frações Fr1, Fr2 e Fr3 sobre a glicemia, colesterolemia e trigliceridemia

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com cerca de 220 g, os quais receberam por via intragástrica: EC, Fr1, Fr2 e Fr3 na dose de 20 mg/kg. Os animais controles (CTR) receberam água por via intragástrica. Após 15 dias de tratamento, os ratos, em jejum de 15 horas, foram decapitados 24 horas após a última administração das substâncias acima descritas. O sangue foi colhido para a dosagem sérica de glicose (Bergmeyer e Bernt, 1974), de triglicerídeos (Bucolo e David, 1973) e de colesterol (Allain et al., 1974).

Determinação da síntese de [^{14}C] glicogênio e produção do [^{14}C] lactato

Ratos *Wistar* machos com peso em torno de 180 g foram sacrificados por deslocamento cervical. Os músculos sóleo foram retirados, pesados e pré-incubados em banho com agitação durante 30 minutos em meio Krebs-Ringer com glicose 5,6 mM e BSA 1%, e gaseificados continuamente com O_2/CO_2 (95%/5%) em 37°C. Em seguida, os músculos foram transferidos para frascos com Krebs-Ringer, glicose 5,6 mM, BSA 1%, e 0,3 $\mu\text{Ci/mL}$ de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]- glicose (306 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$). Os frascos receberam insulina na concentração de 1 mU/ml (grupo controle positivo), EC (0,5 ou 1,0 mg/mL) ou frações Fr1, Fr2 e Fr3 (2,5 ou 250 mg/mL). Após 1 hora de incubação, os músculos foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, a produção de [^{14}C]- lactato no meio de incubação e a síntese do [^{14}C]-glicogênio no músculo a partir de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]- glicose (Amersham®) foram analisadas (Foot et al., 1992) em cintilador Beckman®.

Resultados e discussão

Como demonstrado anteriormente que o extrato de *Averrhoa carambola* impede a elevação da glicemia, após a ingestão de amilose (Provasi *et al.*, 2001), decidiu-se investigar se o tratamento de ratos com EC e as frações poderiam promover redução da glicemia de animais submetidos ao ensaio biológico. Assim, o tratamento em que foi empregado o EC, Fr1, Fr2 e Fr3, durante 15 dias, reduziu ($p < 0,05$) a glicemia de jejum (Figura 1), mas não afetou a trigliceridemia e a colesterolemia (resultados não apresentados). Além disso, observou-se que o EC e a Fr3 apresentaram maior redução da glicemia em relação a Fr1 e a Fr2. Em acordo com estes resultados, a atividade hipoglicemiante também foi demonstrada com o emprego do extrato etanólico e frações semipurificadas obtidas de folhas da *Averrhoa bilimbi* em ratos portadores de diabetes induzido por estreptozotocina.

Com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual o EC e as frações Fr1, Fr2 e Fr3 promovem redução da glicemia, investigou-se a possibilidade desses produtos naturais intensificarem a síntese de glicogênio e a produção de lactato a partir de glicose marcada radioativamente em músculo sóleo isolado.

Como o EC apresentou uma tendência na síntese de glicogênio na concentração de 1 mg/mL (Figura 2) e produção de lactato na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 3), decidiu-se investigar se esses efeitos poderiam ser melhor visualizados com as frações Fr1, Fr2 e Fr3. Assim, de acordo com os resultados obtidos com o EC na concentração de 1mg/ml, a síntese de glicogênio (Figura 4) e a produção de lactato (Figura 5) também foram intensificadas. Em relação à fração Fr3, embora a diferença não se apresente estatisticamente significativa ($p > 0,05$), observa-se nítida tendência dessa fração intensificar a síntese de glicogênio (Figura 4) e produção de lactato (Figura 5), quando empregada na concentração de 2,5 mg/mL para o glicogênio e 2,5 e 250 mg/mL para o lactato.

Esses resultados sugerem a possibilidade de existir um componente em Fr3 que poderia atuar por um mecanismo similar ao da insulina. Por essa razão, realizamos um fracionamento de Fr3, o qual levou ao isolamento de três subfrações semipurificadas: Faç1, Faç2 e Faç3. A análise em CCD dessas subfrações foi realizada em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e, após revelada com o reagente de vanilina-ácido sulfúrico, foi visualizado uma única mancha, podendo-se tratar de substâncias puras. O espectro de massas por espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) por *electrospray* (ESI) no modo negativo,

por desprotonação de Faç2, apresentou picos em m/z 561 $[M-1]^-$, m/z 577 $[M-1]^-$, m/z 317 $[M-1]^-$ correspondentes aos íons pseudomoleculares. A análise comparativa dos espectros de massas associados ao de RMN 1H e RMN ^{13}C pôde sugerir tratar-se de uma mistura de açúcares. Os espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C de Faç1 e Faç3 apresentaram semelhanças espectrais com a Faç2 quando comparado ao grupo CTR.

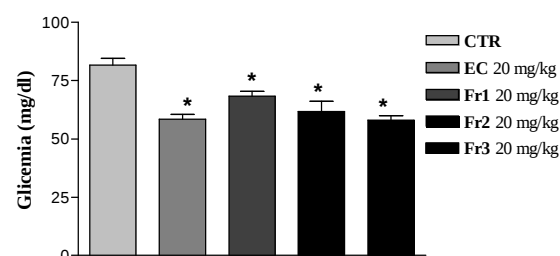


Figura 1. Efeito do tratamento durante 15 dias (via intragástrica) com água (CTR), EC, Fr1, Fr2 e Fr3 sobre a glicemia. Ratos em jejum de 15 horas foram decapitados 24 horas após a última administração das substâncias acima descritas. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 7-8 animais. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CTR.

