

Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperglicemiante da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae)

Marilene Provasi, Carlos Eduardo de Oliveira, Milton Carlos Martino, Lorena Greisieli Pessini, Roberto Barbosa Bazotte e Diógenes Aparício Garcia Cortez*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Author for correspondence.

RESUMO. As folhas de carambola (*Averrhoa carambola* L.) são utilizadas na fabricação do fitoterápico Glico-Vitae® (GV), indicado no tratamento do diabete mellitus não-insulino dependente. Em nossos estudos pré-clínicos, empregando extrato liofilizado de GV, via intragástrica, observou-se ausência de toxicidade aguda e presença de atividade anti-hiperglicemiante a partir da dose de 30 mg/Kg. Além disso, realizou-se estudo físico e químico das folhas utilizadas na preparação do fitoterápico. Finalizando, o GV foi analisado por cromatografia em camada delgada.

Palavras-chave: *Averrhoa carambola* L., Oxalidaceae, carambola, anti-hiperglicemiante, toxicidade aguda.

ABSTRACT. Evaluation of the toxicity and antihyperglycemic potential of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). The leaves from carambola (*Averrhoa carambola* L.) have been utilized for the production of the herbal medicine Glico-Vitae® (GV) which is indicated for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). The pre-clinical study of the lyophilized GV, administered intragastrically, showed absence of acute toxicity and an antihyperglycemic effect (from 30 mg/kg). In addition a physical-chemistry study of the leaves used in the preparation of this phytoterapic was performed. Finally, GV was analyzed by thin-layer chromatography.

Key words: *Averrhoa carambola* L., Oxalidaceae, star fruit, antihyperglycemic effect, acute toxicity.

A carambola (*Averrhoa carambola* L., Oxalidaceae), árvore frutífera originária da Índia, foi introduzida no Brasil em 1817, sendo utilizada popularmente como estimulante do apetite, antidiarréico e febrífugo (Corrêa, 1926). Em nossa região, de maneira semelhante à *Stevia rebaudiana* (Curi *et al.*, 1986) e a plantas do gênero *Pfaffia* (Alvim *et al.*, 1999), a carambola vem sendo empregada como antidiabético, embora as bases científicas desse emprego ainda não tenham sido estabelecidas. Porém, casos de intoxicação foram observados após a ingestão do suco de fruta de carambola em pacientes portadores de insuficiência renal crônica. Essa intoxicação foi atribuída à presença de uma hipotética neurotoxina encontrada nos frutos (Neto *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2000).

Como a carambola vem sendo consumida pela população, através de um produto comercializado com o nome de Glico-Vitae®, decidiu-se investigar esse produto comercial nos aspectos toxicológico (toxicidade aguda) e farmacológico (potencial antidiabético), bem como realizar um estudo físico-

químico da droga utilizada na preparação do Glico-Vitae® e uma análise por cromatografia em camada delgada do produto acabado.

Material e métodos

Material vegetal e seu extrato bruto

Foram utilizados 1000 ml do extrato hidroalcoólico das folhas de carambola (*Averrhoa carambola* L.) Glico-Vitae® (GV), fornecido pela indústria de fitoterápicos Farmapec (lote nº 5009037, data de fabricação 13/07/00), localizada em Presidente Prudente, SP, Brasil. Esse extrato foi liofilizado, obtendo-se 158 g de um pó marrom, sendo armazenado a - 15°C em dessecador. As folhas de carambola utilizadas na preparação do GV foram fornecidas pela Farmapec.

Determinação do perfil cromatográfico do extrato GV (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) v/v/v.

Visualização

Visualização em câmara de UV, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Reveladores

Deteção de componentes de óleos essenciais (terpenóides, derivados de fenilpropanóides, fenóis, etc.)

