



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

MARIA NAIANE BARBOZA DE LIMA

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS
DE *Momordica charantia* L. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018.

MARIA NAIANE BARBOZA DE LIMA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Momordica charantia* L. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do diploma de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Luciana Pereira Lobato

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Natália Nogueira Saraiva

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018.

MARIA NAIANE BARBOZA DE LIMA

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Momordica charantia* L. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe Campus de Lagarto, como requisito parcial para obtenção do diploma de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Luciana Pereira Lobato

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Natália Nogueira Saraiva

Aprovado em: 27/03/2018



Prof.^a Dr.^a. Luciana Nalone Andrade

Universidade Federal de Sergipe

(EXAMINADORA 1)



Prof.^a Ma. Ana Carolina Viana Simões

Universidade Federal de Sergipe

(EXAMINADORA 2)

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai Pedro, minha mãe Maria das Neves *“In Memoriam”* e aos meus irmãos, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam”.

AGRADECIMENTOS

Cinco anos se passaram e muito tenho a agradecer. Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me fortalecido ao ponto de superar as dificuldades e também por toda força, ânimo, coragem e saúde que me ofereceu e que permitiu alcançar esta etapa tão importante da minha vida.

A minha mãe (*in memoriam*), por ser o meu maior exemplo de vitória nessa vida e por ter me ensinado todos os valores éticos e morais que conheço. Obrigada por ser a minha referência de tantas maneiras. Sei que lá no céu a senhora não descansou na torcida, e que certamente orou dias e noites para que Deus estivesse sempre comigo. Mãe, meu amor por você é incondicional!

Ao meu pai, obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor, pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto. Te amo! A vocês expresseo o meu maior agradecimento.

A minha Orientadora Prof.^a Dr.^a. Luciana Pereira Lobato, agradeço pela orientação, pela dedicação, por nunca ter desistido de mim. E acima de tudo, pelo incentivo e, principalmente, pelo carinho e amizade oferecidos pelos anos, pois muitas vezes foi o empurrão que precisava, pois sem isso não teria superado esta prova de fogo. Obrigada por tudo!

A minha Co-orientadora Prof.^a. Dr.^a. Natália Nogueira Saraiva, agradeço pelo carinho, incentivo, colaboração, apoio e ajuda a mim dispensados durante todo o período de convivência.

Ao meu namorado Yuri Anthony, por todo amor, carinho, por ser tão compreensivo e ter acreditado nas minhas capacidades, seu apoio foi muito importante para a conclusão desta etapa.

A Tatiane, minha grande amiga de todas as horas, pela paciência e incentivo incondicional, estando sempre presente quando mais precisava, não medindo esforços em me ajudar, estando ao meu lado compartilhando os momentos bons e os estressantes durante todo este período.

Ao Anderson, pela amizade sincera, fruto desses cinco anos de graduação, pelo carinho, pelas mensagens de fé e otimismo nos momentos difíceis desta caminhada.

As minhas amigas Marianne, Tailane, Raquel e Paulinha, agradeço de todo coração a ajuda que me deram, tornando possível à conclusão deste trabalho.

A todas as pessoas do grupo de Pesquisa que de alguma forma tocaram meu coração e transmitiram força e confiança em mim.

É claro que não posso esquecer-me da minha família e amigos, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades. Obrigada!

E finalmente, agradeço a todos que me ajudaram direto ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto. **MUITO OBRIGADA** a todos vocês!

RESUMO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE *Momordica charantia* L. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Maria Naiane Barboza de Lima, Lagarto, 2018.

INTRODUÇÃO: A *Momordica charantia* L., conhecida popularmente por melão-de-São-Caetano, é bastante consumida pela população que, na sua maioria, não tem conhecimentos concretos e científicos acerca das propriedades nutricionais, farmacológicas, microbiológicas e toxicológicas desta planta. Com alvo de subsidiar a elaboração de fitoterápicos, esta planta consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **OBJETIVOS:** O presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes métodos e solventes de extração dos compostos fenólicos das folhas desta planta cultivada na região de Lagarto, SE, assim como a avaliação de atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos orgânicos obtidos. **METODOLOGIA:** Foram avaliados os métodos de extração de maceração, turbólise e ultrassom. Para determinação de compostos fenólicos foi utilizada a metodologia de Folin-Ciocalteu. A análise do seu perfil cromatográfico foi realizada por cromatografia em camada delgada analítica. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre os microrganismos patogênicos foi realizada pelo método de disco-difusão e microdiluição em caldo, assim como avaliação da atividade citotóxica *in vitro* frente às linhagens tumorais humanas que foi realizada pelo método do MTT. **RESULTADOS:** Os resultados deste estudo demonstraram que o melhor método de extração de compostos fenólicos para os solventes lipofílicos foi a turbólise e para os solventes hidrofílicos foi a maceração. Houve atividade antimicrobiana predominantemente do extrato que utilizou método de maceração com solvente hidroalcoólico sobre as cepas testadas. Foi evidenciada ação citotóxica de alguns extratos com inibição acima de 90% contras as linhagens tumorais. **CONCLUSÃO:** Nos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. foram observados a presença de compostos fenólicos, bem como, componentes fitoquímicos de média polaridade e obtiveram-se resultados positivos contra cepas testadas, além de exibir potencial citotóxico. Esses resultados indicam que há possibilidade de desenvolvimento de promissores agentes antimicrobianos e antitumorais naturais com aplicações no SUS e na indústria farmacêutica a partir da planta em estudo.

