



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALESSANDRA DA SILVA GUEDES

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS
ESPÉCIES MEDICINAIS *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia*
***bahiana* C. Muller**

Salvador, BA

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALESSANDRA DA SILVA GUEDES

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS
ESPÉCIES MEDICINAIS *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia*
***bahiana* C. Muller**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como parte do requisito para obtenção do título de mestre em Química Orgânica, na área de Produtos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra Jucení Pereira de Lima David

Salvador, BA

2009

Sistema de Bibliotecas da UFBA

Guedes, Alessandra da Silva.

Contribuição ao estudo farmacognóstico das espécies medicinais *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia bahiana* C. Muller / Alessandra da Silva Guedes. - 2013.

62 f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juceni Pereira de Lima David.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2009.

1. Plantas medicinais. 2. Fitoquímicos. 3. Antioxidantes. 4. Botânica - Morfologia.
I. David, Juceni Pereira de Lima. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD - 615.321
CDU - 633.88

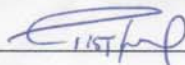
TERMO DE APROVAÇÃO

ALESSANDRA DA SILVA GUEDES

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DAS ESPÉCIES
MEDICINAIS *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia bahiana*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal



Doutorado em Farmacologia, Universidade de São Paulo (USP)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David



Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)

Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David – Orientadora



Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)

Universidade Federal da Bahia

Salvador, 11 de maio de 2009.

Dedico este estudo aos meus pais, sobrinhos, minha cunhada, meu irmão e Carleony, sempre disponíveis a ajudar, e principalmente pelas idas e vindas ao laboratório no final de semana e feriados. Em especial ao meu filho Alexandre pela sua existência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que é fiel, pela possibilidade de iniciar e finalizar mais uma tarefa.

A professora Dra Jucení David pela orientação e atenção dedicada na elaboração desse trabalho.

Ao professor Dr. Jorge David pelo incentivo e credibilidade.

A professora Dra. Cristiane pela boa vontade e participação na banca.

Aos mestres da Pós Graduação professores Jorge David e Sílvio Desterro pelos ensinamentos e oportunidade de ter convivido com mestres tão valorosos.

As professoras Edna Maura de Araújo, Eliete Bispo, Helna Soares, Lidércia Cavalcanti e Maria de Lourdes Santos, mestras inesquecíveis. Agradeço a amizade, atenção e todo o aprendizado adquirido.

Aos meus colegas de laboratório por toda a força que me deram durante esse período, Murilo, Marilena, Leandro, Marquinhos, Ademir, Edilene, Taís, Luciano e Cleiton.

Ao meu amigo Rafael Cajueiro pela inestimável ajuda.

Aos meus amigos Hugo Brandão e Milleno Dantas, sei que posso sempre contar com vocês.

Aos meus amigos, alunos e colegas da FTC.

Aos meus vizinhos Josefa e Altino, dona Iraíldes e Levi do CAPS pelo carinho e presteza na aquisição do biribiri.

A todos que colaboraram direta e indiretamente na concretização deste trabalho, com certeza sem a ajuda e compreensão de todos que nos cercam é impossível a realização de tamanha grandeza

Em especial

A Profa Dra Jucení David pela capacidade e conhecimento no âmbito da Farmacognosia e Química de Produtos Naturais, pela compreensão, tolerância e a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho é uma contribuição à pesquisa de plantas medicinais, e descreve o estudo farmacognóstico das espécies *Averrhoa bilimbi* e *Poirertia bahiana* no que diz respeito aos aspectos botânicos, fitoquímicos e à avaliação de atividade biológica. As folhas e frutos da espécie *A. bilimbi* foram caracterizados pelos aspectos morfoanatômicos, e apenas de seus frutos foram realizadas extrações com metanol, seguido de fracionamento para obtenção dos extratos brutos hexânico, clorofórmio e acetato de etila. Estes extratos foram avaliados quanto ao potencial citotóxico através do bioensaio com o microcrustáceo *Artemia salina*. Os extratos brutos clorofórmio e acetato de etila foram submetidos ao fracionamento e isolamento de substâncias através de técnicas cromatográficas. A identificação das substâncias isoladas foi realizada através de métodos espectroscópicos, tais como RMN de ^1H e ^{13}C . Para a espécie *P. bahiana*, o estudo envolveu a caracterização anatômica de suas folhas e obtenção de extratos brutos hexânico, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico através de técnicas cromatográficas. Os extratos obtidos foram avaliados quanto ao potencial citotóxico frente a *A. salina*, e a capacidade seqüestradora de radical livre, medida pelo método DPPH (2,2-difenilpicril-hidrazil). Os resultados apresentados no estudo farmacobotânico das espécies *A. bilimbi* e *P. bahiana* permitiram levantar características muito peculiares nos aspectos morfoanatômicos. A espécie *A. bilimbi* apresentou um elevado potencial citotóxico, evidenciado pela morte de 100% dos microcrustáceos em todos os extratos avaliados. A partir do fracionamento e isolamento das substâncias presentes nos extratos acetato de etila e clorofórmio da espécie *A. bilimbi* foram isoladas as substâncias $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glicopiranosil sitosterol}$ e $3,5\text{-dimetoxi-benzaldeído}$, até então não descritas para a espécie. Já a espécie *P. bahiana* apresentou apenas citotoxicidade nos extratos hexânico e clorofórmio, entretanto foi observada atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico, clorofórmio e acetato de etila através do teste com o DPPH, demonstrando ter potencial como fonte de substâncias antioxidantes.

Palavras Chave: Fitoquímica. Citotoxicidade. Antioxidante. Morfoanatomia. Plantas medicinais.

ABSTRACT

This work is a contribution to research on medicinal plants and describes the pharmacognostic study of the species *Averrhoa bilimbi* and *Poiretia bahiana* regarding to botanical and phytochemicals aspects and evaluation of biological activity. The leaves and fruits of the species *A. bilimbi* were characterized by morphoanatomical and only of its fruits extractions were performed with methanol, followed by fractionation to obtain crude extracts of hexane, chloroform and ethyl acetate. These extracts were evaluated for cytotoxic potential through bioassay with the brine shrimp *Artemia salina*. The extracts chloroformic and ethyl acetate were subjected to fractionation and isolation of substances by chromatographic techniques. The identification of the isolated compounds was performed by spectroscopic methods, such as $^1\text{H-NMR}$ and ^{13}C . For the specie *P. bahiana*, the study involved the anatomical characterization of its leaves and obtaining of extracts hexanic, chloroformic, ethyl acetate and hydroalcoholic by chromatographic techniques. The extracts were evaluated for their cytotoxic potential against *A. salina*, and free radical scavenging ability, as measured by DPPH (2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl). The results presented in the study pharmacobotanical of the species *A. bilimbi* and *P. bahiana* allowed to raise very peculiar characteristics in the morphoanatomical. The specie *A. bilimbi* showed a high cytotoxic potential, as evidenced by the death of 100% of microcrustaceans in all extracts evaluated. From the fractionation and isolation of the substances present in the extracts ethyl acetate and chloroform of *A. bilimbi* were isolated three substances $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glucopyranosyl sitosterol}$ and $3,5\text{-dimethoxy-benzaldehyde}$, until then not described for the specie. For the specie *P. bahiana* only showed cytotoxicity in the extracts hexanic and chloroformic, however it was observed antioxidant activity of hydroalcoholic extracts, chloroform and ethyl acetate through the test with DPPH, demonstrating that it has potential as a source of antioxidants.

Keywords: Phytochemistry. Cytotoxicity. Antioxidant. Morphoanatomy. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frutos da <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	19
Figura 2: Inflorescência da <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	19
Figura 3: Estruturas químicas das principais classes de flavonóides e compostos relacionados.....	21
Figura 4: Estruturas do ciclopentano-per-hidrofenantreno (1), triterpeno tetracíclico (2) e triterpeno pentacíclico (3).....	23
Figura 5: Constituintes identificados na espécie <i>A. bilimbi</i> : cianidina-3-O-glicosídeo (4), ácido nonanoico (5), (E)-2-nonenal (6), nonanal (7) e (Z)-3-hexenol (8).....	24
Figura 6: Constituintes químicos principais da espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i> : Galocatequina (9), Epigalocatequina-(4(β \rightarrow 8)- galocatequina R= (3-OH (10), Epigalocatequina- (4 β \rightarrow 8)- epigalocatequina R= α -OH (11) e epigalocatequina-(4 \rightarrow β 6) - epigalocatequina(12).....	27
Figura 7: Estrutura química da (-)-fisostigmina R= CH ₃	28
Figura 8: A estrutura química do dicumarol, uma cumarina dimérica.....	28
Figura 9: Constituintes químicos identificados na espécie <i>P. bahiana</i> : 7-metoxi-3',4'-metilenodioxiiisoflavona(13), 7,4'-dimetoxiiisoflavona(14), 7,3',4'-trimetoxiiisoflavona(15), 7,2',4',5'-tetrametoxiiisoflavona(16), 7,2'-dimetoxi-4',5'-metilenodioxiiisoflavona(17), 5-hidroxi-7,2',4',5'-tetrametoxiiisoflavona(18), Rotenona(19), 12 α -hidroxirotenona(20), p-amirina(21), Lupeol(22), Sitosterol(23), Estigmasterol(24), 2',4',5',-trimetoxi-7-O- β -D- glicopiranosilisoflavona(25), Prolina(26) e 3-O-metilchiroinositol(27).....	32
Figura 10: Estrutura de um rotenóide.....	33
Figura 11: Folhas e frutos de <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	38
Figura 12: Folha da espécie <i>Poiretia bahiana</i> C. Muller.....	39
Figura 13: Fluxograma de fracionamento dos extratos brutos de <i>P.bahiana</i> e <i>A. bilimbi</i>	40
Figura 14: Imagens das folhas e folíolos da espécie <i>A. bilimbi</i> L.....	46
Figura 15: Epiderme adaxial.....	47
Figura 16: Parede celular espessa.....	47
Figura 17: Epiderme abaxial com estômato paracítico.....	47
Figura 18: Mesófilo Dorsiventral.....	48
Figura 19: Tricoma Unicelular.....	48

Figura 20: Tricomas Pluricelulares	48
Figura 21: Cristais de Oxalato de Cálcio	49
Figura 22: Nervura.....	49
Figura 23: Representação da Nervura Plano convexa.....	49
Figura 24: Amido nas células parenquimáticas.....	50
Figura 25: Lipídeos na superfície foliar	50
Figura 26: Estômato anomocítico.....	51
Figura 27: Pêlo tector simples unicelular.....	51
Figura 28: Grãos de amido	51
Figura 29: Fruto seccionado transversalmente	53
Figura 30: Espectro de ^1H	53
Figura 31: Espectro de ^{13}C	54
Figura 32: Espectro de ^1H	55
Figura 33: Espectro de ^{13}C	55
Figura 34: Epiderme abaxial com estômatos anisocíticos.....	56
Figura 35: Mesófilo dorsiventral mostrando cavidade lisigena, feixe vasculares e estômato.....	57
Figura 36: Cavidade Lisigena.....	57
Figura 37: Nervura central	57
Figura 38: $3\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glicopiranosil sitosterol}$	67
Figura 39: 3,5 dimetoxi-benzaldeído	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de pirogalol.....	59
Gráfico 2: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hexânico de <i>P. bahiana</i>	59
Gráfico 3: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato clorofórmico de <i>P. bahiana</i>	60
Gráfico 4: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato acetato de etila de <i>P. bahiana</i> . ..	60
Gráfico 5: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hidroalcoólico de <i>P. bahiana</i>	61
Gráfico 6: Gráfico dos percentuais de seqüestro de radicais livres dos extratos de <i>P. bahiana</i> e os padrões quercetina e pirrolgalol pela metodologia do radical livre estável DPPH	61
Gráfico 7: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de ácido gálico e extrato hidroalcoólico de <i>P. bahiana</i>	62
Gráfico 8: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hidroalcoólico de <i>P. bahiana</i> . 62	
Gráfico 9: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de ácido gálico e extrato acetato de etila de <i>P. bahiana</i> . 63	
Gráfico 10: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato acetato de etila de <i>P. bahiana</i> . ..	63
Gráfico 11: Gráfico dos %SRL dos extratos acetato de etila (A) e hidroalcoólico (H) de <i>Poirertia bahiana</i> e dos padrões ácido gálico (G) e quercetina (Q) nas concentrações avaliadas.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de <i>A. bilimbi</i> pelo método com <i>Artemia salina</i>	52
Tabela 2: Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de <i>Poiretia bahiana</i> pelo método com <i>Artemia salina</i>	58

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
C	Carbono
CCD	Cromatografia de camada delgada
CHCl_3	Cloroformio
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DCM	Diclorometamo
DPPH	Difenilpicrilhidrazil
ED50	Dose efetiva para 50% da população
Ext.	Extrato
g	Gramma
H	Hidrogênio
Hex	Hexano
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
LC50	Concentração letal
MeOH	Metanol
mg	Miligramma
MHz.	Megahertz
ml	Mililitro
nm	Nanometro
O	Oxigênio
p.	Pagina
pH	Potencial hidrogeniônico
PPM	Parte por milhão
RMNde ¹ H	Ressonancia magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonancia magnética nuclear de carbono
s	Singleto
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Mg	Microgramma
uL	Microlitro
w	Watts
%	Porcentagem
%SRL	Porcentagem de radical livre seqüestrado
δ	Deslocamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Considerações sobre a família Oxalidaceae	17
1.1.1 O Gênero <i>Averrhoa</i>	18
1.1.2 A espécie <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	18
1.1.3 Química da espécie <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	19
1.1.3.1 Flavonóides.....	20
1.1.3.2 Antocianidinas	22
1.1.3.3 Saponinas.....	22
1.1.3.4 Esteróis e triterpenos	22
1.1.3.5 Constituintes previamente identificados na espécie <i>Averrhoa bilimbi</i> ..	24
1.1.4 Propriedade biológica descrita para a espécie <i>Averrhoa bilimbi</i>	25
1.2 Considerações acerca da Família Leguminosae.....	25
1.2.1 O gênero <i>Poiretia</i>	28
1.2.2 A espécie <i>Poiretia bahiana</i> C. Muller	29
1.2.3 Química da espécie <i>Poiretia bahiana</i> C. Muller	30
1.2.3.1 Isoflavonas.....	32
1.2.3.2 Rotenoides	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 Materiais e Métodos	35
3.2 Atividades biológicas das espécies <i>Averrhoa bilimbi</i> e <i>Poiretia bahiana</i>	38
3.2.1 Coleta e identificação do material.....	38
3.2A A Folhas e frutos <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	38
3.2.1.2 Folhas da espécie <i>Poiretia bahiana</i>	39
3.2.2 Preparo do material vegetal.....	39
3.2.3 Fracionamento do extrato metanólico.....	40
3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica	41
3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante da espécie <i>Poiretia bahiana</i>	42
3.2.5.1 Experimento DPPH	42

3.3 Isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie <i>Averrhoa bilimbi</i>	44
3.3.1 Extrato cloroformico	44
3.3.2 Extrato acetato de etila	44
3.4 Estudo farmacobotânico	44
3.4.1 Caracterização macromorfológica da espécie <i>Averrhoa bilimbi</i>	44
3.4.2 Caracterização micromorfológica das espécies <i>Averrhoa bilimbi</i> e <i>Poiretia bahiana</i>	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Espécie <i>Averrhoa bilimbi</i>	46
4.1.1 Estudo farmacobotânico.....	46
4.1.1.1 Caracterização macroscópica	46
4.1.1.2 Caracterização microscópica.....	46
4.1.1.2.1 Lamina foliar da <i>Averrhoa bilimbi</i>	46
4.1.1.2.2 Frutos da <i>Averrhoa bilimbi</i>	50
4.1.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto.....	52
4.1.3 Isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie <i>Averrhoa bilimbi</i>	53
4.1.3.1 Isolamento dos constituintes dos extratos bruto cloroformio e acetato de etila	53
4.1.3.1.1 Identificação dos constituintes	53
4.1.3.1.1.1 Determinação estrutural da substância 1.....	53
4.1.3.1.1.2 Determinação estrutural da substância 2.....	55
4.2 Espécie <i>Poiretia bahiana</i>	56
4.2.1 Caracterização microscópica.....	56
4.2.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto.....	58
4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante	59
4.2.3.1 Experimento DPPH	59
5. DISCUSSÃO	62
5.1 Espécie <i>Averrhoa bilimbi</i> L.....	62
5.1.1 Caracterização farmacobotânica	62
5.1.2 Avaliação citotóxica dos extratos	63
5.1.3 Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos.....	66

5.1.3.1 Identificação da substância 1	66
5.1.3.2 Identificação da substância 2.....	68
5.2 Espécie <i>Poiretia bahiana</i>	69
5.2.1 Caracterização micromorfológica	69
5.2.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto.....	69
5.2.3 Atividade antioxidante dos extratos brutos	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O homem ao longo dos tempos vem utilizando preparados vegetais para prevenir, atenuar ou até mesmo curar determinado estado patológico. Contudo, desde que o homem despertou para o uso de plantas medicinais, iniciou-se longo percurso de manuseio, adaptação e de modificação dos recursos naturais para o seu próprio benefício (DI STASI, 1995).

Registros antigos demonstram que esta prática data de épocas pretéritas, indicando a estreita relação com a história da humanidade. Na busca da cura, porém, o homem teve que aprender com o meio e com o comportamento dos animais, os quais, instintivamente, sabiam distinguir as plantas alimentícias ou medicinais, das plantas consideradas tóxicas. Entretanto, este aprendizado exigiu tempo, pois nem todos os homens estavam igualmente preparados para levar isto à prática. As guerras constantes e o êxodo de muitos povos contribuíram contra a adaptação dos homens ao seu habitat (ALONSO, J, 2003).

Diversas civilizações contribuíram para o uso sistemático das ervas medicinais, entre elas a egípcia, chinesa e grega; onde as espécies usadas terapêuticamente por estes povos, ainda hoje fazem parte do elenco medicinal entre as populações, a exemplo o alho, chá verde e sene. Contudo, o reconhecimento desta prática apenas ocorreu em meados da década de 80.

A Organização Mundial de Saúde diante do uso de plantas, por cerca de 80% da população mundial, reconheceu e aprovou a fitoterapia (terapêutica com plantas medicinais) como prática complementar e alternativa na década de 80 e exigiu dos órgãos competentes de cada país a criação de medidas regulatórias que obrigassem a indústria farmacêutica a testar a eficácia e o uso seguro de plantas no tratamento das doenças (ALONSO, J, 2003).

No Brasil, o uso de espécies medicinais pela população é grande, e este conhecimento vem sendo transmitido de uma geração para outra, porém estudos científicos integrados em diferentes áreas do conhecimento, confirmando o emprego das plantas medicinais, só passaram a ser realizados, a partir da década de 70. Atualmente apenas 10% das 550.000 espécies presentes na flora brasileira foram estudadas e destes apenas 3% foram caracterizados quimicamente, tendo suas propriedades reconhecidas terapêuticamente (DOURADO, R., 2006).