Reagente de vanilina-ácido sulfúrico (VS)

Deteção de triterpenos, esteróides (saponinas e princípios amargos)

Reagente de Liebermann-Burchard (LB)

Deteção de aminoácidos e aminas biogénicas

Reagente de ninidrina (NIH)

Deteção de taninos

Reagente com cloreto férrico (FeCl₃) (FE)

Análise física e química em cinco amostras das folhas de carambola utilizada na preparação do GV

Determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido (Farmacopéia Brasileira, 1988)

Cinzas totais

Amostras de 3 g da droga vegetal pulverizada, exatamente pesadas, foram colocadas em cápsula de porcelana previamente calcinada. A cápsula mais a amostra foram incineradas, aumentando, gradualmente, a temperatura da mufla, ao máximo de 450°C, até a liberação total do carbono da amostra. O material foi resfriado e pesado.

Cinzas insolúveis em ácido

A cinza obtida foi fervida com 25 ml de ácido clorídrico a 10% e o precipitado foi recolhido em um papel de filtro isento de cinza e lavado com água quente. O papel de filtro mais o resíduo foram incinerados a uma temperatura de 800°C até peso constante.

Determinação do pH (Farmacopéia Brasileira, 1988)

Determinação da perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira, 1988)

Amostras de 2,0 g de droga vegetal triturada foram exatamente pesadas, em pesa-filtros previamente tarados, e colocadas em estufa por 2 horas, à temperatura de 105°C. Após resfriamento

em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 minutos. Esse procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

Determinação do teor de extrativos (Deutsches Arzneibuch, 1994)

Cerca de 1,0 g da droga vegetal pulverizada foi submetida à decocção com 100,0 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100,0 ml. A solução foi filtrada em papel de filtro, sendo os primeiros 20,0 ml desprezados. O restante do filtrado foi pesado (alíquota equivalente a 20,0 g), em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até secura em banho de água, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105°C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações, segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

TE = teor de extrativos (%; m/m);

g = massa de resíduo seco (g);

m = massa da amostra (g);

FD = fator de diluição (5).

Determinação do teor de resíduo seco (Deutsches Arzneibuch, 1994)

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa obtida na determinação do teor de extrativos foi pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até secura em banho de água, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 2 horas, à temperatura de aproximadamente 105°C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações.

Ensaio biológicos

Animais

Utilizamos duas espécies roedoras (ratos da linhagem Wistar e camundongos da linhagem Swiss) e uma espécie não roedora (cães sem raça definida). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Durante o período de aclimação, os animais permaneceram com livre acesso à água e à ração balanceada (Nuvital®), sendo a seguir submetidos a jejum de 24 horas. Dessa maneira, todos os animais encontravam-se em jejum no momento da administração da *Averrhoa carambola* L., visando evitar a interferência de alimentos presentes no trato gastrointestinal,

Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidro-alcoólico de *Averrhoa carambola* L. liofilizado empregando a via intragástrica

Extrato hidro-alcoólico de *Averrhoa carambola* L. liofilizado foi preparado de forma a alcançarmos a maior concentração possível em função da capacidade máxima de dissolução desse preparado em água (0,25 g/ml). Além disso, levando-se em conta o volume máximo a ser administrado pela via intragástrica em camundongos (0,5 ml), em ratos (1 ml) e em cães (40 ml), as doses administradas nessas três espécies foram, respectivamente: 3,5 g/kg, 1,14 g/kg e 1,14 g/kg.

Procedimento experimental em ratos e em camundongos

Os animais foram divididos nos grupos controle e experimental. O grupo controle recebeu água em volume equivalente ao máximo administrado ao grupo experimental, ou seja, 0,5 ml e 1 ml, respectivamente, para camundongos e para ratos; enquanto o grupo carambola recebeu extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L. nas doses de 3,5 g/kg e 1,14 g/kg, respectivamente, para camundongos e para ratos. Quatro horas após a administração de extrato aquoso de *Averrhoa carambola* (grupo experimental) ou de água (grupo controle), os animais foram decapitados para a coleta de sangue.

Procedimento experimental em cães

Precedendo a administração via intragástrica de extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L., na dose de 1,14 g/kg, o sangue foi coletado da veia radial. Quatro horas após a administração do extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L., uma segunda coleta de sangue foi realizada. Durante o intervalo entre as coletas, os animais permaneceram em observação.