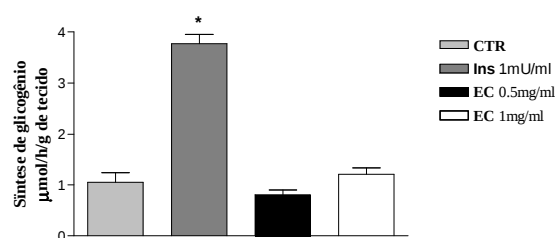


Figura 2. Síntese de glicogênio, a partir de $[U-^{14}C]$ -glicose, em músculo sóleo incubado na ausência (CTR) ou presença de insulina (Ins) ou com extrato da carambola (EC). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos em quadruplicata. * $p < 0,05$

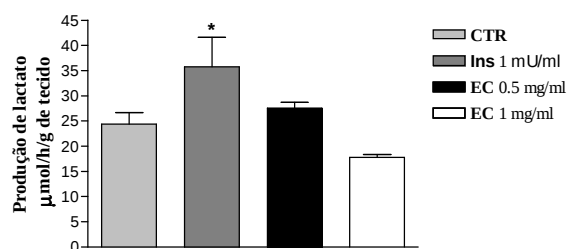


Figura 3. Produção de lactato, a partir de $[U-^{14}C]$ -glicose 5,6 mM, pelo músculo sóleo incubado na ausência ou presença de insulina (Ins) ou extrato da carambola (EC) (0,5 e 1 mg/mL). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CTR.

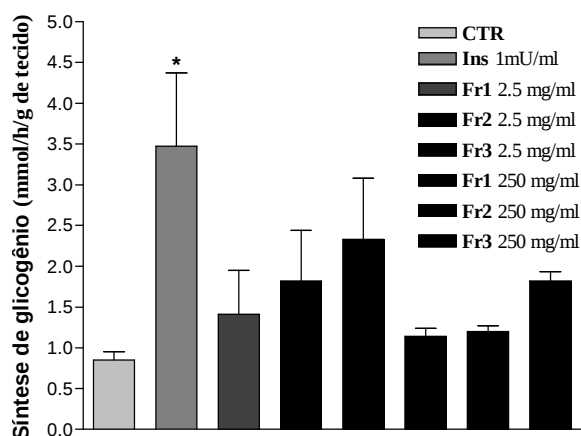


Figura 4. Síntese de glicogênio, a partir de $[U-^{14}C]$ -glicose, em músculo sóleo incubado na ausência (CTR) ou presença de insulina (Ins) ou frações Fr1, Fr2 e Fr3. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CTR.

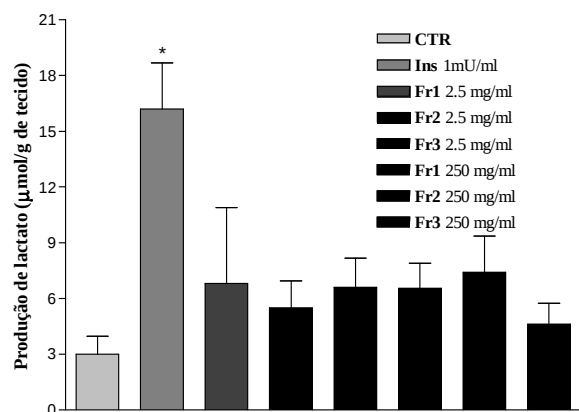


Figura 5. Produção de lactato, a partir de $[U-^{14}C]$ -glicose 5,6 mM, pelo músculo sóleo incubado na ausência ou presença de insulina (Ins), frações Fr1, Fr2 e Fr3. Os dados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CTR.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Bolsa IC/PIBIC) e ao farmacêutico Milton Carlos Martino, pela oferta do produto fitoterápico Glico-Vitae®.

Referências

- ALLAIN, C.C. *et al.* Enzymatic determination of total serum-cholesterol. *Clin. Chem.*, Baltimore, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) *Meth. Enz.c Anal.*, New York: Verlag Chemie Academic Press, 1974, p. 1205-1215.
- BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative-determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin. Chem.*, Baltimore, v.19, n 5, p. 476-482, 1973.
- CHANG, J.M. *et al.* Fatal outcome after ingestion of star fruit (*Averrhoa carambola*) in uremic patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, New York, v. 35, n. 2, p. 189-193, 2000.
- CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 6, 1926.
- FOOT, E. *et al.* The effects of orthovanadate, vanadyl and peroxides of vanadate on glucose-metabolism in skeletal-muscle preparations invitro. *Mol. Cell. Biochem.*, The Hague, v. 109, n. 2, p. 157-162, 1992.
- NETO, M.M. *et al.* Intoxication by star fruit (*Averrhoa carambola*) in six dialysis patients? (Preliminary report). *Nephrol. Dial. Transplant.*, Berlin, v. 13, n. 3, p. 570-572, 1998.
- PROVASI, M. *et al.* Avaliação da toxicidade e do potencial antihyperglicêmico da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) / Evaluation of the toxicity and antihyperglycemic potential of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). *Acta Scientiarum*. Maringá, v. 23, p. 665-669, 2001.
- PUSHAPARAJ, N.P. *et al.* Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharm.*, Lausanne, v. 72, n. 1-2, p. 69-76, 2000.
- PUSHAPARAJ, N.P. *et al.* The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci.*, Elmsford, v. 70, n. 5, p. 535-547, 2001.
- WAGNER, H. *et al.* *Plant Drug Analysis*. New York: Springer-Verlag, 1984.

Received on July 05, 2004.

Accepted on June 20, 2005.