O estudo de plantas medicinais é uma ciência complexa, dependendo de muitas áreas de conhecimento, e conseqüentemente, profissionais especializados em diferentes partes do saber (DI STASI, 1995). Neste sentido, uma contribuição valiosa tem sido dada pela Farmacognosia ao estudar a composição e normas de qualidade de muitas espécies vegetais usadas tradicionalmente (CUNHA, A. P. 2005). Os estudos farmacognósticos permitem caracterizar fármacos de origem natural em aspectos de grande relevância como: botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos, grau de pureza, dentre outros.

Tendo em vista o valor de estudos farmacognósticos de espécies medicinais, somado à importância farmacológica das espécies *Averrhoa bilimbi* L. e *Poirertia bahiana* C. Muller para população e a escassez de estudos botânicos e químicos detalhados sobre estas, o presente trabalho objetivou a caracterização morfoanatômica, química e ensaios de atividade biológica de órgãos reprodutivos e vegetativos destas espécies.

1.1 Considerações sobre a família Oxalidaceae

A família *Oxalidaceae* compreende 6 gêneros e cerca de 950 espécies distribuídas largamente pelo mundo, em áreas tropicais e em regiões mais frias (LOURTEIG, 1983 apud MAIDANA, et al., 2005). As *Oxalidaceae* são plantas representadas por arbustos ou ervas, com folhas alternas, sub-opostas ou aparentemente basais, com ou sem estipulas. As Inflorescências (Figura 2, p.18) são axilares ou caulifloras, bífidas ou cimos umbelifloras, raramente flores solitárias. As flores são actinomorfas e hermafroditas. O fruto pode apresentar-se como cápsula com cinco lóbulos, cuja deiscência é loculicida, ou baga carnosa indeiscente. O cálice é persistente. Na família se destacam o gênero *Oxalis* por apresentar espécies exóticas como nativas com importância ornamental e comestível, e o gênero *Averrhoa* por suas espécies com frutos comestíveis (LOURTEIG, 1983 apud MAIDANA, et al., 2005)

1.1.1 O Gênero *Averrhoa*

O gênero *Averrhoa* abrange apenas duas espécies, *A. carambola* e *A. bilimbi*, que são bastante distribuídas e cultivadas nas regiões tropicais. Morfologicamente tais espécies são descritas como árvores, com folhas imparipenadas e frutos carnosos, do tipo baga, indeiscentes. Segundo Xavier e Sá (2001), o gênero *Averrhoa* é caracterizado quimicamente pela presença de C-glicosilflavonóides. Ambas as espécies presentes no gênero se destacam por suas propriedades medicinais. A *Averrhoa carambola* é empregada no Brasil como diurético, no tratamento de eczemas e como antiemética. Também foram descritas ações como emenagoga, galactogoga e vermífuga (MORTON, 1987apud ZAKARIAS et al, 2007). Enquanto que, a *Averrhoa bilimbi* apresentou propriedades hipoglicemiantes, antiperoxidativa de lipídeos, anti-teratogênica e antilipídicas, quando avaliada em ratos diabéticos (PUSHPARAJ et al., 2000).

1.1.2 A espécie *Averrhoa bilimbi* L.

A *A. bilimbi* L. é uma espécie comum na Ásia tropical, medindo até 15 metros de comprimento e 30 centímetros de largura. Tradicionalmente é utilizada pela população para tratar casos de reumatismo, hipertensão, diabetes, sífilis, febres, inflamações do reto, cólicas biliares, entre outras. Na Indonésia apresenta uma considerável utilização, pois é potente remédio usado para o tratamento da diabetes mellitus (PU-SHAPARAJ et al. 2001). As folhas (Figura 1, p.19), inflorescências (Figura 2, p.19) e frutos são usados na medicina popular e no preparo de vinhos, vinagres, picles e pratos na culinária hindu. Os frutos (Figura 1, p.19) contêm altas concentrações de vitamina C e ácido oxálico, e morfologicamente assemelham-se a pequenos pepinos de cor verde, com sabor caracteristicamente azedo (SOUZA, P. et al., 2008).

No Brasil a espécie foi introduzida pela região Amazônica, juntamente com a caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) e outras plantas de origem asiática. A *A. bilimbi* L. é conhecida popularmente como biribiri, bilimbi, bilimbino e limão-caiena nas regiões de cultivo, tais como, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Amazonas e Pará (LIMA et al, 2001).



Figura 1: Frutos da *Averrhoa bilimbi* L.



Figura 2: Inflorescência da *Averrhoa bilimbi* L.

1.1.3 Química da espécie *Averrhoa bilimbi* L.

Os constituintes químicos de *A. bilimbi* L. que já foram identificados incluem aminoácidos, ácido cítrico, cianidina-3-O-glucosídeo (Figura 5.4, p.24), fenóis, potássio, açúcares e vitamina A (GOH et al., 1995 apud TAN, B. K. H. et al., 2004). Foram também identificados flavonóides, saponinas e triterpenos nos extratos metanólico e clorofórmico do fruto, durante o experimento realizado para verificar a eficácia antimicrobiana dos mesmos (WAHAB, N. H. Bt. A. et al., 2009).

Pino et al. (2004), relataram a presença de nonanal (Figura 5.7, p.24), ácido nonanóico (Figura 5.5, p.24) e (E)-2-nonenal como constituintes importantes e típi-

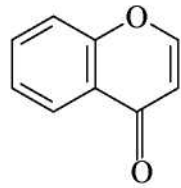
cos do óleo essencial extraído do fruto da *A. bilimibi* L., derivados provavelmente da oxidação lipídica. Os autores descrevem o (E)-2-nonenal (Figura 5.6, p.24) e o (Z)-3-hexenol (Figura 5.8, p.24) como componentes responsáveis pelo odor e cor do fruto respectivamente. O (Z)-3-hexenol é outro grande componente presente no óleo essencial. Sugerem também, ser a interação entre os ácidos nonanal, nonanóico, (E)-2-nonenal e (Z)-3-hexenol, a responsável pela complexidade do sabor do fruto.

Durante o estudo realizado com animais de experimentação para testar a propriedade antihiperlipidêmica da fração acetato de etila do extrato aquoso do fruto de *A. bilimbi* L. (AMBILI et al. 2009), foram identificados um triterpeno e um esteróide. O triterpenoide mostrou ser o responsável pela atividade antihiperlipidêmica.

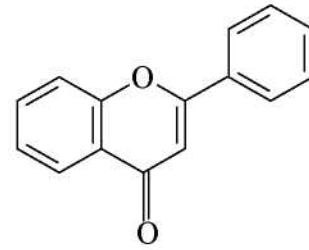
1.1.3.1 Flavonóides

Os flavonóides são moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal, estão presentes nas partes aéreas das plantas. Todos têm por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzoquinona). Os flavonóides incluem enorme grupo de moléculas que divergem em pequenas partes da sua estrutura básica, como observado na figura 3 (p.21) com os diferentes tipos de flavonóides.

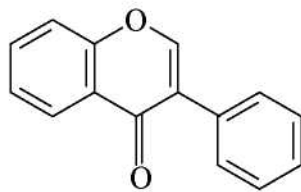
São conhecidos mais de 2000 flavonoides e sua nomenclatura deriva do latim flavus, que significa amarelo. Na natureza atuam na atração de agentes polinizadores, como co-pigmentos das antocianidinas (BRUNETON *et al.*, 1995), mas aparentemente, possuem também ação protetora às radiações, além de propriedades antioxidantes de proteção do metabolismo vegetal. Apresentam atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e antidiabéticas (BARNES, 2001 apud DOURADO, R.2006), o que torna essa classe de compostos de interesse para a indústria farmacêutica (HARBORNE, 1984 apud DOURADO, R.2006).



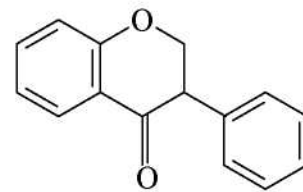
Benzo-γ-pirona



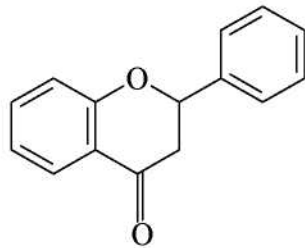
Flavona



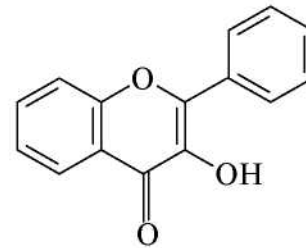
Isoflavona



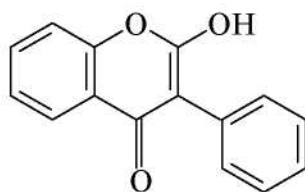
Isoflavanona



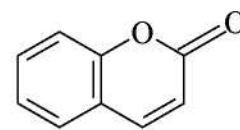
Flavanona



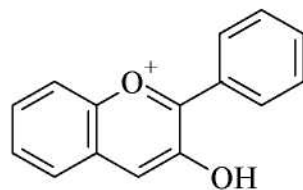
Flavonol



Isoflavonol



Cumarina



Antocianidina

Figura 3: Estruturas químicas das principais classes de flavonóides e compostos relacionados

1.1.3.2 Antocianidinas

O grupo de flavonóides que merece destaque, cuja nomenclatura é derivada do grego antho - flor, e kyannus - azul. São pigmentos encontrados na seiva e a cor do órgão é determinada pelo pH da seiva. O azul de determinadas flores e o vermelho das rosas pode ser devido ao glicosídeo das antocianidinas, as antocianinas, em pH diferente (GROSS, M. C. S, 2008). Suas principais características terapêuticas relacionam-se as suas propriedades vasoprotetoras e antioxidantes.

1.1.3.3 Saponinas

São compostos que se dissolvem em água produzindo muita espuma. Deriva deste fato o seu nome "saponina", por sua propriedade saponácea - como se produzisse sabão em referência sua capacidade espumante (GROSS, M. C. S, 2008). Quimicamente os saponósidos são heterosídeos, cujas geninas são esteróide ou triterpeno. Muitos dos saponósidos têm propriedades hemolíticas ao desorganizarem a membrana dos glóbulos vermelhos do sangue (CUNHA, A. P. 2005). Os saponósidos apresentam ainda atividades terapêuticas relacionadas às propriedades diuréticas, digestivas, antiespasmódica e como fonte de vitamina P(GROSS, M. C. S, 2008).

1.1.3.4 Esteróis e triterpenos

Os esteróis e triterpenos formam-se a partir do esqualeno, um hidrocarboneto com 30 átomos de carbono. Na natureza, tanto nos produtos naturais de origem vegetal como nos de origem animal, os esteróis e os triterpenos estão na base de numerosas moléculas dotadas de atividade. Destas, destaca-se dentro dos esteróis, os ácidos biliares, os cardiotônicos, os hormônios esteroidais, os fitoesteróis e os precursores das vitaminas D (colesterol e ergosterol). Enquanto que, os triterpenos são encontrados em muitos constituintes como, por exemplo, a quassina, uma lactona triterpenica, que se encontra, principalmente, no lenho da quassia (*Quassia amara* L.), arbusto do norte do Brasil e Guiana. Outros triterpenos, principalmente os deri-

vados triterpenicos pentacíclicos, são base em muitos saponosídeos existentes em drogas vegetais usadas em fitoterapia. Os esteróis têm como característica comum, a existência de núcleos que derivam do hidrocarboneto ciclopentano-per-hidrofenantreno (Figura 4, p.23). Os triterpenos podem ser tetracíclicos ou pentacíclicos, predominando estes últimos nas saponinas (CUNHA, A. P. 2005).

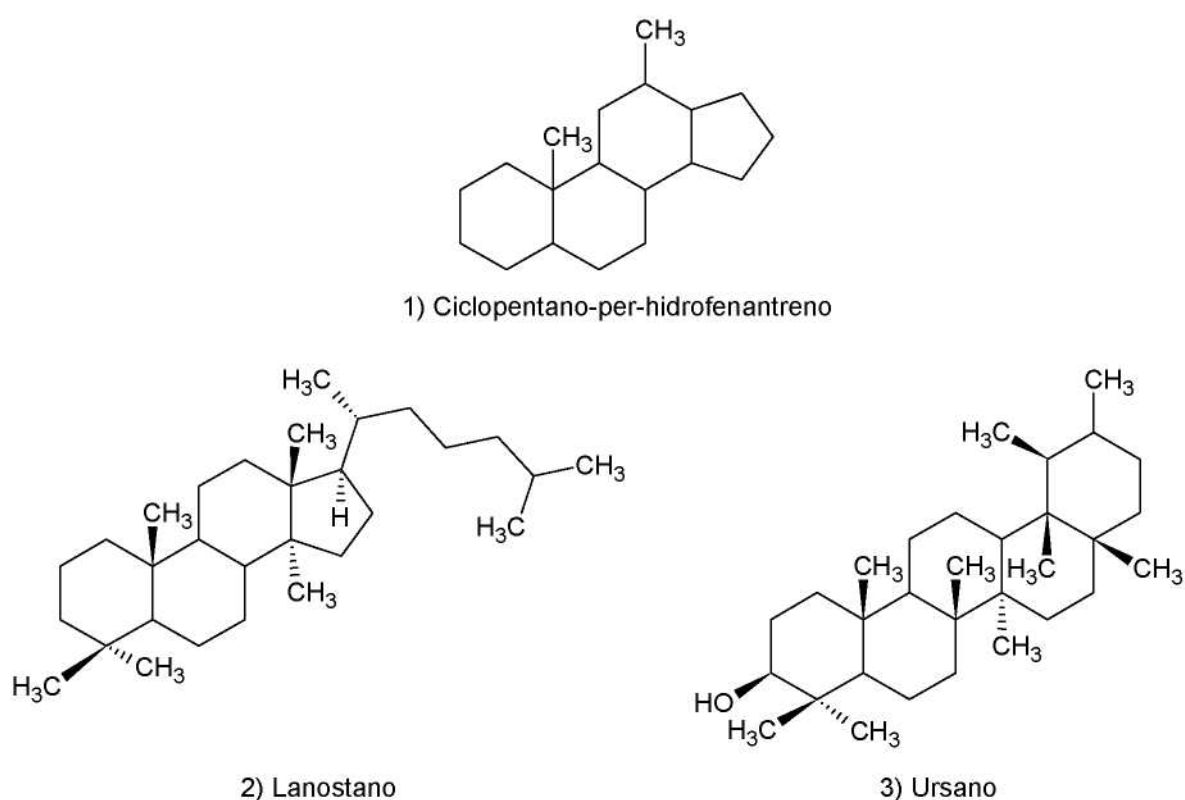
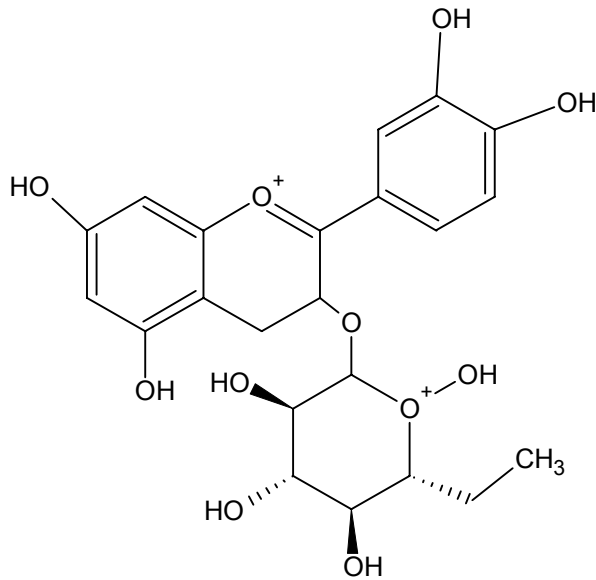
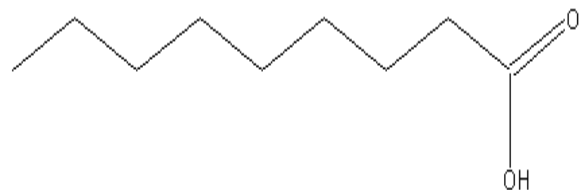


Figura 4: Estruturas do ciclopentao-per-hidrofenantreno (1), triterpeno tetracíclico (2) e triterpeno pentacíclico (3).

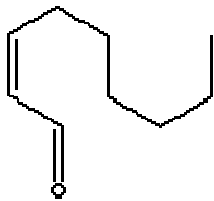
1.1.3.5 Constituintes previamente identificados na espécie *Averrhoa bilimbi* L.



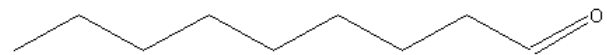
4) Cianidina - 3 - O- glicosídeo



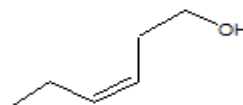
5) Ácido nonanoico



6) (E)-2-nonenal



7) Nonanal



8) (Z)-3-hexenol

Figura 5: Constituintes identificados na espécie *A. bilimbi*: cianidina-3-O-glicosídeo (4), ácido nonanoico (5), (E)-2-nonenal (6), nonanal (7) e (Z)-3-hexenol (8).

1.1.4 Propriedade biológica descrita para a espécie *Averrhoa bilimbi* L.

No estudo preliminar para identificação dos constituintes ativos e verificação da eficácia antimicrobiana do extrato, foi observada atividade contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Bacillus subtilis*, dos extratos clorofórmicos e metanólicos (WAHAB, N. H. Bt. A. et al., 2009). Também foi demonstrada atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *C. diphtheriae* e gram-negativas como: *S. typhi*, *C. fuendii*, *A. hydrophilla* e *P. vulgaris*, dos extratos clorofórmicos obtidos da folha e frutos (ZAKARIAS et al, 2007).

Pushaparaj et al, 2000 demonstraram a ação hipoglicemiante das folhas de *A. bilimbi* L. através de estudo com as frações semipurificadas do extrato em animais de experimentação diabetizados com estreptozotocina. As frações semipurificadas que apresentaram ação hipoglicemiante foram a aquosa e butanólica.

Foi observado que o uso de 125mg duas vezes ao dia, por duas semanas, do extrato etanólico das folhas do *A. bilimbi* L. produziram uma redução significativa na glicemia e lipídeos em ratos diabéticos (PUSHAPARAJ, et al., 2001).

1.2 Considerações acerca da Família Leguminosae

A família Leguminosae está presente em todos os seis continentes, possuindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies, sendo uma das maiores famílias de Angiospermas e uma das principais do ponto de vista econômico. No Brasil ocorrem aproximadamente 200 gêneros e 1500 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005).