Análises bioquímicas

A partir do sangue coletado nas três diferentes espécies investigadas, obteve-se, por centrifugação, o soro a partir do qual, realizamos dosagem de alanina aminotransferase (ALT), empregando kit da Labtest® e aspartato aminotransferase (AST), empregando espectrofotômetro (Bio-2000 Plus®) óptico; duas enzimas cuja elevação sérica constitui indicativo de hepatotoxicidade. Além disso, nas quatro horas subsequentes à administração de água (grupo controle) ou de extrato aquoso de *Averrhoa carambola* (grupo carambola), os animais foram observados quanto à possibilidade de ocorrência de morte ou de alterações comportamentais.

Avaliação da atividade anti-hiperlipemiciente

Empregamos ratos em jejum de 24 horas, que receberam, via intragástrica, água (grupo controle, CTR), amilose-1g/kg (grupo controle positivo, AM) ou AM + extrato liofilizado das folhas de carambola- Glico-Vitae® (GV) nas doses de 10, 30, 50, 100, 500 e 1000 mg/kg. Trinta minutos após a administração dessas substâncias, os animais foram decapitados e o sangue colhido para dosagem sérica de glicose pelo método da glicose oxidase (Bergmeyer e Bernt, 1974). Uma descrição mais detalhada desses experimentos encontra-se na legenda da Figura 1.

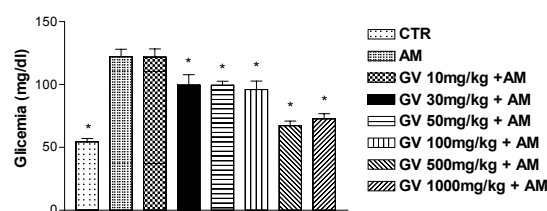


Figura 1. Efeito sobre a glicemia da administração, via intragástrica, de água (grupo controle, CTR) de 1 g/kg de amilose (grupo controle positivo, AM) ou de AM + extrato liofilizado Glico Vitae® (GV) nas doses de 10, 30, 50, 100, 500 e 1000 mg/Kg. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo AM.

Análise estatística

Os resultados do efeito do extrato liofilizado GV de *Averrhoa carambola* L. sobre os níveis séricos de ALT e AST e de glicose foram analisados pelo teste “t” de Student para amostras pareadas e não-pareadas, utilizando o programa Primer versão 1.0, prefixando-se o nível de significância em 95% ($p < 0,05$), sendo todos os valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Por outro lado, o método clássico de avaliação da DL 50 (Finney, 1952) não foi empregado, pelo fato de que não se observou ocorrência de morte.

Resultados e discussão

Os estudos de toxicidade aguda foram realizados empregando-se a via intragástrica, baseados no fato de que a *Averrhoa carambola* L. é consumida por humanos exclusivamente pela via oral. Como o fígado é, provavelmente, o órgão sujeito às maiores concentrações dos princípios ativos da *Averrhoa carambola* L., em função de sua administração pela via oral, decidimos acrescentar a avaliação sérica das enzimas AST e ALT, dois importantes indicadores de hepatotoxicidade.

O ensaio biológico da DL50 do extrato aquoso de *Averrhoa carambola*, via intragástrica, não revelou

ocorrência de mortes nas quatro horas que se seguiram à administração de uma dose de 3,5 g/kg, 1,14 g/kg e 1,14 g/kg, respectivamente, em ratos, em camundongos e em cães. Porém, não empregamos maiores doses em função de dois fatores limitantes: solubilidade da *Averrhoa carambola* em água e o máximo volume possível de ser administrado pela via intragástrica em cada espécie investigada. Além disso, não observamos ocorrência de convulsões, aumento ou diminuição da atividade motora, ptose palpebral, salivação, diarreia e outras alterações comportamentais. Além disso, como mostram as Tabelas 1 (camundongos), 2 (ratos) e 3 (cães), não ocorreu elevação sérica da ALT e da AST. Em resumo, além da ausência de morte, não observamos nenhum indicativo de toxicidade hepática aguda nas três espécies investigadas.