Caracteristicamente, as espécies presentes nesta família apresentam-se como ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas ou escandentes, subarbus-tos, arbustos, arbustos eretos, sarmentosos ou escandentes, árvores de pequeno porte, médio ou grande porte, de sistema radicular bem desenvolvido, com predominância da raiz principal (BARROSO et al., 1991).

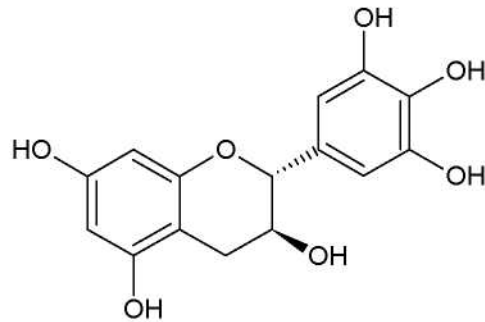
As principais espécies de Leguminosae utilizadas como medicinais são a *Stryphnodendron adstringens*, *Glycyrrhiza glabra*, *Melilotus officinalis*, *Physostigma venenosum*, entre outras (SIMÕES *et al.*, 2004).

A *Stryphnodendron adstringens* é usada no tratamento de úlceras varicosas (NETO, J. *et al.* 1996 apud GROSS, M. C. S.2005). Nas suas cascas foram identificadas catequinas e proantocianidinas dimerizadas: catequinas e bis-catequinas, entre elas os monômeros: galocatequina, epigalocatequina, 4'- O- metil-galocatequina e ésteres de epigalocatequina (Figura 6, p.27). Entre os dímeros encontram-se várias formas epímeras e o 5-desoxi-análogo de galocatequina, o robinetinidol (MELLO, *et al.* 1993, 1996a, 1996b, 1999 apud GROSS, M. C. S.2005)

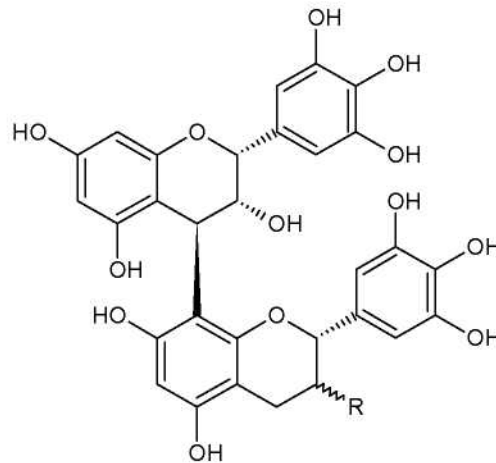
A *Glycyrrhiza glabra*, conhecida comumente como alcaçuz, é utilizada como expectorante comprovado, com propriedades mucolíticas e secretagógicas. As preparações de raiz de *Glycyrrhiza glabra* são também úteis como corretivos de sabor de medicamentos. A planta seca apresenta pelo menos 4% de glicirrizina, uma mistura de sais de potássio e de cálcio de ácido glicirrízico. A droga vegetal ainda apresenta os flavonóides liquiritina e isoliquiritina (SCHULZ, *et al.*, 2004).

A *Physostigma venenosum* é um cipó originário da África. A substância fisostigmina isolada desta espécie demonstrou atividade no tratamento do glaucoma. A (-)-fisostigmina (Figura 7, p.28), o éster fenólico do ácido N-metilcarbâmico, é o protótipo de inseticidas do tipo carbamatos, inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (SIMÕES *et al.*, 2004).

A espécie *Melilotus officinalis* é utilizada habitualmente no tratamento de enfermidades provocadas por insuficiência venosa crônica, em associação com a rutina. Também é usada no tratamento de sinais funcionais de crise hemorroidal. As espécies de trevo possuem o melilotosídeo (glicosídeo do ácido 2'-hidróxi-cinâmico) que ao sofrer hidrólise forma a cumarina (Figura 8, p.28), flavonóides derivados do campferol e da quercetina; saponósidos de geninas triterpênicas pentacíclicas; vários ácidos fenólicos (CUNHA, A. P. 2005). As leguminosas, denominação empregada às plantas pertencentes à Família Leguminosae, são divididas em três subfamílias, Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae (SOUZA & LORENZI, 2005).



9)Galocatequina



10)Epigalocatequina-(4 β → 8)- galocatequina R= β -OH
 11)Epigalocatequina-(4 β → 8)- epigalocatequina R= α -OH

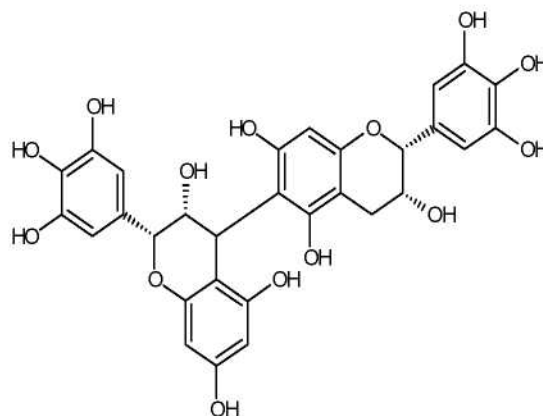
12) Epigalocatequina-(4 β → 6) - epigalocatequina

Figura 6: Constituintes químicos principais da espécie *Stryphnodendron adstringens*: Galocatequina (9), Epigalocatequina-(4 β → 8)- galocatequina R= β -OH (10), Epigalocatequina- (4 β → 8)- epigalocatequina R= α -OH (11) e epigalocatequina-(4 β → 6) - epigalocatequina(12).

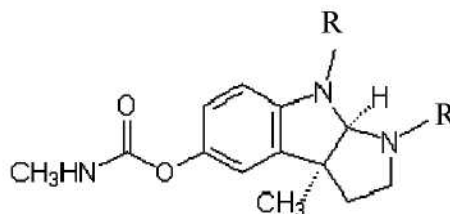


Figura 7: Estrutura química da (-)-fisostigmina R= CH₃

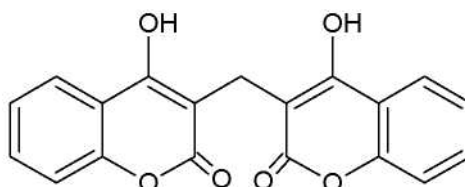


Figura 8: A estrutura química do dicumarol, uma cumarina dimérica

1.2.1 O gênero *Poiretia*

O gênero *Poiretia* compreende 12 espécies localizadas em regiões tropicais e subtropicais da América extra-andina, desde o México e Antilhas até Bueno Aires, existindo no Brasil todas as espécies. Porém, tais espécies são agrupadas em duas seções; a seção *Poiretia* Vent., constituída da espécie *P. punctata* e a seção *Virgata* C. Muller, representada pelas espécies *P. unifoliata*, *P. longipes*, *P. angustifolia*, *P. coriifolia*, *P. marginata*, *P. crenata*, *P. tetraphylla*, *P. mattogrossensis*, *P. elegans*, *P. latifolia* e *P. bahiana* (MYLLER, 1984 apud ARAÚJO, F. M. 2002)).

Três espécies do gênero *Poiretia* são indicadas na medicina tradicional, sendo as folhas as partes utilizadas. As folhas de *P. tetraphylla* são apontadas como tônico estomacal; as de *P. latifolia* têm emprego como aromatizantes para chimarrão e são afrodisíacas quando consumidas sob forma de infusão; e as de *P. bahiana* são usadas no combate a sinusite e hemorróidas e nas dores articulares (MYLLER, 1984 apud ARAÚJO, F. M. 2002).

A literatura fitoquímica das espécies pertencentes ao gênero *Poiretia* são escassas, e as poucas informações existentes são advindas do estudo farmacognóstico das espécies *P. latifolia* e *P. tetraphylla*, onde Silva, 2005, em seu estudo sobre os óleos voláteis e atividades biológicas da *P. latifolia* e *P. tetraphylla*, demonstrou ser as espécies ricas respectivamente no monoterpene carvona e o sesquiterpene nerolidol, componentes majoritários, já na *Poiretia bahiana*, foram identificados os constituintes majoritários, os monoterpene umbeliferona e sabineno através de

estudos realizados por Martins e Guaré Cruz, 2005 e Janke et al, 1988 apud Silva, C. P. 2005.

Na avaliação da atividade biológica, verificou-se que os óleos voláteis da *P. latifolia* foram moderadamente ativos contra fungos e apresentaram alta letalidade contra a *Artemia salina*. Já o óleo da *P. tetraphylla* não apresentou atividade antimicrobiana e a toxicidade foi inferior, em relação aos óleos voláteis da *P. latifolia*. do estudo dos óleos voláteis da espécie(SILVA, C. P. 2005)

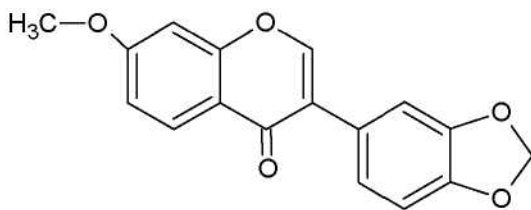
1.2.2 A espécie *Poiretia bahiana* C. Muller

Araújo, F. M. (2002), relata ser a *P. Bahiana* C. Muller, a única espécie do gênero a apresentar-se com um porte arbóreo ou subarboreo, alcançando em média cerca de 4 metros de altura. Descreve a inflorescência como paniculada terminal e axial. A inflorescência terminal é composta por dois racemos e a axial tem os racemos simples e sua antese ocorre entre julho e dezembro; as folhas são caracterizadas como: tetra-foliadas, com folíolos de consistência membranáceo-cartáceos, sendo os terminais maiores que os laterais. Morfologicamente define os folíolos terminais como obova-dos a amplamente depresso obovados, com ápice arredondado-mucronado ou retu-so mucronado e a base cuneada-aguda, já os folíolos laterais são arredondados a subarredondado-orbiculares com ápice arredondado e a base obtuso arredondado.

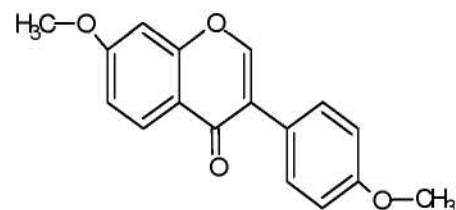
A *P. bahiana* C. Muller é encontrada exclusivamente nos campos rupestres da região de Serra Lençóis, no estado da Bahia. A população da Chapada Diamantina faz uso medicinal para tratamento e alívio da sinusite e dor de cabeça. Outro emprego relatado pela população é sua utilização como inseticida para pulgas (insetos da ordem Siphonaptera) e piolhos (insetos da ordem Anoplura, particular dos mamíferos) de cães e gatos.

1.2.3 Química da espécie *Poiretia bahiana* C. Muller

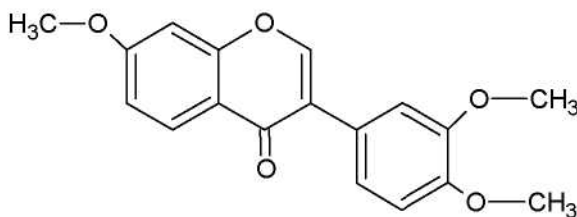
O estudo fitoquímico realizado por Araújo, F. M., 2002, identificou 15 metabólitos secundários nos extratos hexânico e metanólico da *P. Bahiana* C. Muller, entre eles: sete isoflavonas, duas rotenonas, dois esteróides, dois triterpenos e dois aminoácidos (Figura 9. p.32)



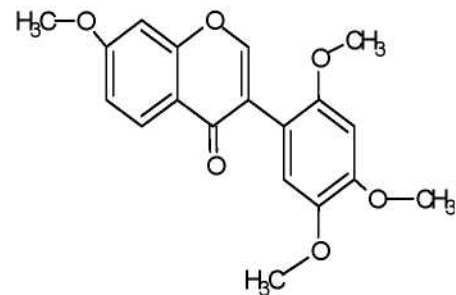
13) 7-metoxi-3',4'-metilenodioxisoflavona



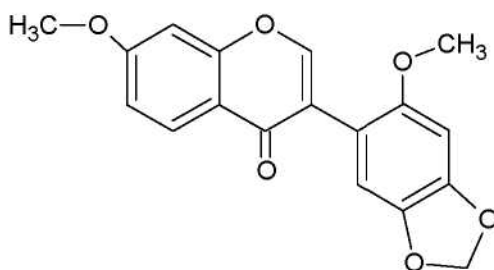
14) 7,4'-dimetoxisoflavona



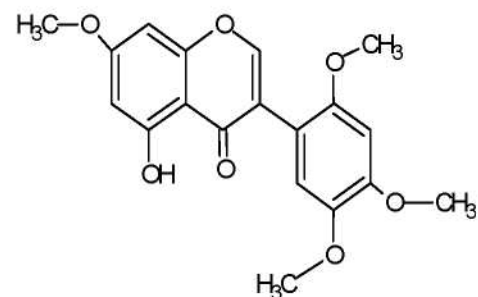
15) 7,3',4'-trimetoxisoflavona



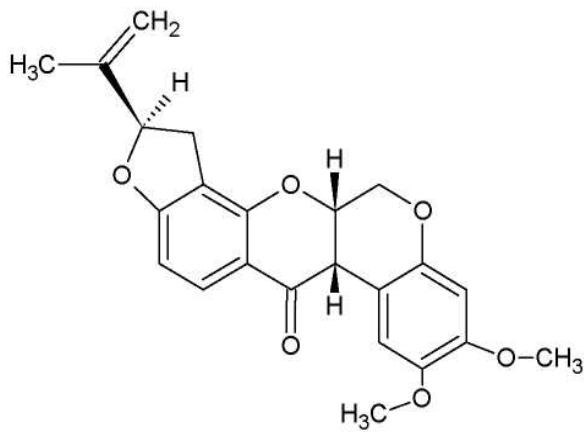
16) 7,2',4',5'-tetrametoxisoflavona



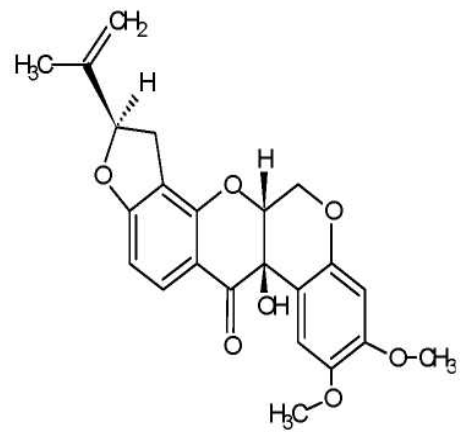
17) 7,2'-dimetoxi-4',5'-metilenodioxisoflavona



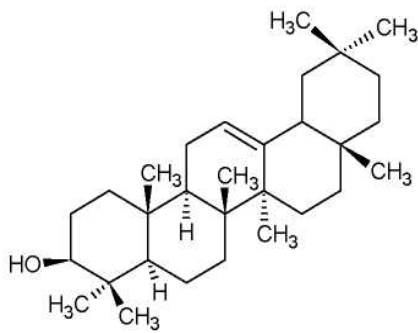
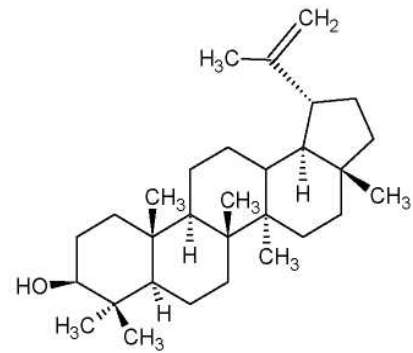
18) 5-hidroxi-7,2',4',5'-tetrametoxisoflavona



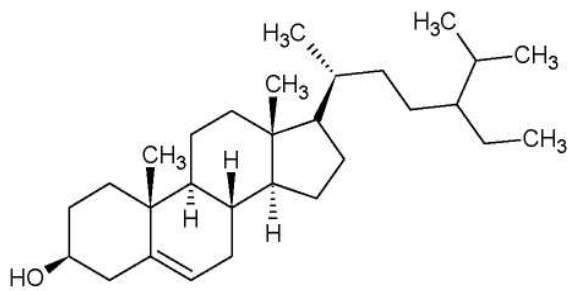
19) Rotenona



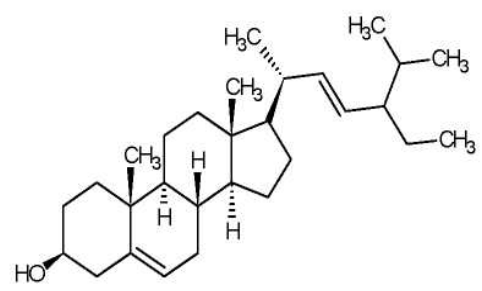
20) 12a-hidroxirotenona

21) β -amirina

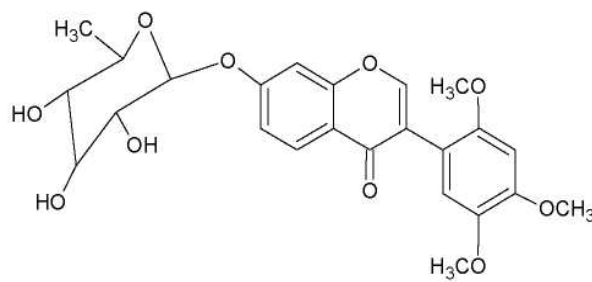
22) Lupeol



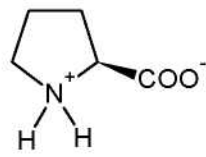
23) Sitosterol



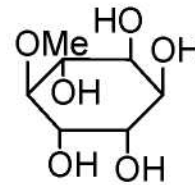
24) Estigmasterol



25) 2',4',5',-trimetoksi-7-0-p-D-glicopiranosilisoflavona



26) Prolina



27) 3-O-metilchiroinositol

Figura 9: Constituintes químicos identificados na espécie *P. bahiana*: 7-metoxi-3',4'- metilenodioxiiisoflavona(13), 7,4'-dimetoxiiisoflavona(14), 7,3',4'-trimetoxiiisoflavona(15), 7,2',4',5'-tetrametoxiiisoflavona(16), 7,2'-dimetoxi-4',5'-metilenodioxiiisoflavona(17), 5-hidroxi-7,2',4',5'-tetrametoxiiisoflavona(18), Rotenona(19), 12a-hidroxirotenona(20), p-amirina(21), Lupeol(22), Sitosterol(23), Estigmasterol(24), 2',4',5',-trimetoxi-7-O-p-D- glicopiranosilisoflavona(25), Prolina(26) e 3-O-metilchiroinositol(27)

1.2.3.1 Isoflavonas

As isoflavonas são isômeros das flavonas, compostos flavonoídicos que não possuem hidroxila ligada à posição três, mas apresentam um substituinte benzênico nesta posição. A ocorrência é muito restrita (subfamília Papilonoidea - Fabaceae), em relação à atividade fisiológica, são subdivididas em três grupos, compostos que mimetizam atividade estrogênica, compostos com atividade inseticida e fitoalexinas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981 apud DOURADO, R., 2006). A ação estrogênica ganhou mais destaque depois que estudos apontaram que as populações asiáticas apresentam menor incidência de sintomas do climatério, da menopausa, do câncer de mama, perda óssea e doenças cardiovasculares, em função de sua dieta rica em isoflavonas (GROSS, M. C. S, 2008).