Tabela 1. Níveis sanguíneos de ALT (U/L) e de AST (U/L) quatro horas após a administração via intra-gástrica de 0,5 ml de água (grupo controle) ou de 3,5 g/kg do extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L. (grupo experimental) em camundongos da linhagem Swiss. Os resultados encontram-se como média $\pm$ erro padrão da média, sendo () o número de animais

	Grupo controle	Grupo experimental
ALT	56,6 $\pm$ 4,2 (11)	51,4 $\pm$ 3,5 (13)
AST	154,9 $\pm$ 10,3 (11)	167,8 $\pm$ 8,1 (13)

Tabela 2. Níveis sanguíneos de ALT (U/L) e de AST (U/L) quatro horas após a administração via intra-gástrica de 1,0 ml de água (grupo controle) ou de 1,14 g/kg do extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L. (grupo experimental) em ratos da linhagem Wistar em jejum (15 horas). Os resultados encontram-se como média $\pm$ erro padrão da média, sendo () o número de animais

	Grupo controle	Grupo experimental
ALT	49,6 $\pm$ 1,3 (10)	52,1 $\pm$ 3,4 (10)
AST	151,5 $\pm$ 6,1 (10)	133,9 $\pm$ 6,6 (10)

Tabela 3. Níveis sanguíneos de ALT (U/L) e de AST (U/L) quatro horas após a administração via intra-gástrica de 20 ml de água (grupo controle) ou de 1,14 g/kg do extrato aquoso de *Averrhoa carambola* L. (grupo experimental) em cães em jejum (15 horas). Os resultados encontram-se como média $\pm$ erro padrão da média, sendo () o número de animais

	Grupo controle	Grupo experimental
ALT	30,8 $\pm$ 0,2 (5)	33,0 $\pm$ 2,0 (5)
AST	26,7 $\pm$ 2,0 (5)	27,9 $\pm$ 1,5 (5)

Resultados semelhantes foram obtidos com o isosteviol, em nosso primeiro estudo de toxicidade aguda (Bazotte et al., 1986).

Estes resultados sugerem ausência de toxicidade aguda do extrato liofilizado de *Averrhoa carambola*, via intragástrica, principalmente se considerarmos que fornecemos uma dose equivalente à ingestão de 80-250 g para um homem de 70 kg. Como humanos ingerem extrato aquoso de *Averrhoa carambola* em

doses e volumes bem mais reduzidos, a possibilidade de observarmos a ocorrência de toxicidade aguda em nossa espécie é pouco provável. Por outro lado, com base na literatura (Neto et al., 1998; Chang et al., 2000), sugerimos que o produto seja contra-indicado a pacientes portadores de nefropatias.

A investigação da atividade anti-hiperglicemiante da *Averrhoa carambola* foi realizada em ratos Wistar, empregando a via intragástrica. O grupo controle recebeu água (CTR), enquanto o grupo controle positivo recebeu amilose. Neste ensaio, como esperado, o polissacarídeo amilose, que é degradado à glicose no trato gastrointestinal, promove significativa elevação da glicemia ($p < 0.05$). Porém, esse efeito hiperglicemiante da amilose é inibido pela administração concomitante do extrato GV a partir da dose de 30 mg/kg, sendo o efeito máximo alcançado com a dose de 500 mg/kg. Portanto, os resultados demonstram que o extrato GV apresenta efeito anti-hiperglicemiante.

A partir das folhas de carambola utilizadas na fabricação do Glico-Vitae®, foram realizados ensaios físicos e químicos (Tabela 4), servindo de parâmetros para uma padronização desse fitoterápico. A análise em cromatografia de camada delgada (Figuras 2 e 3) do Glico-Vitae®, utilizando-se como reveladores LB, FE, NIH e VS, indicaram a presença de taninos, aminoácidos, aminas biogênicas e uma quantidade majoritária de triterpenos, permitindo a padronização do GV.