1.2.3.2 Rotenoides

São compostos derivados das isoflavonas, apresentando um carbono suplementar (Figura 10, p. 33). Os rotenoides não possuem uma nomenclatura sistemática e são conhecidos freqüentemente por nomes triviais. Podem ser divididos em rotenoides, 12 hidroxirotenoides e di-hidro-rotenoides. A maior parte dos rotenoides possui um substituinte isoprenila (SIMÕES et al, 2004). Até o momento são conhecidos 60 rotenoides, que apresentaram atividades inseticidas, pesticidas, tendo sido

encontrados em plantas dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus*, *Amorpha*, *Milletia*, *Mundelea*, *Tephrosia*, *Dalbergia* e *Boerhavia* (SEIGLER, 1998 apud ARAÚJO, F. M. 2002)

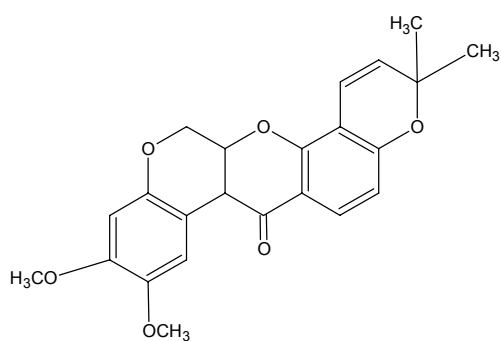


Figura 10: Estrutura de rotenóide

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo farmacognóstico dos órgãos vegetativos e reprodutivos das espécies medicinais *Averrhoa bilimbi* L. e *Poiretia bahiana* C. Muller.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o estudo farmacobotânico das folhas e frutos da espécie *Averrhoa bilimbi* L. e das folhas da espécie *Poiretia bahiana* C. Muller
- Verificar a citotoxicidade dos extratos brutos hexânicos, cloroformicos e acetato de etila
- Realizar o isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie *Averrhoa bilimbi* L.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Métodos

- O material seco foi triturado em um moinho de facas (tipo Wiley II).
- Para realização do estudo farmacobotânico os exemplares vegetais foram conservados no álcool a 70%.
- A caracterização macroscópica da lamina foliar foi realizada mediante observação dos aspectos macromorfológicos mais relevantes como: ápice, base, margem, forma e nervação das folhas.
- No estudo microscópico da lâmina foliar foram utilizadas folhas adultas sujeitas à iluminação plena e completamente desenvolvidas. Os cortes transversais da lâmina foliar foram feitos à mão livre, com o auxílio de lâmina cortante, e micrótomo na região mediana da nervura de primeira ordem, e do terço médio do limbo.
- Os cortes feitos à mão livre foram clarificados com hipoclorito de sódio a 50%, lavados com água acidulada em ácido acético a 10% e água destilada, corados com o corante Safrablau e montados em glicerina 50%. Na análise das epidermes em vista frontal foram realizados cortes paradérmicos das faces adaxial e abaxial.
- Para os testes histoquímicos do material cortado à mão livre foram utilizados cortes do material fresco, os quais foram submetidos aos reagentes específicos. Cutícula e gotículas de óleo foram observadas com Sudam III, amido foi evidenciado por lugol e material fenólico por cloreto férrico 10%.
- No material vegetal cortado com auxílio do micrótomo foi realizado um tratamento tecidual usando o processador de tecidos, modelo PT Mono 2000. Após o tratamento tecidual as folhas foram imersas em parafina permitindo o corte no micrótomo. Foi utilizado um micrótomo Leica, modelo RM 2125RT. Os cortes transversais e paradérmicos foram realizados com a espessura de respectivamente 5µm e 8µm e am-

Os tecidos foram corados com safrablau. O safrablau é um corante composto de azul de astra, que cora paredes celulósicas em azul e safranina que cora paredes lignificadas, suberizadas e cutinizadas em vermelho.

-Os dados micro morfológicos levantados foram obtidos a partir da visualização das lamínas confeccionadas através de microscópio eletrônico da marca OLIMPUS.

-As lamínas confeccionadas foram fotomicrografadas com auxílio de câmara digital da marca SONY.

- Os reagentes hexano, clorofórmio, diclorometano, metanol, acetato de etila, e acetona, utilizados nos procedimentos cromatográficos e na preparação dos extratos, foram das marcas MERCK e QUIMEX.

- A concentração dos extratos hexânicos, clorofômicos, acetato de etila, hidroalcoólico (metanol e água) e das frações obtidas foi realizada à pressão reduzida em rota evaporador de marca Büchi com temperaturas entre 40°C e 60°C.

- Nas separações cromatográficas em coluna foi utilizado gel de sílica 60 mesh da marca MERCK.

- Na cromatografia em camada delgada foi utilizado gel de sílica GF254 da MERCK. Onde as cromatoplasmas foram preparadas espalhando-se manualmente a suspensão de sílica em água destilada em placas de vidro. Depois de secas ao ar livre, as cromatoplasmas foram ativadas em estufa a 100° C, durante uma hora.

- Como reveladores usaram-se irradiações ultravioletas nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, câmara de iodo, reativo de Lieberman-burchard e cloreto de alumínio.

-Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais foram obtidos em espectrômetros Varian Gemini 300, operando com frequências de hidrogênio a 300MHz e do carbono 75 MHz.

- Os solventes empregados para dissolução das amostras na determinação dos Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais foram clorofórmio deuterado e piridina deuterada.
- No bioensaio para avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos foi utilizado cistos do microcrustaceo da espécie *Artemia salina* Leach e água do mar artificial preparada com sal marinho.
- Para os testes de atividade antioxidante calculados pelo seqüestro do radical estável difenilpicrilhidrazil (DPPH) foi utilizado espectrofotômetro operando com $A_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ e 517 nm , respectivamente, utilizando como reagentes padrões o DPPH, pirogallol e quercetina.

3.2 Atividades biológicas das espécies *A. bilimbi* L. e *P. bahiana* C. Muller

3.2.1 Coleta e identificação do material

3.2.1.1 Folhas e frutos *Averrhoa bilimbi* L.



Figura 11: Folhas e frutos de *Averrhoa bilimbi* L. (Foto Helna Soares)

Os frutos (Figura 11, p.38) foram obtidos no ano de 2004 na feira de S. Joaquim em Salvador -Bahia. As folhas foram coletadas nos municípios de Salvador e Camaçari. A espécie foi identificada no herbário Alexandre Leal Costa no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

3.2.1.2 Folhas da espécie *Poiretia bahiana* C. Muller



Figura 12: Folha da espécie *Poiretia bahiana* (Foto Rafael Cajueiro)

O material foi coletado nos dias 06/01/2007 e 07/01/2007 respectivamente às dezoito e às oito horas, na vila de Igatu, distrito de Andaraí, Rua do Brejo, próximo ao campo de futebol. Parte do material coletado foi levado ao herbário do Instituto de Biologia da UFBA onde foi identificado como *Poiretia bahiana* C.Muller., família Leguminosae, subfamília Faboideae.

3.2.2 Preparo do material vegetal

O material coletado para o estudo foi pesado perfazendo um total de aproximadamente 600g entre folhas da *Poiretia bahiana* C. Muller (Figura 12, p.39) e 11 kg de frutos da *Averrhoa bilimbi* L. Após a secagem, o material foi pulverizado e submetido à maceração em metanol, sendo macerado de 3-4 vezes em intervalos de 3 dias, protegido da iluminação. O extrato obtido foi filtrado em funil de colo longo com papel de filtro e concentrado em evaporador rotatório a 40°C.

3.2.3 Fracionamento do extrato metanólico

Os extratos brutos das folhas e frutos das espécies *Poiretia bahiana* C. Muller e *Averrhoa bilimbi* L., respectivamente, foram particionados com solventes de polaridade crescente, de acordo com o fluxograma representado na Figura 13 (p.40), obtendo-se os extratos brutos hexânicos, clorofórmicos e acetato de etila das espécies estudadas.

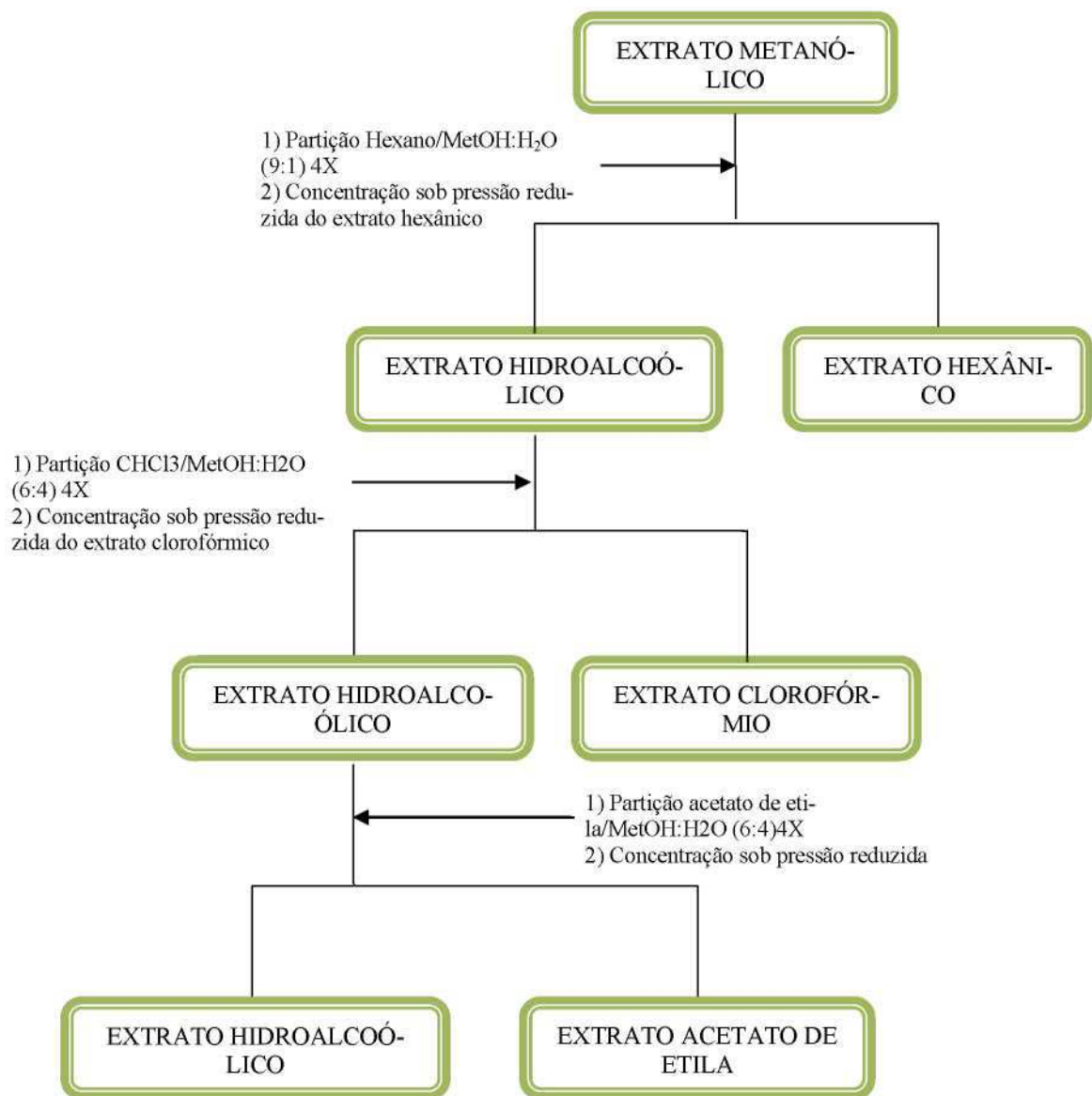


Figura 13: Fluxograma de fracionamento dos extratos brutos de *P.bahiana* e *A. bilimbi*

3.2.4 Avaliação da atividade citotóxica

Utilizando o método desenvolvido por David, J. P. et. al., (2001), os extratos das espécies *A. bilimbi* L. e *P. bahiana* C. Muller obtidos através da partição foram testados para avaliação da atividade citotóxica. Essa avaliação é realizada com naupliis (estágio larval) do micro crustáceo *Artemia salina*.

Os ovos de *Artemia salina* foram adquiridos em uma loja local de produtos para aquários. A água do mar artificial foi preparada com 3,5 litros de água sem cloro e 13,3 g do sal marinho também adquirido na mesma loja. Foi utilizada uma bomba comum de aquário para a oxigenação da água. Os ovos foram colocados na parte escura do aquário e eclodiram com apenas 24 horas, sendo então utilizados os nauplii (estágio larval do camarão) para os ensaios. O aquário foi dividido em dois compartimentos assimétricos com pequenas interligações entre eles. A parte maior foi iluminada com o auxílio de uma lâmpada incandescente de 60W, para que os nauplii recém eclodidos migrassem e pudessem ser recolhidos com maior facilidade. Dez camarões foram colocados em cada frasco com auxílio de pipeta Pasteur e para facilitar a visualização foram utilizadas lente de aumento e a iluminação fornecida pela lâmpada. Cada frasco teve seu volume completado para 5 ml de água do mar artificial, para que se pudesse chegar às concentrações, que foram previamente descritas aqui, em ug/ml do extrato em água do mar artificial. O branco foi preparado com também 10 camarões, mas somente em água do mar artificial. Todos os testes foram feitos em triplicata. Após 24 horas de incubação sob iluminação constante com a lâmpada incandescente, os camarões sobreviventes foram contados em todos os frascos, com auxílio da pipeta Pasteur e a porcentagem de mortos em cada dose foram determinadas como uma média aritmética dos valores encontrados nas três replicatas. Os naupliis foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação. Nos casos em que ocorreu morte no branco, os dados foram corrigidos usando a fórmula de Abbot: % mortos = $[\text{teste} - \text{branco} / \text{branco}] \times 100$.

Solução estoque

Foram dissolvidos 50 mg do extrato em 10 ml de MeOH. Uma alíquota dessa solução foi retirada e transferida para um frasco de 10 ml. Após a completa evapora-

ção do solvente nos frascos. Estes tiveram seus volumes completados para 5 ml com água do mar artificial. Abaixo se encontram relacionadas às alíquotas retiradas da solução estoque com a sua respectiva concentração após a evaporação do solvente e adição de 5ml de água do mar artificial, considerando que a concentração inicial obtida do extrato bruto em análise foi de 5mg/ml.

$$1\text{ml} = 1000\text{ug/ml}$$

$$0,5\text{ml} = 500\text{ ug/ml}$$

$$0,25\text{ ml} = 250\text{ ug/ml}$$

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante da espécie *Poiretia bahiana*

3.2.5.1 Experimento DPPH 1

O teste para avaliação da atividade antioxidante foi realizado pela metodologia do radical livre estável DPPH. Este teste foi usado com o intuito de avaliar a capacidade das amostras em seqüestrar o radical livre estável difenilpicrilhidrazil (DPPH). O DPPH possui coloração violeta bastante intensa e à medida que é reduzido por algum composto antioxidante, passa para a coloração amarelada.

A solução de DPPH foi preparada colocando 45mg de DPPH num balão volumétrico de 100 mL sendo o mesmo aferido com metanol. Essa solução foi armazenada em refrigerador à -4°C e envolta em papel laminado para protegê-la da luz. As amostras foram preparadas nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL em triplicata e solubilizadas em metanol. Para cada extrato foi preparada uma solução de 2 mg/mL, desta foram obtidas alíquotas das outras concentrações desejadas. Os padrões pirogalol e quercetina, foram tratados da mesma maneira para obtenção de soluções nas mesmas concentrações. Os controles foram preparados em triplicata.

A leitura foi realizada na faixa de 515 nm e o espectrofotômetro foi zerado com MeOH. Para cada 50 uL da amostra foi adicionado 3 mL da solução de DPPH seguida da leitura da absorbância nesse momento, determinando-se assim a absorbância no tempo zero. Após a leitura, a cubeta foi colocada em ambiente livre da luz e depois de trinta minutos as amostras foram lidas novamente determinando assim a absorbância no tempo de trinta minutos. Esse procedimento foi realizado para todas as amostras e controles. Com os valores da absorbância, foi determinada a média

das triplicatas de cada amostra em sua respectiva concentração. A média da absorvância de cada amostra na concentração de 2 mg/mL foi utilizada para calcular o percentual de seqüestro de radicais livres utilizando a seguinte fórmula:

$$\%SRL = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

Onde: %SRL: Seqüestro de radicais livres em percentual

Ac: Absorbância do controle Aam: Absorbância da amostra.

3.2.5.2 Experimento DPPH 2

Após avaliação do percentual de seqüestro de radicais livres, um novo teste utilizando DPPH foi realizado com os extratos hidroalcoólico e acetato de etila. Nesse teste a solução de DPPH foi preparada com 2,6 mg de DPPH em 100 mL de MeOH. As amostras e o padrão (quercetina) foram preparados nas concentrações de 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL. As soluções estoque de amostras e padrão foram preparadas na concentração de 4,0 mg/mL, que foi posteriormente diluída, permitindo o preparo das outras concentrações. As amostras e o padrão foram preparados em quadruplicata. Em cada cubeta foi colocada 50 uL de amostras nas concentrações citadas acima, adicionando 1,95 mL da solução de DPPH. Nesse teste não foram realizadas leituras no tempo zero, as leituras foram feitas após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente num lugar ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas a 515 nm. As médias das absorvâncias de cada amostra nas concentrações testadas foram utilizadas para calcular o percentual de seqüestro de radicais livres utilizando a equação citada acima.

3.3 Isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie *Averrhoa bilimbi* L.

3.3.1 Extrato clorofórmico

O extrato clorofórmico (24 g) dos frutos da *A. bilimbi* L. foi submetido à coluna cromatográfica filtrante em gel de sílica 60. A mistura DCM: Metanol foi utilizada como eluente em diferentes proporções e em gradiente de polaridade crescente. Foram obtidas 58 frações denominadas AbC-01 a AbC-58. Das frações obtidas AbC01-58, foi isolado a substância I da fração AbC-46, a qual demonstrou insolubilidade ao metanol, clorofórmio, acetona e hexano. A substância I foi identificada posteriormente através de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura

3.3.2 Extrato acetato de etila

O extrato acetato de etila (21,23g) dos frutos da *A. bilimbi* L. foi submetido à cromatografia filtrante em gel de sílica 60. O sistema de solventes constituído por DCM: Metanol em diferentes proporções e em gradiente de polaridade crescente foi utilizado como eluente, Foram obtidas 34 frações denominadas AbAc-01 a AbAc-34. Após análise em CCD das frações obtidas foram reunidas as frações similares. Da fração AbAc-03 foi isolado a substância II, a qual foi identificada posteriormente através de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura

3.4 Estudo farmacobotânico

3.4.1 Caracterização macromorfológica da espécie *Averrhoa bilimbi* L.

Para a caracterização macroscópica foi observada, a vista desarmada, as principais características macro morfológicas da lamina foliar da espécie *A. bilimbi* L. As características morfológicas levantadas foram obtidas a partir do procedimento descrito por Oliveira, F., et al. 2005. Os dados levantados foram comparados com informações descritas na literatura científica acerca da espécie *A. carambola*, já que a espécie estudada carece de informações sobre os seus aspectos botânicos..

3.4.2 Caracterização micromorfológica das espécies *A. bilimbi* L. e *P. bahiana* C. Muller

No estudo micro morfológico da lamina foliar das espécies *A. bilimbi* e *P. bahiana* C. Muller foram realizados cortes à mão livre com auxílio de lamina de barbear e com micrótomo de rotação respectivamente. Os cortes obtidos seguiram a orientação paradérmica para o estudo das epidermes, adaxial e abaxial, e transversal, a partir do qual foi possível observar o mesofilo foliar e nervura principal.

Os cortes obtidos à mão livre foram clarificados e lavados com água acidulada e destilada, posteriormente corados com o corante Safrablau e montados em laminas com glicerina a 50%. As laminas confeccionadas à mão livre e com auxílio do micrótomo foram observadas ao microscópio eletrônico e fotomicrografadas. Os aspectos anatômicos levantados seguiram as indicações descritas por Oliveira, F., et al. 2005.

No estudo micro morfológico do fruto da espécie *A. bilimbi* L. foi seguido o mesmo procedimento utilizado no estudo da lamina foliar de sua espécie, quanto à orientação e obtenção dos cortes, clareamento e lavagem do material seccionado. Porém, os cortes não foram submetidos à coloração.

Os cortes do material fresco das folhas e frutos da espécie *Averrhoa bilimbi* L. foram utilizados para realização dos testes histoquímicos. Foram utilizados os reativos sudan III, lugol e cloreto férrico a 10%. Laminas temporárias foram também preparadas e fotomicrografadas.

Na comparação dos aspectos micro morfológicos de *Poiretia bahiana* C. Muller foram utilizadas informações sobre alguns gêneros pertencentes a Família Leguminosae, em decorrência da escassez de informações acerca das espécies presentes no gênero *Poiretia*.

4. RESULTADOS

4.1 Espécie *Averrhoa bilimbi*

4.1.1 Estudo farmacobotânico

4.1.1.1 Caracterização macroscópica

As folhas compostas, alternadas, imparipenadas, herbáceas, medindo de 20 a 60 cm de comprimento. A folha (Figura 14.a, p.46) é constituída de 10 a 17 pares de folíolos. Os folíolos (Figura 14.b, p.46) apresentam superfície pilosa, formato elíptico, de borda inteira, ápice cuspidado (Figura 14.d, p.46), base obtusa (Figura 14.c, p.46) e nervação penínérvea. Cada folíolo na idade adulta tem em média 5-10 cm de comprimento.

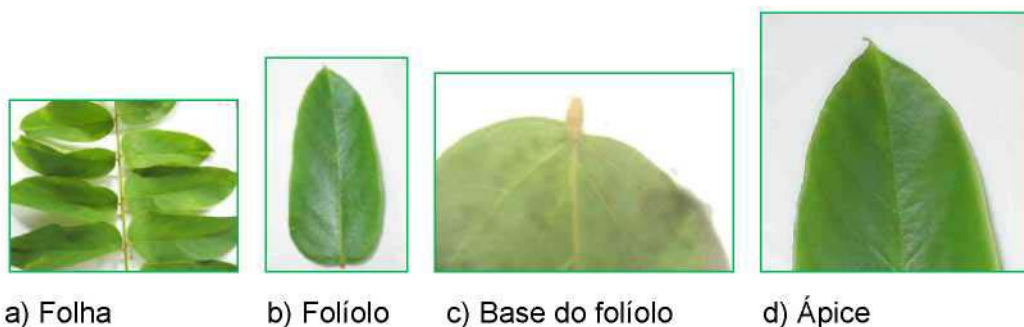


Figura 14: Imagens das folhas e folíolos da espécie *A. bilimbi*

4.1.1.2 Caracterização microscópica

4.1.1.2.1 Lamina foliar da *Averrhoa bilimbi* L.

A epiderme adaxial (Figura 15, p.47) tem células de contorno sinuoso e parede celular espessa (Figura 16, p.47). A epiderme abaxial possui células levemente sinuosas, contendo numerosos tricomas tectores (Figura 19 e 20, p.48), estômatos do tipo paracítico (Figura 17, p.47). O mesofilo é do tipo dorsiventral (Figura 18, p.48), hipoestomático, uma camada de células epidérmicas com cutícula espessa e sem estriações, parênquima paliçádico bisseriado e parênquima lacunoso irregular, de células curtas e quadrangulares. Os tricomas são tectores espessos e com inser-

ção abaixo da camada epidérmica, tocando o parênquima paliçádico. A nervura mediana é do tipo plano-convexa (Figura 23, p.49), colênquima angular abaixo da epiderme. Foi observada a presença de drusas e cristais prismáticos (Figura 21, p.49) por todo limbo foliar. Os testes histoquímicos revelaram a presença de compostos de lipídicos (Figura 25, p.50), compostos fenólicos e amido (Figura 24, p.50).

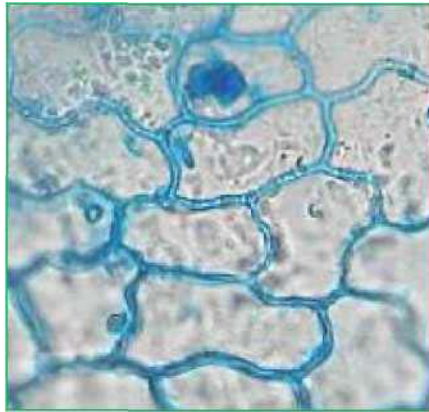


Figura 15: Epiderme adaxial

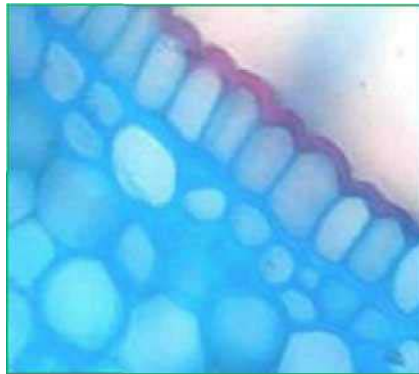


Figura 16: Parede celular espessa

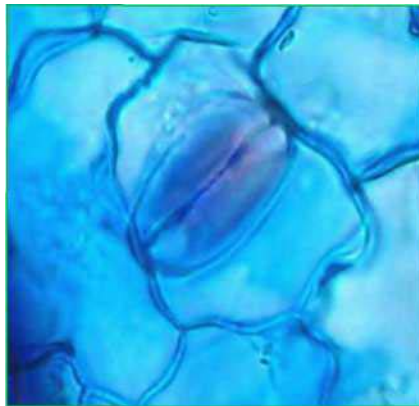


Figura 17: Epiderme abaxial com estômato paracítico



Figura 18: Mesófilo Dorsiventral



Figura 19: Tricoma Unicelular

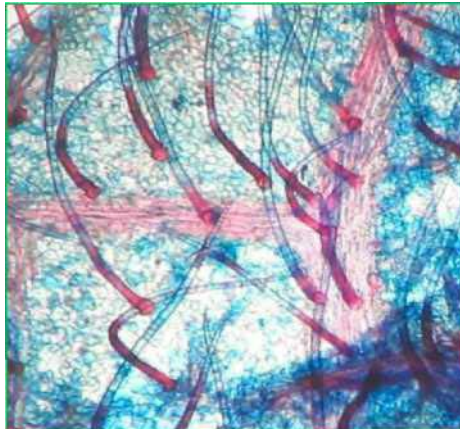


Figura 20: Tricomas Pluricelulares

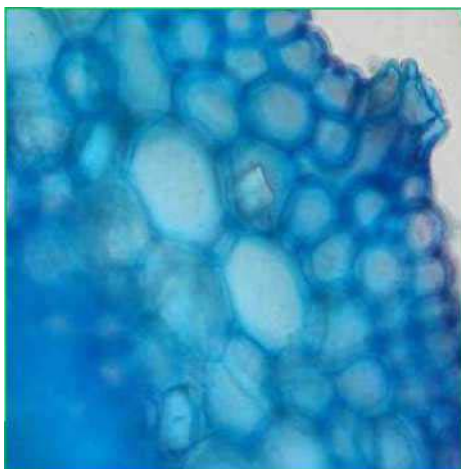


Figura 21: Cristais de Oxalato de Cálcio

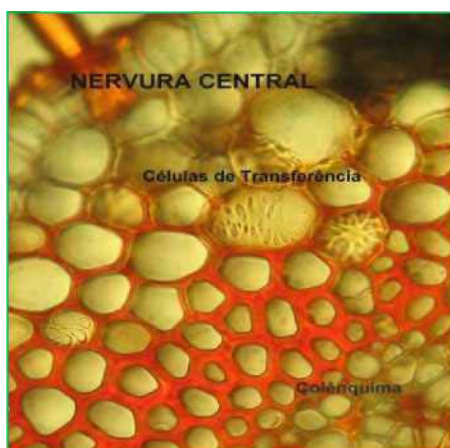


Figura 22: Nervura

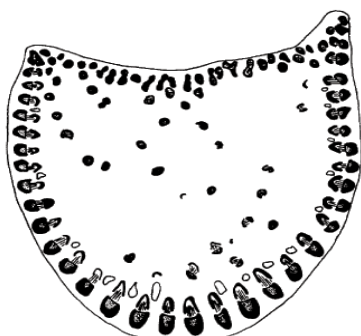


Figura 23: Representação da Nervura Plano-Convexa

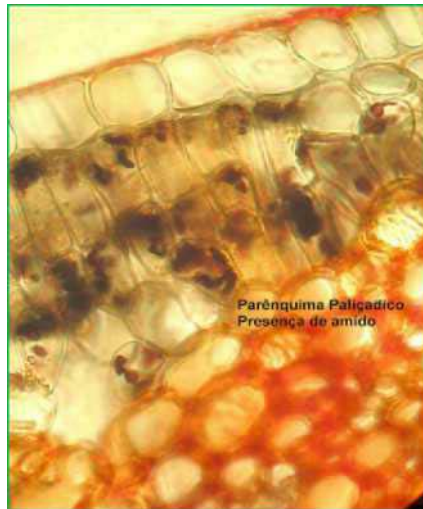


Figura 24: Amido nas células parenquimáticas

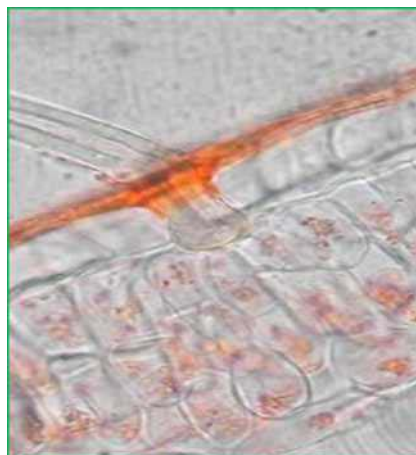


Figura 25: Lipídeos na superfície foliar

4.1.1.2.2 Frutos da *Averrhoa bilimbi*

Na análise microscópica da epiderme do fruto foi observada a presença de células de contorno poligonal com parede espessada, a existência de pêlos tectores simples unicelular (Figura 27, p.51) e glandular, e estômatos do tipo anomocítico (Figura 26, p.51). Nas células parenquimáticas foi verificada a presença de grão de amido (Figura 28, p.51). O fruto quanto ao aspecto transversal apresentou 5 lojas para implantação de sementes, de formato oval longitudinal (Figura 29, p.52).

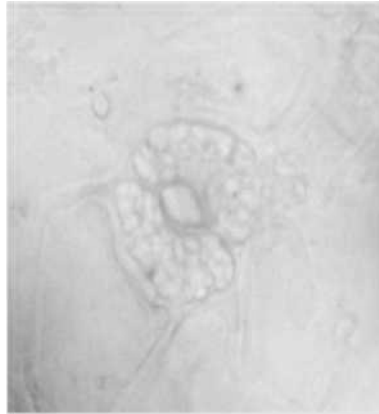


Figura 26: Estômato anomocítico



Figura 27: Pêlo tector simples unicelular



Figura 28: Grãos de amido

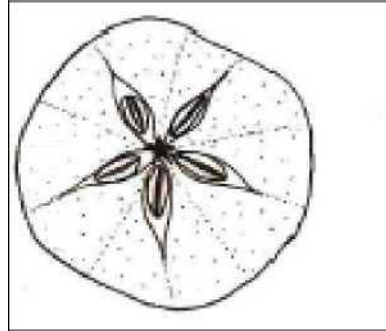


Figura 29: Fruto seccionado transversalmente

4.1.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto

Através do teste de citotoxicidade foi observada expressiva letalidade nos extratos Hexânico, CHCl_3 e AcOEt, onde foi verificada a morte total (100%) das larvas nas concentrações avaliadas (Tabela 1, p.52).

Tabela 1: Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de *A. bilimbi* pelo método com *Artemia salina*.

Amostras	Concentrações $\mu\text{g/ml}$	% de Vivos	% de Mortos
Ext. Acetato de etila	250		100
	500		100
	1000		100
Ext. Cloroformico	250		100
	500		100
	1000		100
Ext. Hexânico	250		100
	500		100
	1000		100
Controle		100	

4.1.3 Isolamento e identificação dos constituintes químicos da espécie *Averrhoa bilimbi* L.

4.1.3.1 Isolamento dos constituintes dos extratos bruto cloroformio e acetato de etila

A partir dos extratos clorofórmio e acetato de etila obtidos dos frutos da espécie *Averrhoa bilimbi* L., foram isoladas respectivamente as substâncias **1** e **2**.

4.1.3.1.1 Identificação dos constituintes

4.1.3.1.1.1 Determinação estrutural da substância 1

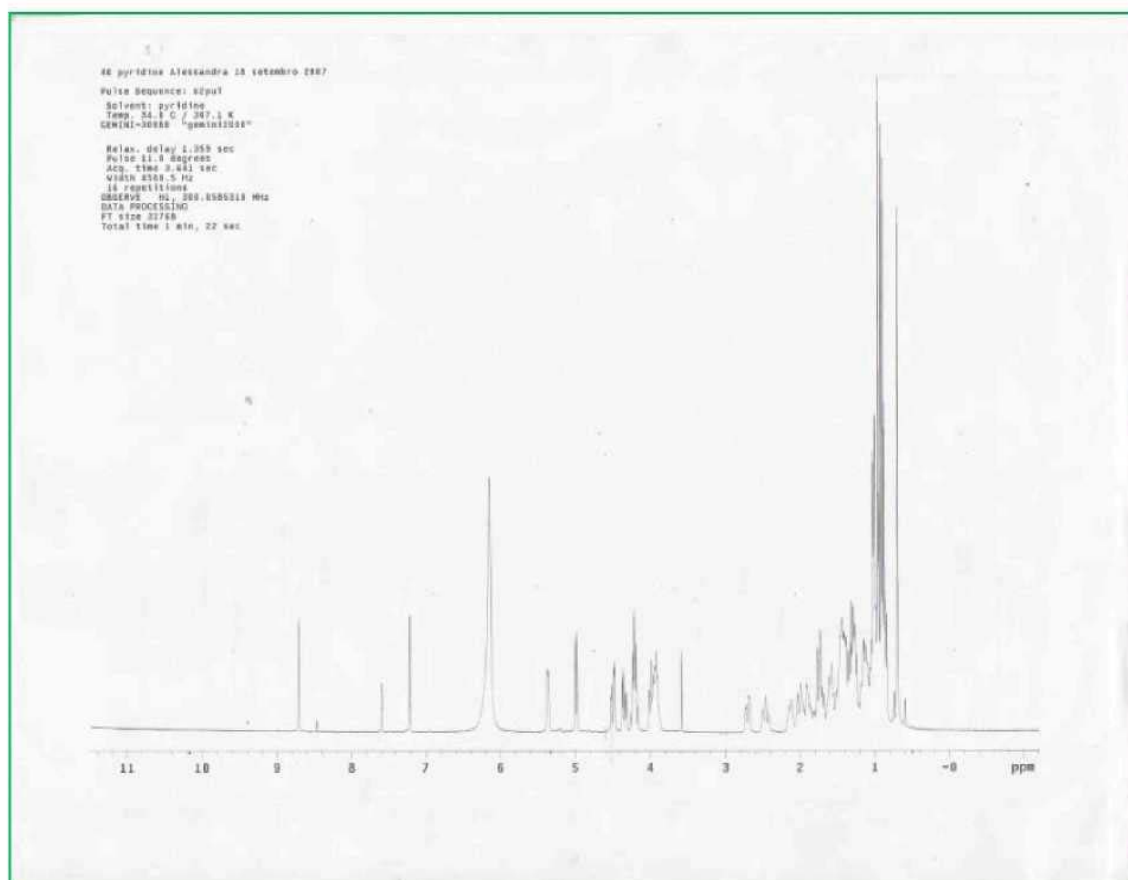


Figura 30: Espectro de RMN de ¹H [300MHz, Solvente Piridina]

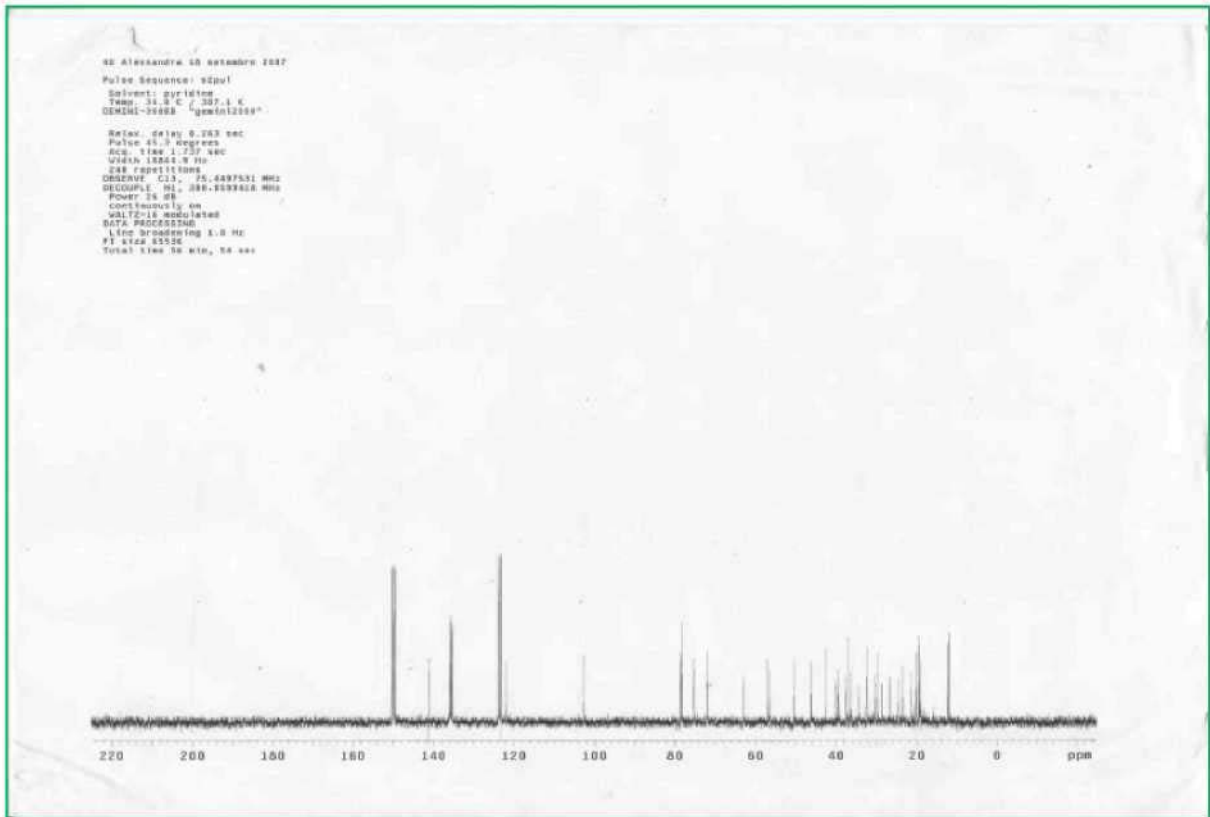


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C [300MHz, Solvente Piridina]

Ao analisar os espectros de RMN de ^1H (Figura 30, p.53) e ^{13}C (Figura 31, p.54) e comparar com dados da literatura, a substância 1 apresentou deslocamentos químicos e padrão de multiplicidades muito semelhantes àquele apresentado pelo β -sitosterol glicosilado (3 β -D-glicopiranosil sitosterol).