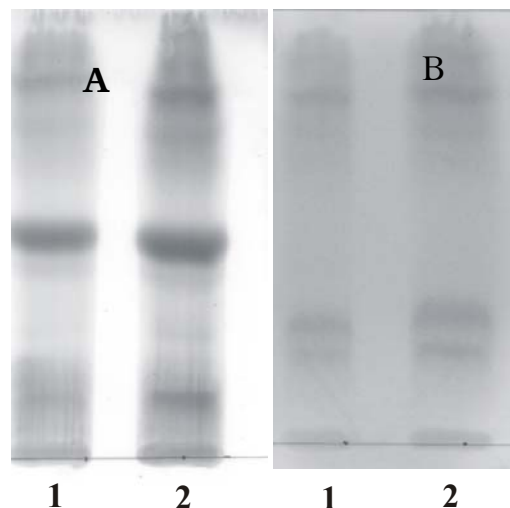
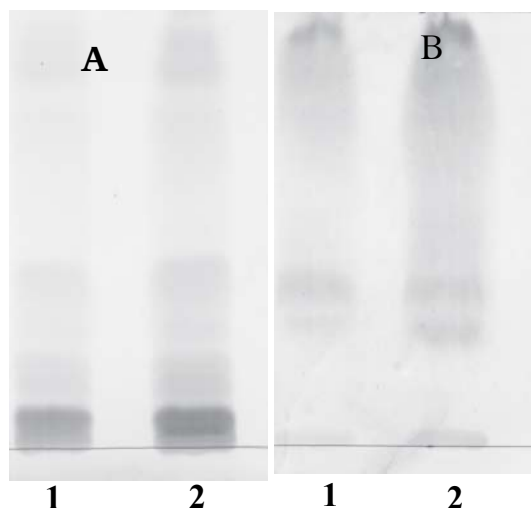


Figura 2. Análise em cromatografia de camada delgada. (1) 10 μ g do extrato (GV), (2) 20 μ g do extrato (GV), cromatogramas A: revelador :reagente de Liebermann-Burchard e B: revelador: reagente com cloreto férrico (FeCl_3)

Tabela 4. Análise física e química das folhas da *Averrhoa carambola* L

Determinação cinzas totais	8,57 %
Determinação cinzas insolúveis em ácido	1,85 %
Determinação do pH	6,4
Determinação da perda por dessecação	9,17 %
Determinação do teor de extrativos	31,57 %
Determinação do teor de resíduo seco	9,63 %

**Figura 3.** Análise em cromatografia de camada delgada. (1) 10 µg do extrato (GV), (2) 20 µg do extrato (GV), cromatogramas A: revelador :reagente de Ninidrina e B: revelador: reagente com vanilina/ácido sulfúrico

Agradecimentos

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

Referências

- ALVIM, N. R. *et al.* Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). *Acta Scientiarum*, Maringá, v.21, n.2, p.349-352, 1999.
- BAZOTTE, R. B. *et al.* Determinação da dose letal média (DL₅₀) do isosteviol em animais de laboratório. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v.29, n.4, p.711-722, 1986.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, A. Determination of glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Verlag Chemic Academic Press, 1974. p. 1205-1215.
- CHANG, J. M. *et al.* Fatal outcome after ingestion of star fruit (*Averrhoa carambola*) in uremic patients. *Am. J. Kidney. Dis.*, Philadelphia, v.35, n.2, p.189-193, 2000.
- CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 6 v, 1926.
- CURI, R. *et al.* Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adults humans. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.19, p. 771-774, 1986.
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FINNEY, D.J. *Statistical method in biological assay*. London: Charles Griffin & Co., 1952.
- NETO, M. M. *et al.* Intoxication by star fruit (*Averrhoa carambola*) in six dialysis patients *Nephrol. Dial. Transplant.*, Oxford, v.13, n.3, p.570-572, 1998.
- WAGNER, H. *et al.* *Plant drug analysis*. New York: Springer-Verlag, 1984.

Received on March 15, 2001.

Accepted on May 11, 2001.