4.1.3.1.1.2 Determinação estrutural da substância 2

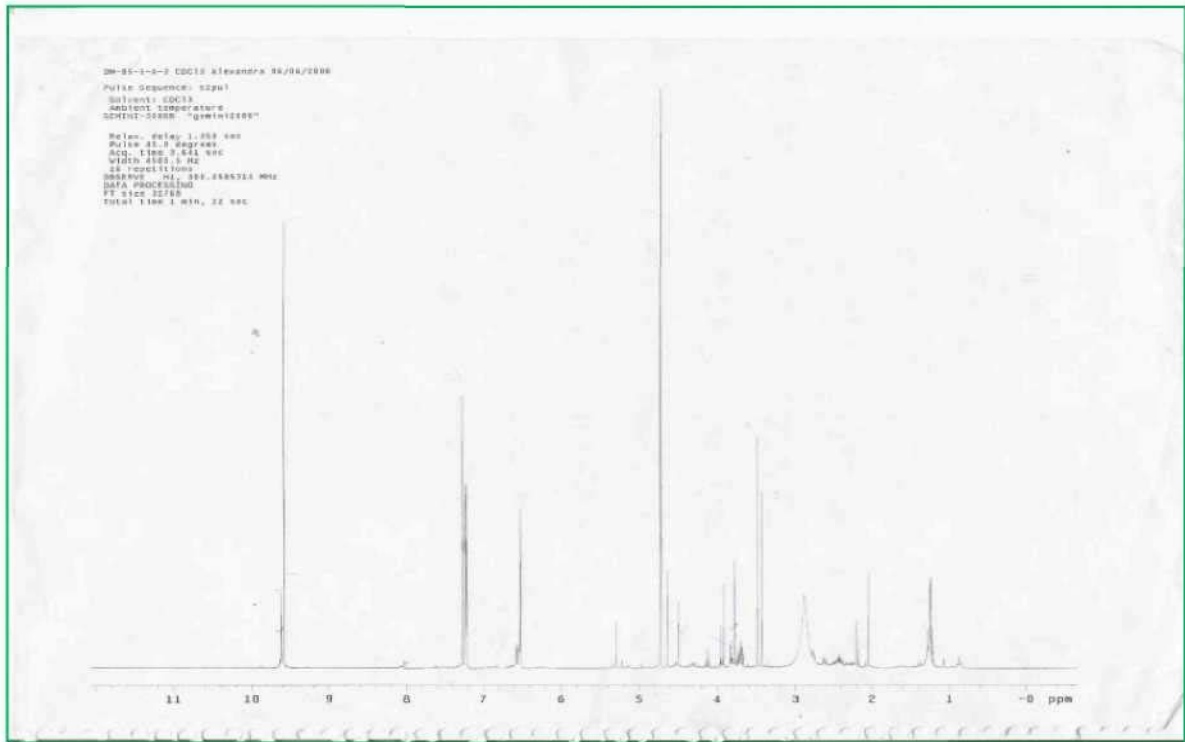


Figura 32: Espectro de RMN ^1H [300 MHz, Solvente CDCl_3]

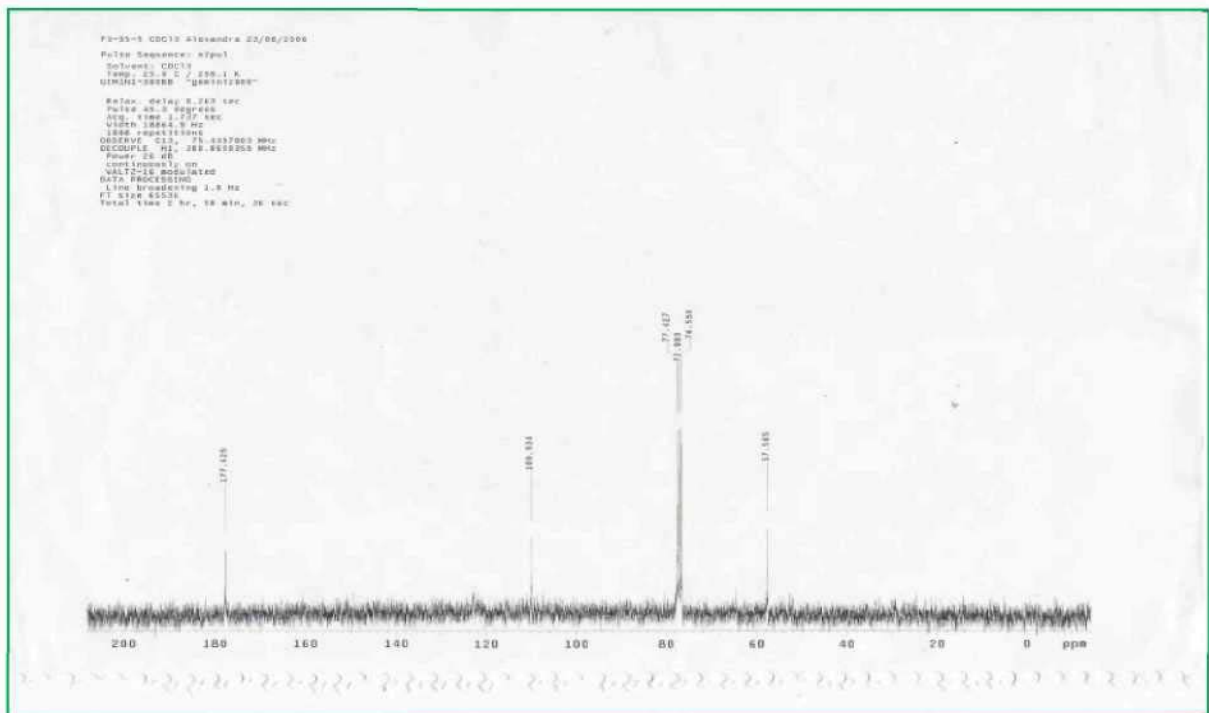


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C [300 MHz, Solvente CDCl_3]

Avaliando os espectros de RMN de ^1H (Figura 32, p.55) e ^{13}C (Figura 33, p.55) e comparando com dados da literatura a substância 2 apresentou padrão de multiplicidades e deslocamentos químicos muito semelhantes àquele apresentado pela molécula de 3,5 dimetoxi - benzaldeído.

4.2 Espécie *Poiretia bahiana* C. Muller

4.2.1 Caracterização microscópica

As fotografias das secções da folha de *P. Bahiana* C. Muller foram evidenciadas a presença de estômatos do tipo anisocítico com células subsidiárias sem forma definida (Figura 34, p.56). A epiderme das faces abaxial e adaxial são unisseriadas, no mesófilo, caracterizado como heterogêneo assimétrico, foram identificadas cavidades lisígenas portadoras de óleo (Figura 35, p.57). O sistema vascular presente na folha foi caracterizado como tipo colateral em arco aberto, na mesma figura (Figura 37, p.57), é possível observar o xilema com células de parede celular lignificadas em vermelho devido à safranina. A Figura 37 mostra a extensão da bainha de feixe revestindo um feixe vascular. A cavidade lisígena está em detalhe na Figura 36 (p. 57).



Figura 34: Epiderme abaxial com estômatos anisocíticos

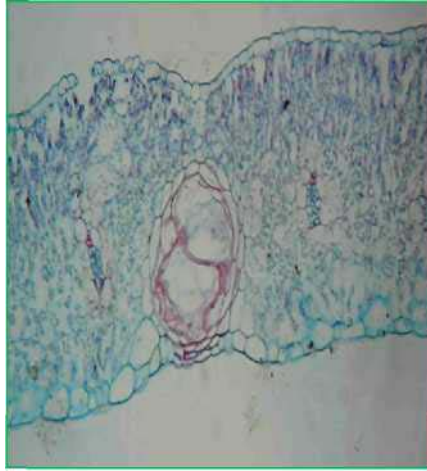


Figura 35: Mesófilo dorsiventral mostrando cavidade lisigena, feixe vasculares e estômato.

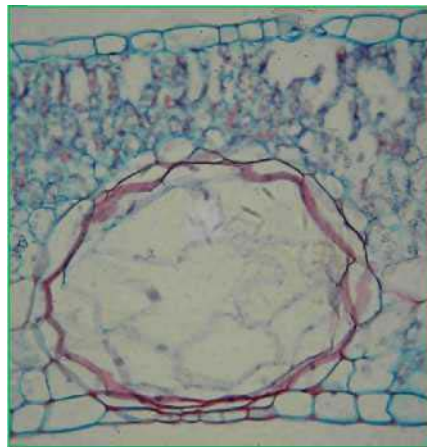


Figura 36: Cavidade Lisigena

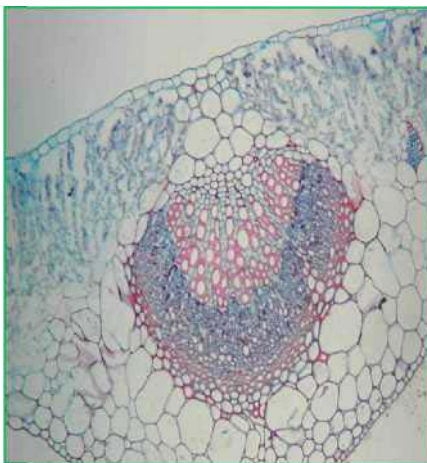


Figura 37: Nervura central

4.2.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto

O controle negativo preparado com água marinha artificial não apresentou inibição, permanecendo todos os naupliis vivos. O extrato acetato de etila não apresentou inibição nas concentrações avaliadas, todos os naupliis apresentaram movimento. Os extratos clorofórmico e hexânico apresentaram 100% de inibição em todas as concentrações avaliadas, os naupliis não apresentaram movimentos após 10 segundos de observação, sendo os mesmos considerados mortos (Tabela 2, p.58).

Tabela 2: Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de *Poiretia bahiana* pelo método com *Artemia salina*

Amostras Concentrações µg/ml	% de Vivos	% de Mortos
Ext. Hidroalcolico	100	100
	250	100
	500	100
Ext. Acetato de etila	100	100
	250	100
	500	100
Ext. Clorofórmico	100	100
	250	100
	500	100
Ext. Hexânico	100	100
	250	100
	500	100
Controle	100	

4.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.3.1 Experimento DPPH 1

Os resultados da atividade antioxidante pela metodologia do radical livre estável DPPH estão expressos nos gráficos abaixo.

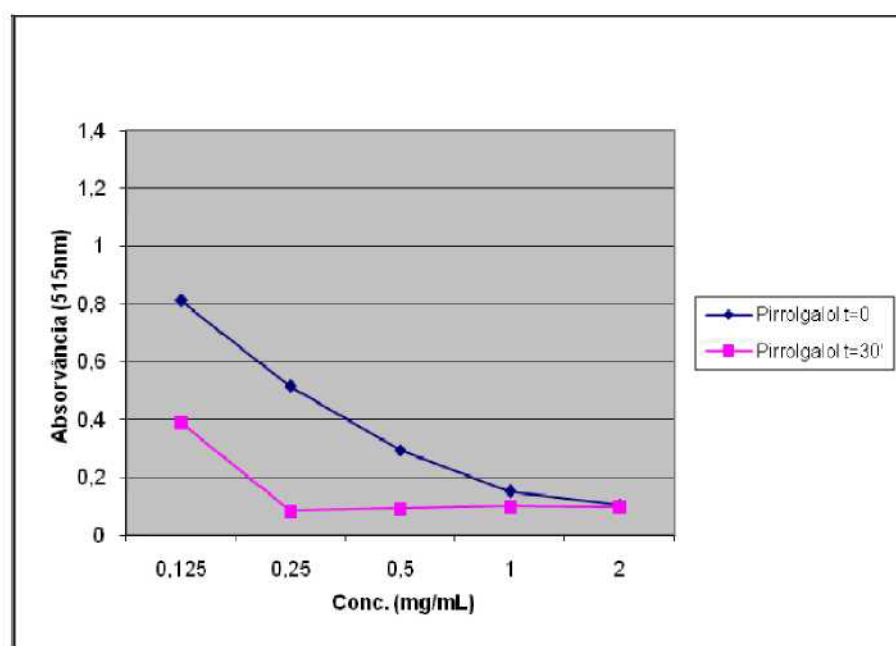


Gráfico 1: Absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de pirogalol.

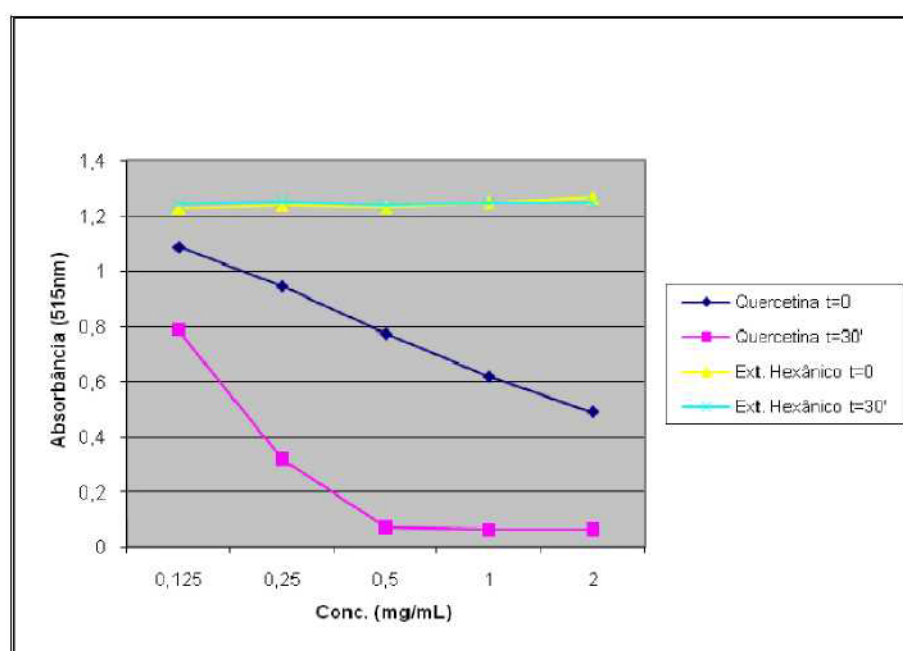


Gráfico 2: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hexânico de *P. bahiana*.

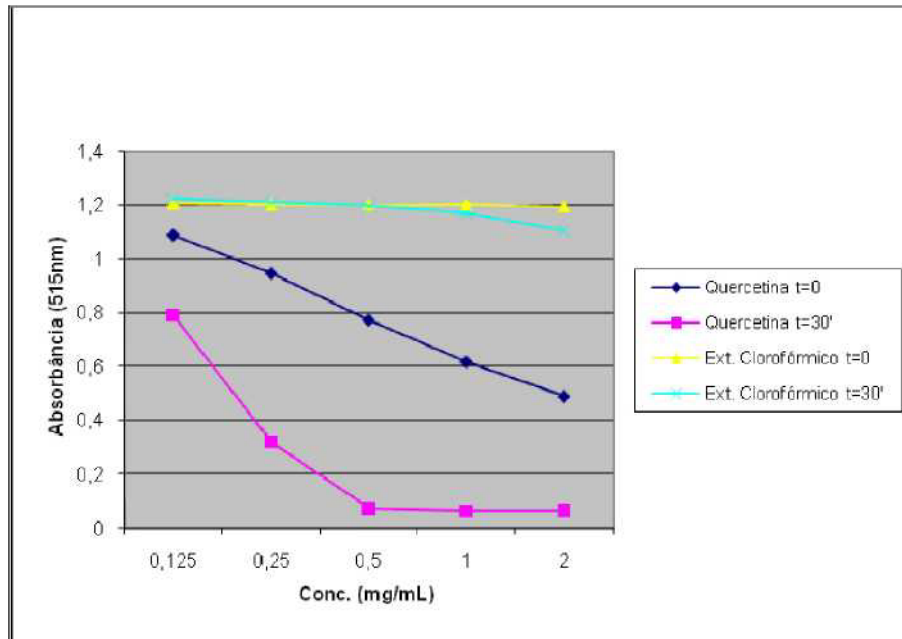


Gráfico 3: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato clorofórmico de *P. bahiana*.

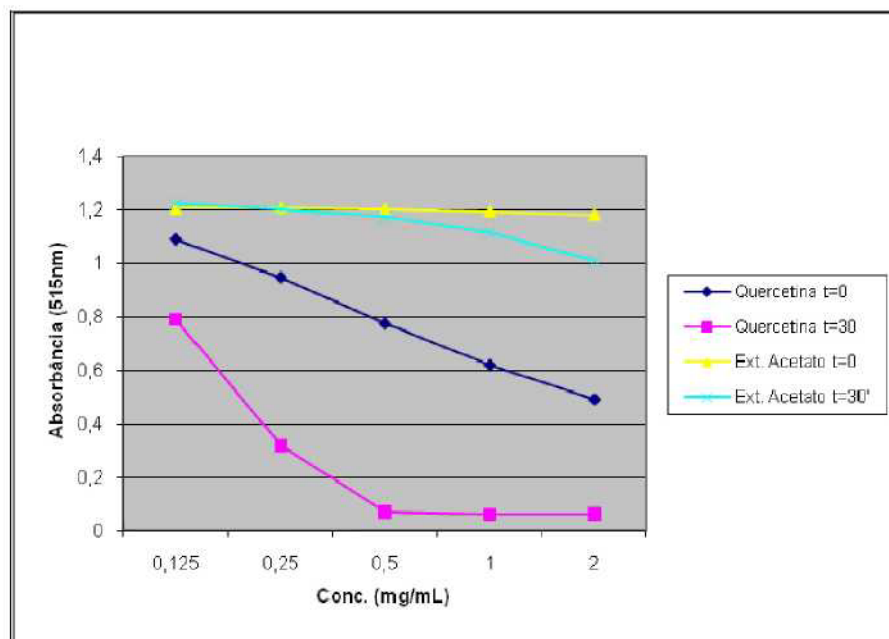


Gráfico 4: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato acetato de etila de *P. bahiana*.

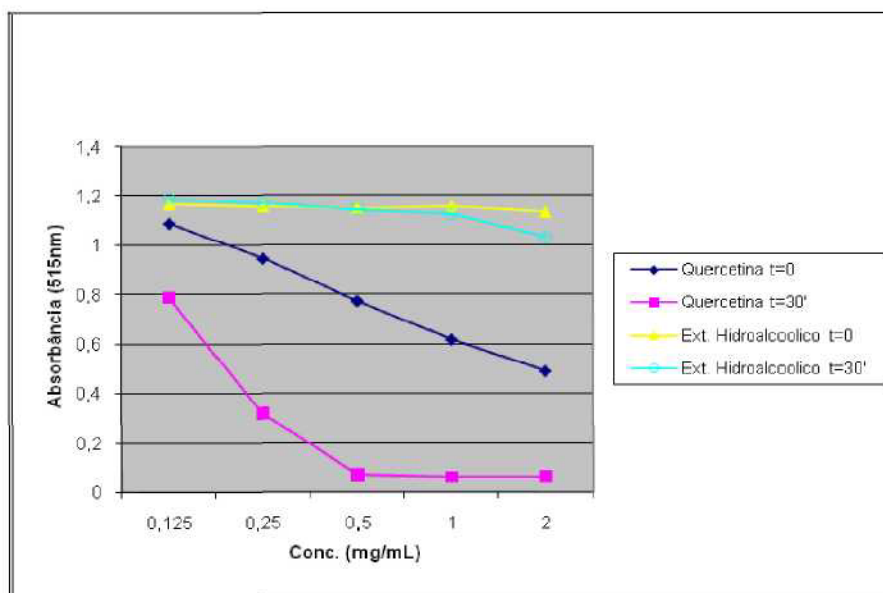


Gráfico 5: Gráfico comparativo da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hidroalcoólico de *P. bahiana*.

A partir dos resultados da absorbância foram calculados os percentuais de seqüestro de radicais livres. Utilizou-se a média dos valores de absorbância na concentração de 2mg/mL após trinta minutos de incubação. O gráfico a seguir expressa os valores encontrados.

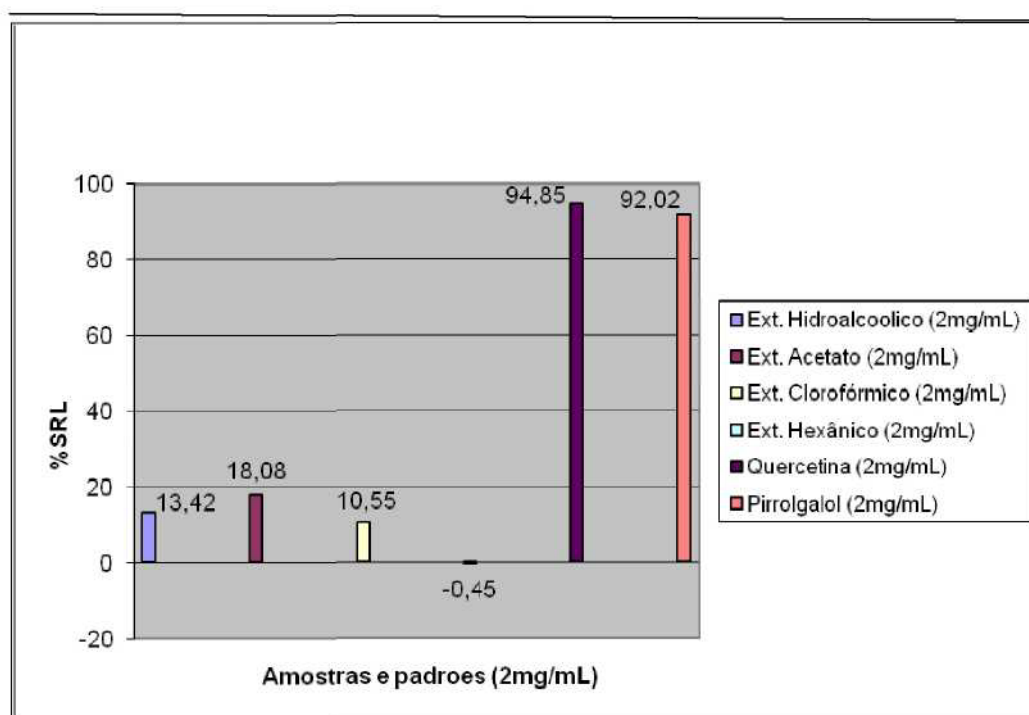


Gráfico 6: Gráfico dos percentuais de seqüestro de radicais livres dos extratos de *P. bahiana* e os padrões quercetina e pirrolgalol pela metodologia do radical livre estável DPPH.

4.2.3.2 Experimento DPPH 2

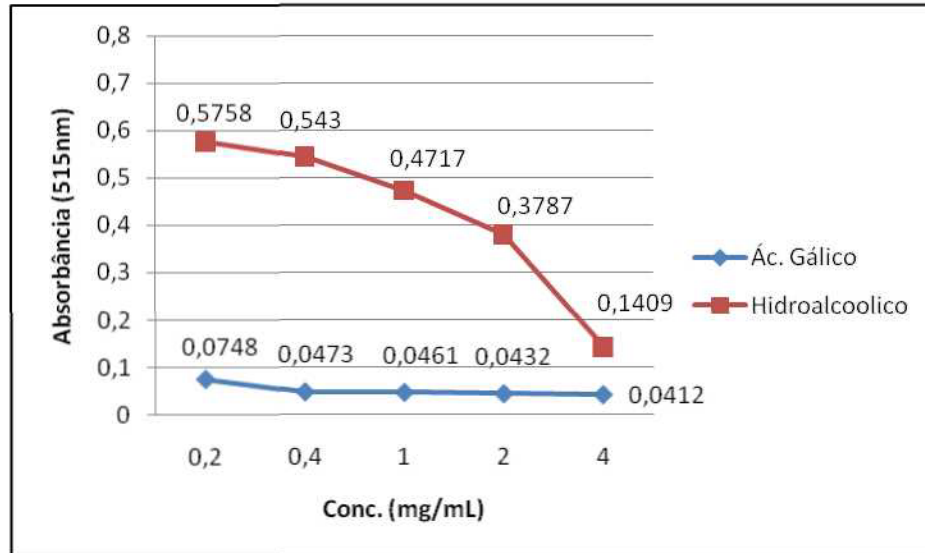


Gráfico 7: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de ácido gálico e extrato hidroalcoólico de *P. bahiana*.

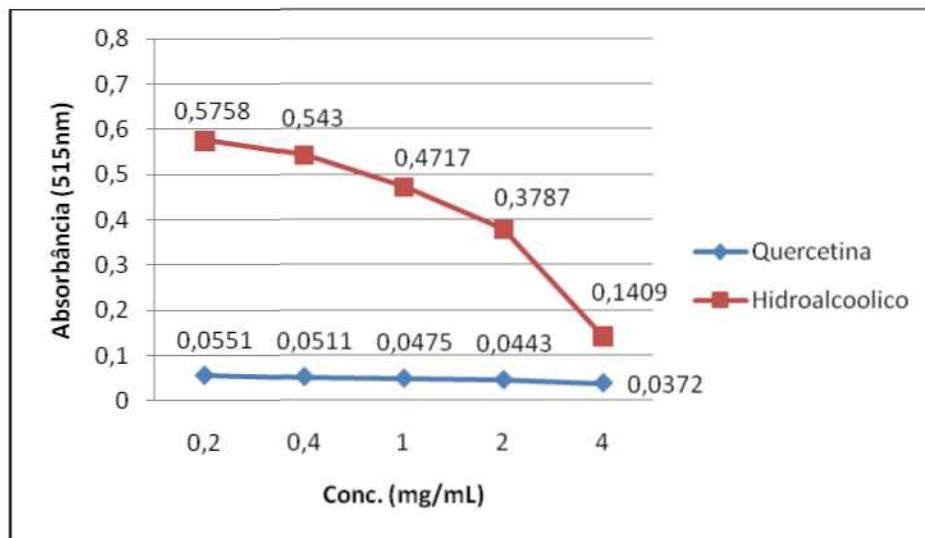


Gráfico 8: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato hidroalcoólico de *P. bahiana*.

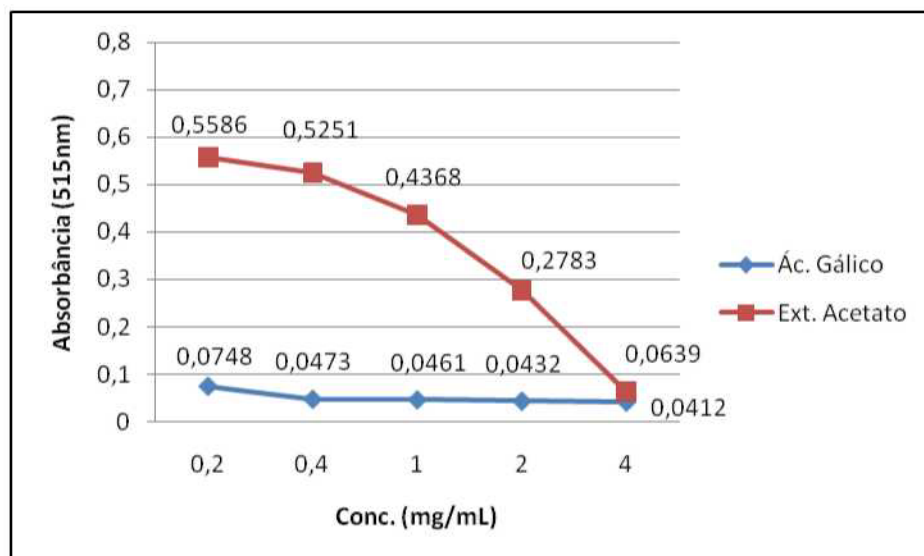


Gráfico 9: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de ácido gálico e extrato acetato de etila de *P. bahiana*.

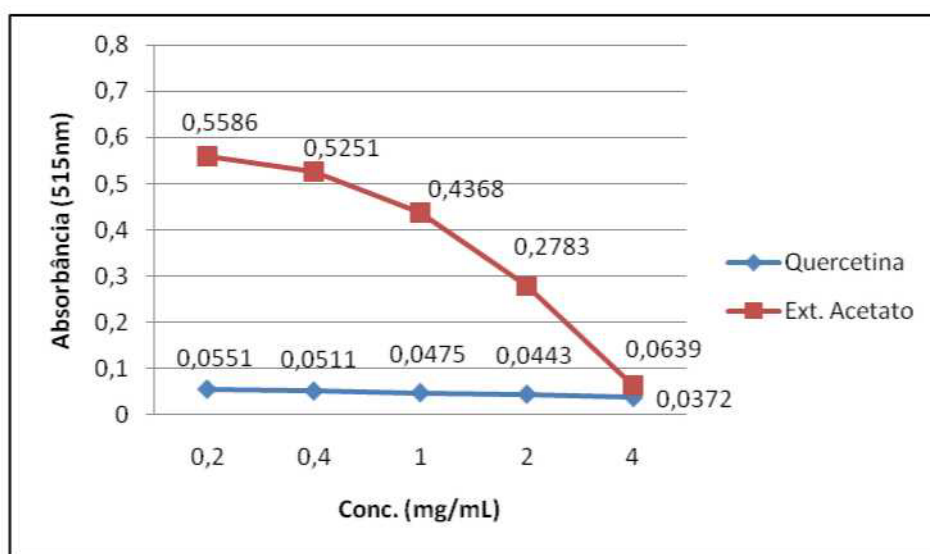


Gráfico 10: Gráfico comparativo da absorvância em espectrofotômetro UV/Vis de acordo com concentração de quercetina e extrato acetato de etila de *P. bahiana*.

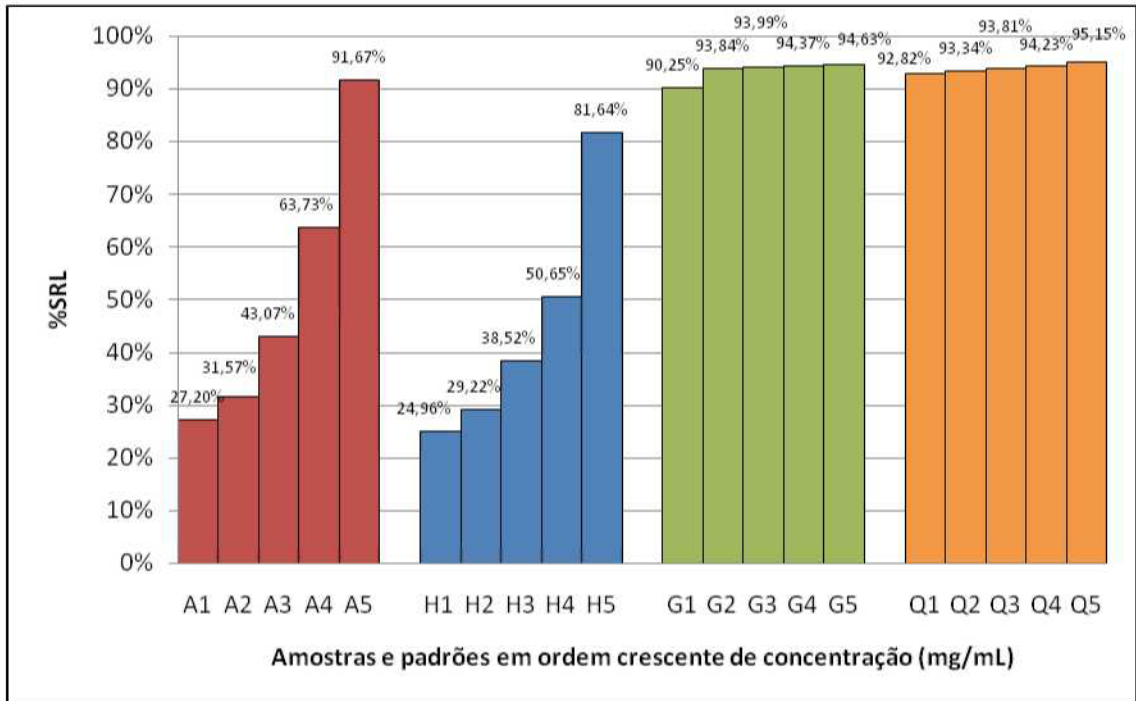


Gráfico 11: Gráfico dos %SRL dos extratos acetato de etila (A) e hidroalcoólico (H) de *Poiretia bahiana* e dos padrões ácido gálico (G) e quercetina (Q) nas concentrações avaliadas.

5. DISCUSSÃO

5.1 Espécie *Averrhoa bilimbi* L.

5.1.1 Caracterização farmacobotânica

Analisando as características macromorfológicas da espécie *A. bilimbi* L. e as informações descritas por Jorge, L. I. F. et al. (2006), sobre a espécie *A. carambola*, observou-se que ambas as espécies agregam características comuns, tais como, a constituição de folhas compostas, folíolos dispostos de forma alterna e imparipenada e o tamanho dos peciolulos. Mas, a forma do folíolo quanto ao contorno, ápice, nervação e base, o seu tamanho, podem servir de base para distinção macromorfológica entre as espécies.

Micromorfológicamente ambas as espécies apresentam discreto colênquima abaixo das epidermes na região da nervura principal, os folíolos hipoestomáticos e mesófilo do tipo dorsiventral, contudo o parênquima da *A. bilimbi* é bisseriado e o da *A. carambola* é trisseriado; as três camadas de parênquima paliçádico conferem xeromorfismo ao vegetal, protegendo-o quanto a perda de água por transpiração e evaporação. Tal ocorrência pode ser responsável pela diferente consistência e desenvolvimento dos frutos das espécies em estudo. A localização, freqüência e tipo de tricoma seguem o mesmo padrão para ambas as espécies, ou seja, os tricomas estão presentes em ambas as faces, com maior freqüência na epiderme abaxial e são do tipo simples e unicelulares. As substâncias ergásticas, tais como, cristais prismáticos e grãos de amido caracterizam ambas as espécies.

Contudo, Jorge, L. I. F. et al. (2006) não informam o tipo de estômato presente na face abaxial da *A. carambola*, sendo este dado uma característica de grande relevância pois serve como um tipo de marcador da espécie, quanto aos aspectos anatomomicromorfológicos.

O exocarpo de ambos os frutos apresentam células epidérmicas de contorno poligonal, porém na *A. bilimbi* o formato das células epidérmicas do exocarpo do seu fruto difere do tipo de contorno presente nas células da epiderme dos seus folíolos. Já na *A. carambola* a epiderme do exocarpo do fruto segue o mesmo formato do tecido epidêmico foliar, mas com paredes mais espessas. Os pêlos que recobrem a

superfície dos frutos em ambas as espécies são maiores do que os presentes no tecido epidérmico dos seus folíolos. A presença de tricomas simples e glandulares nos frutos de suas espécies caracteriza a família Oxalidaceae (Metcalf, C., 1979 apud Thomas S, P., et al., 2008). Além disso, a presença de tricomas e de grandes cavidades ovais longitudinais na secção transversal dos frutos constituem características distintivas e que podem ser utilizadas como marcadores anatômicos. Foi observada a presença de grãos de amido em células parenquimáticas do mesocarpo de ambas as espécies.

5.1.2 Avaliação citotóxica dos extratos

O teste com *A. salina* é utilizado para indicar o potencial citotóxico de extratos e substâncias quando apresenta alta letalidade. McLaughlin et al. (1998), relatam que esse ensaio levou à descoberta das acetogeninas da espécie *Annona muricata* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Os autores constaram que os valores de ED50 encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de LC50 encontrados nos testes realizados com *Artemia sp*, sugerindo que o teste pode ser utilizado como a primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos em alguns tumores humanos sólidos.

Ao comparar os resultados obtidos neste trabalho, com as verificações descritas por Mia, Md. M., et al, (2007), ao avaliar a letalidade das frações solúveis tetracloreto de carbono, éter de petróleo e cloroformico obtidas do extrato metanólico das cascas do caule da *A. carambola* frente ao microcrustáceo da espécie *Artemia salina*, observa-se a mesmo potencial biológico. Entretanto, a espécie *A. bilimbi* apresentou letalidade muito mais expressiva, vez que, todas as frações independentes da concentração foram citotóxicas. Enquanto que, *A. carambola* demonstrou a letalidade depende do gradiente de concentração.

5.1.3 Identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos

5.1.3.1 Identificação da substância 1

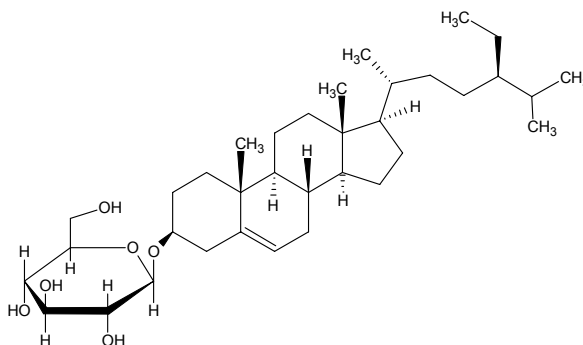


Figura 38: 3β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 30, p. 53) apresentou singletos em δ 0,66; 0,79;0,81;0,83;0,84;0,86;0,87;0,90;0,92 e 0,99 atribuídos a grupos metílicos. Entre S 1,27 e 2,40 foram observado sinais, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metínicos e metilênicos. O multiplete em δ 5,32 foi atribuído aos hidrogênios olefínicos do β -sitosterol no carbono C-5.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31, p. 55) mostrou sinais que contribuíram na identificação da parte esteroidal como sendo o β -sitosterol, entre esses, os sinais em δ 140,7 e δ 121,9 atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6, bem como o sinal em δ 71,7 ppm atribuído ao carbono carbinólico, C-3.

Além dos sinais correspondentes ao β -sitosterol, o espectro de RMN de ^1H , mostrou também sinais, na região de δ_{H} 2,89-4,90, característicos de açúcar. Esses sinais foram coerentes com os encontrados no espectro de RMN de ^{13}C em δ 37,2 (C-1), 31,5 (C-2), 71,6 (C-3), 42,3 (C-4), 140,7 (C-5), 126,9 (C-6), 31,5 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,1 (C-10), 21,1 (C-11), 39,7 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 56,0 (C-17), 11,8 (C-18), 19,3 (C-19), 37,2 (C-20), 18,7 (C-21), 34,0 (C-22), 26,1 (C-23), 45,8 (C-24), 29,2 (C-25), 19,9 (C-26), 19,2 (C-27), 23,0 (C-28) e 11,9 (C-29) ppm para o (3-sitosterol e em δ 103,6 (C-1'), 78,3(C-3'), 71,6 (C-4'), 75,2 (C-5') e 62,8 (C-6'), característicos para a glicose.

A configuração β da glicose foi baseada na constante de acoplamento encontrada para o C-3, que foi registrado como duplete com $J=7,4$ Hz, em δ 4,61. Estes

dados, além do sinal em β 5,32, referente ao C-5, estão compatíveis com sinais observados no espectro de RMN ^{13}C , e com aqueles da literatura (OLIVEIRA, M.C.C, et al. 1999 apud BOAVENTURA & GALOTTA, 2005) para o 3β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol.

5.1.3.2 Identificação da substância 2

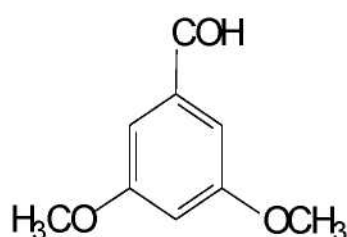


Figura 39: 3,5 dimetoxi-benzaldeído

O espectro de RMN de ^1H (Figura 32, p. 55) apresentou um pico em δ 9.68 indicando a presença de grupo aldeído. Os picos presentes na região compreendida entre δ 6.0-9,5 correspondem aos hidrogênios aromáticos presentes no anel e que foram assinalados, como δ 6,52 (2H, d, $J = 3,6$ Hz, H-2 e H-6) e δ 5,3 (1 H, s, H-4). Foram observados também sinais na região de δ_{H} 3,3 - 3,9 correspondentes a metoxila (OCH_3) ligada ao anel aromático.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 33, p. 55) foram observados o sinal em δ 110,0 correspondente aos carbonos aromáticos; o sinal em δ 178 do carbono aldeídico e o sinal em δ 56 correspondente ao carbono das metoxilas. Esses dados obtidos no espectro de RMN ^{13}C , estão de acordo com aqueles da literatura e banco de dados para o 3,5 dimetoxi-benzaldeído.

Foi identificada a presença de p-anisaldeído e β -sitosterol nas frações tetracloreto de carbono e cloroformica obtidas do extrato metanólico das cascas do caule de *Averrhoa carambola* (MIA, Md.M. et al, 2007). Aparentemente, as espécies presentes no Gênero *Averrhoa* apresentam como constituintes comuns aldeídos aromáticos e esteróides, uma vez que foram identificadas neste estudo a presença do 3,5-dimetoxi-benzaldeído e β -sitosterol nas frações dos extratos clorofórmio e acetato de etila da espécie *A. bilimbi* L.

5.2 Espécie *Poiretia bahiana* C. Muller

5.2.1 Caracterização micromorfológica

Os estômatos encontrados na espécie *P. bahiana* C. Muller são do tipo anisocíticos. Segundo Metcalfe e Chalk 1950 apud LEAL-COSTA, et al 2008, não existe um tipo de estômato característico da Família Fabaceae. Entretanto, muitos gêneros desta família apresentam estômatos do tipo paracítico, como o gênero *Glycine*. Lackey (1958) apud LEAL-COSTA, et al 2008, afirma que os estômatos paracíticos são característicos da tribo Phaseoleae.

Os estômatos da *P. Bahiana* C. Muller ocorrem apenas na face abaxial, porém em vários gêneros da Família Fabaceae foi observada a presença de estômatos em ambas as faces como: *Arachis*, *Canavalia*, *Crotalaria*, *Dalbergia* e *Indigofera* (METCALFE & CHALK 1950 apud LEAL-COSTA, et al 2008). Em espécies do gênero *Puereria* foram também observadas folhas anfiestomáticas, característica comum para as plantas cultivadas em locais de alta luminosidade (PEREIRA-NETO, et al. 1997 e 1999 apud LEAL-COSTA, et al 2008)

O mesófilo das folhas de *P. bahiana* é muito semelhante aos das espécies pertencentes ao gênero *Puireria* (PEREIRA- NETO, et al. 1997 e 1999 apud LEAL-COSTA, et al 2008), *Myrocarpus*, *Myroxylon* e *Myrospermum* (SARTORI, et al. 2002 apud LEAL-COSTA et al 2008), sendo caracterizado como heterogêneo assimétrico, possuindo parênquima paliçádico e esponjoso (lacunoso).

Algumas características observadas para espécie *P. bahiana* C. Muller confirmam registros descritos para a família Fabaceae como: epiderme unisseriada, mesofilo dor-siventral e fibras associadas aos feixes vasculares (SOLEREDER, 1908, METCALF & CHALK, 1950, COWAN, 1981, WATSON, 1981, CROW et al. 1981 apud FRAN-CINO, D. M. T., 2006).

5.2.2 Avaliação citotóxica do extrato bruto

O marcante percentual de inibição dos extratos hexânico e clorofórmico sugerem a presença de substâncias citotóxicas. Em contrapartida, essas elevadas toxicidades dos extratos hexânico e clorofórmico levam a buscar compostos com ativida-

de antitumoral. Entretanto, o teste não é específico para essa atividade, porém é útil em estudos biomonitorados na buscas de compostos com atividade citotóxica. Segundo David et al., (2001), substâncias que apresentam CL50 <100 ug/mL possuem atividade comparáveis à camptotecina e sulfato de vincristina dois importantes anti-neoplásicos utilizados na terapêutica. Já os extratos hidroalcoólico e acetato de etila não mostraram sinais de toxicidade, pois não foi observada morte dos microcrustáceos nas concentrações avaliadas.

5.2.3 Atividade antioxidante dos extratos brutos

Segundo Arno (2000), a capacidade antioxidante é um parâmetro utilizado para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra efeitos danosos provocados por uma oxidação excessiva, envolvendo espécies de nitrogênio e oxigênio.

Vilegas, W et al.(2007), afirma que nos últimos anos houve um grande interesse em investigar espécies antioxidantes e os seus efeitos, principalmente nos países desenvolvidos do ocidente. As pesquisas vêm tentando explicar os benefícios dos antioxidantes em enfermidades degenerativas como: as doenças cardiovasculares, envelhecimento, Síndrome de Alzheimer e outras que atingem o sistema nervoso.

Através do teste com o DPPH foi possível identificar os extratos capazes de doar hidrogênio radicalar (H) ao radical livre DPPH. Os extratos hidroalcoólico e acetato de etila mostraram ter potencial como fonte de substâncias antioxidantes, isso se deve provavelmente à presença de compostos fenólicos que são reconhecidamente substâncias antioxidantes. Chew, Y.-L. et al (2009), em estudo realizado com espécies pertencentes a Família Leguminosae, concluíram que espécies vegetais leguminosas são ricas em polifenóis. Esses compostos possuem uma estrutura química ideal para a atividade de seqüestro de radical livre, e são considerados compostos mais efetivos que as vitaminas C e E (VILEGAS, W. et al. 2007).

Ao aplicar o teste do DPPH utilizando a metodologia modificada proposta por Cuendet, et al.(1997), não foi observado grande diferença nos resultados obtidos. Porém, a metodologia descrita possui a vantagem de economizar soluções e reagentes, evitando gastos irracionais de insumos.

Foram verificados após comparação da capacidade de seqüestro de radical livre dos extratos brutos frente aos padrões pirragolol e quercetina, os maiores potenciais oxidantes para as substâncias padrões purificadas. Entretanto, durante a avaliação de extratos brutos vegetais, não é apropriado o uso de substâncias ativas isoladas como referência. O uso de extratos vegetais padronizados como padrões, permitiria uma melhor avaliação dos resultados (VICENTINO; MENEZES, 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Os resultados apresentados no estudo farmacobotânico das espécies *Averrhoa bilimbi* e *Poiretia bahiana* permitiram levantar características muito peculiares das espécies nos aspectos morfoanatômicos, possibilitando a identificação e reconhecimento de adulteração em produtos fitoterápicos elaborados a partir de drogas vegetais das espécies avaliadas.
2. O potencial citotóxico dos extratos solúveis da espécie *A. bilimbi* sugere que se deva dar continuidade a pesquisa para avaliar a capacidade anticancerígena dos extratos e substâncias puras isoladas. Desse modo, se faz necessário o uso de concentrações menores dos extratos avaliados para detecção eficiente da LC₅₀. Já, os extratos solúveis hexânicos e clorofórmicos da espécie *Poiretia bahiana* também merecem uma maior atenção. Importante ressaltar que os extratos que sinalizaram atividade citotóxica, alcançaram um percentual de inibição comparado à camptotecina e sulfato de vincristina, fármacos antineoplásicos com importante papel na terapêutica.
3. Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados obtidos com os extratos brutos hidroalcolico e acetato de etila da folha da espécie *P. bahiana* estimulam a continuidade do estudo para avaliação da ação antioxidante de substâncias isoladas dos extratos. Dessa forma, investigações químicas deverão ser realizadas para identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos.
4. O isolamento dos constituintes químicos da espécie *A. bilimbi* permitiu identificar as substâncias 3,5 dimetoxi- benzaldeído e 3 β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol nas frações AbAc03 e AbC46 das frações solúveis acetato de etila e clorofórmio respectivamente, a partir da espectroscopia de ressonância magnética nuclear. De acordo com os dados levantados, já foram também identificados aldeídos aromáticos e esteróides em frações solúveis da espécie *A. carambola*, sugerindo que tal ocorrência pode sinalizar o perfil químico do Gênero *Averrhoa*.
5. As substâncias isoladas, descritas neste trabalho, já são conhecidas, entretanto é preciso levar em conta que a espécie *A. bilimbi*, de grande interesse na medicina popular em decorrência de sua atividade hipoglicêmica, foi muito pouco estu-

dada. Portanto, estas informações são novas, pois este é o primeiro relato da presença das substâncias 3,5 dimetoxi- benzaldeído e 3 β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol na espécie estudada.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, J. R. Curso de Fitomedicina para Médicos e Farmacêuticos. Argentina. 100p. 2003. (apostila).
- AMBILI. S., SUBRAMONIAM, A, NAGARAJAN, N. S. Studies on the Antihyperlipidemic Properties of *Averrhoa bilimbi* Fruit in Rats. **Planta Med.** Vol.75. p. 11-14. 2009.
- ARAÚJO, F. M. Estudo Fitoquímico Biomonitorado da espécie *Poirertia bahiana*. Salvador. Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. 201 p. 2002.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical: a practical case. Trends in Food Science & Technology. Vol 11, p.419-421, 2000.
- BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., C. L. F., GUIMARÃES, E. F., COSTA, C. G. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Imprensa Universitária. Minas Gerais. Vol 2. p.377. 1981
- BOAVÊNтура, M. A. D., GALOTTA, A. L. Q. A. Constituintes Químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe prectoria* MART., ARECACEAE. **Química Nova.** Belo Horizonte. Vol 28. No.04.610-613 p.2005..
- BRUNETON, J. Phenols and Phenolic acids In BRUNETON, J. Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants. Lavoisier Press. EUA. 211-227p. 1995.
- CHWE, GOH & LIN. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. Food Chemistry. Trabalho aceito em 27 de Janeiro de 2009.
- CUNHA, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. 670p. 2005
- DAVID, J, GUEDES, M. ASSUNÇÃO, R. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetti*. **Química Nova.** Belo Horizonte. Vol. 24, No 6, 730-733, p. 2001.
- DI STASI, L.C. Plantas Medicinais: Arte e Ciência. UNESP. Brasil. 230p. 1995.

DOURADO, R. S. isolamento de compostos secundários em extratos de caule e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson. Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. 104p. 2006.

GROSS, M. C. S. Introdução à fitoterapia: Utilizando adequadamente as Plantas Mediciniais Herbarium Lab. Bot. LTDA.Colombo. 2008.

GROSS, M. C. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas/GILBERT, B., FERREIRA, J. L. P., ALVES, L. F. ABIFITO. Curitiba. 250 p. 2005.

JORGE, L. I. F., SILVA, A.M., GONZALEZ, E., FIGUEREDO, T. A.R. *Averrhoa carambola* L. (OXALIDACEAE) e *Achras sapota* L. (SAPOTACEAE) - ELEMENTOS MORFO-ANATÔMICOS DE ORIENTAÇÃO DIAGNÓSTICA. **Rev. Inst. Flor.** São Paulo. Vol.18. 39-48 p. 2006.

LEAL-COSTA M. V., ARAGÃO, F. J; L., REINERT, F., TAVARES, E. S. Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae). **Rev. Biociências**, UNITAU. Vol. 14. No.1. 2008.

LIMA, V. L. A. G.; MELO E. A.; LIMA, L. S. Physicochemical characteristics of bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol. 23. No. 2. 421 - 423 p. 2001

MAIDANA, R. O, FERRUCCI, M. S., DEMATTEIS, M. Las especies d e la familia Oxalidaceae del parque nacional de Mburucuyá. Trabajo presentado en las XVI Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas y VIII Reunión de Extensión FCAUNNEVol.8. 3-6 p.2005.

MCLAUGHIN, J. L., ROGERS, L. L., ANDERSON, J. E.The Use of biological assays of evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. Vol.3. 2513-2524p. 1998.

MIA, Md. M., RAHMAN, M. S., BEGUM, K., BEGUM, B., RASHID, M. A.Phytochemical and Biological Studies of *Averrhoa carambola*. **J. Pharm Sci Univer**. Vol.6 No.2. 126-128p. Dhaka. 2007.

PINO, J. A, MARBOT, R., BELLO, A., Volatile Components of *Averrhoa bilimbi* L. Fruit Grown in Cuba. **Journal of Essential Oil Research**. Cuba. 2004

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

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

SCHULZ, V., HANSEL, R. TYLER, V. E. *Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. Barueri-SP. Editora Manole, 4^a Ed. 386p. 2002.

SILVA, C. *P. Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla: estudos dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação de Química da Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul. 2005.

SIMÕES, C. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFGR. Editora da UFSC. 2004.

SOUZA, P. A., SILVA, G. G., MORAIS, P. L. D., SANTOS, E. C., PINTO, K. S. O., QUEIROGA, R. C. F., PEREIRA, F. H. F. Caracterização do fruto de Bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.). XX Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture - Centro de Convenções. Vitória-ES. 12-17 de Outubro de 2008

SOUZA, V. C., LORENZI, H. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. Instituto Plantarum. Nova Odessa, SP. 640p. 2005.

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

THOMAS, S., PATIL, D. A., PATIL, A. G., and CHANDRA, N. Pharmacognostic evaluation and phytochemical analysis of *Averrhoa carambola*, fruit. **Journal of Herbal Medicine and Toxicology**. Vol.2 No2. 51 - 54p. 2008

VICENTINO, A., MENEZES, F. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácia com manipulação e indicada para diversos tipos de doença pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 17. No.3. 384-387p. 2007

ZACARIAS, Z. A., ZAITON, H., HENIE, E. F. P., MAT JAIS, A. M., ENSKU ZAINU-DINN, E. N. H. In vitro antibacterial activity of *Averrhoa bilimbi* L. leaves and fruits extracts. **International Journal of Tropical Medicine**. Malaysia. Vol.2.No.3. 96-100p. 2007.

WAHAB, N. H. Bt. A, WAHID, M. E. B., TAIB, M.Bin.A., ZAIN, W.Z.Bt.M.Z., ANWAR, S.A.Bt. Phytochemical screening and antimicrobial efficacy of extracts from *Averrhoa bilimbi* (Oxalidaceace) fruits against human pathogenic bacteria. Second International Conference and Workshops on Basic and Applied Sciences Regional Annual Fundamental Science Seminar 2009. Malaysia. 2-4 June 2009.