Palavras-chave: melão-de-São-Caetano; fitoterapia; métodos de extração.

ABSTRACT

EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF LEAVES OF *Momordica charantia* L. AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF ORGANIC EXTRACTS

Maria Naiane Barboza de Lima, Lagarto, 2018.

INTRODUCTION: *Momordica charantia* L., popularly known as melon-de-São-Caetano, is widely consumed by the population, most of whom do not have concrete and scientific knowledge about the nutritional, pharmacological, microbiological and toxicological properties of this plant. With the aim of subsidizing the production of herbal medicines, this plant is included in the National List of Medicinal Plants of Interest to SUS. **OBJECTIVES:** The objective of this work was to evaluate different methods and solvents for the extraction of phenolic compounds from the leaves of this plant in the region of Lagarto, SE, as well as the evaluation of the antimicrobial and cytotoxic activities of the organic extracts obtained. **METHODOLOGY:** Methods of extraction of maceration, turbolysis and ultrasound were evaluated. For the determination of phenolic compounds, the Folin-Ciocalteau methodology was used. The analysis of its chromatographic profile was performed by analytical thin layer chromatography. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts on the pathogenic microorganisms was performed by the disc-diffusion and microdilution method in broth, as well as evaluation of the in vitro cytotoxic activity against the human tumor lines that was performed by the MTT method. **RESULTS:** The results of this study demonstrated that the best method of extracting phenolic compounds for the lipophilic solvents was turbolysis and for the hydrophilic solvents was the maceration. There was predominant antimicrobial activity of the extract that used a maceration with hydroalcoholic solvent on the tested strains. Cytotoxic action of some extracts with inhibition above 90% was evidenced against the tumor lineages. **CONCLUSION:** In the extracts of the leaves of *Momordica charantia* L., the presence of phenolic compounds as well as phytochemical components of medium polarity were observed and positive results were obtained against tested strains, in addition to cytotoxic potential. These results indicate that it is possible to develop promising antimicrobial and natural antitumor agents with applications in the SUS and in the pharmaceutical industry from the study plant.

Keywords: melon-de-São-Caetano; phytotherapy; extraction methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes da planta <i>Momordica charantia</i> L.	12
Figura 2. Estrutura química da momordicina I, II e III, respectivamente.	14
Figura 3. Exemplos de compostos isolados de <i>Momordica charantia</i> L., A- momordicina e B- charantina.	14
Figura 4. Propriedades medicinais da <i>Momordica charantia</i> L.	16
Figura 5. Estrutura química dos glicosídeos A- sitosterol e B- estigmasterol.	18
Figura 6. Estrutura química dos principais compostos fenólicos, A- flavonoide, B- ácido fenólico, C- fenol simples, D - cumarina, E - tanino condensado e F- lignina.	24
Figura 7. Fluxograma do planejamento metodológico da presente pesquisa.	28
Figura 8. Fluxograma do método de Folin-Ciocalteu.	29
Figura 9. Fluxograma do teste de difusão em disco de papel.	31
Figura 10. Representação esquemática da técnica da microdiluição em caldo.	33
Figura 11. Curva padrão de ácido gálico.	35
Figura 12. Compostos fenólicos de extratos obtidos por (I) hexano, (II) diclorometano, (III) acetato de etila e (IV) etanol/água 70:30, v/v, respectivamente e por diferentes métodos.	36
Figura 13. Compostos fenólicos dos extratos obtidos por etanol e por diferentes métodos.	39
Figura 14. Placas cromatográficas em sílica gel (a) e (b) como fase móvel hexano e acetato nas proporções 60:40 e 95:5, respectivamente. (c) e (d) placas cromatográficas reveladas sob luz UV.	41
Figura 15. Placas cromatográficas em sílica gel (a), da esquerda para direita, com a fase móvel hexano e acetato nas proporções (90:10) extrato de hexano, (90:10) extrato de diclorometano, (70:30) extrato de acetato de etila e (50:50) extrato hidroalcoólico, reveladas em vanilina. (b) placas cromatográficas sob luz UV.	42
Figura 16. Halos de inibição contra <i>Staphylococcus aureus</i> (a) EA1(macerção - extrato de etanol/água 70:30, v/v) e contra <i>Escherichia coli</i> (b) EA6 (turbólise + macerção- extrato de etanol/água 70:30, v/v).	Erro! Indicador não definido.
Figura 17. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato AE6 contra bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , respectivamente.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de <i>Momordica charantia</i> em diferentes concentrações frente às espécies estudadas.	46
Tabela 2. Inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos das folhas de <i>M. charantia</i> frente a linhagens tumorais testados na dose única de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos	10
2.2 <i>Momordica charantia</i> L.....	11
2.2.1 Aspectos botânicos	11
2.2.2 Descrição geográfica	13
2.2.3 Composição fitoquímica.....	13
2.2.4 Histórico dos usos tradicionais e populares.....	15
2.2.5 Propriedades farmacológicas	16
2.2.5.1 Atividade antimicrobiana.....	18
2.2.5.2 Atividade citotóxica	19
2.2.6 Toxicidade	20
2.3 Extratos vegetais	21
2.3.1 Maceração.....	22
2.3.2 Ultrassom.....	22
2.3.3 Turbólise	23
2.4 Compostos fenólicos.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Material Vegetal.....	26
4.2 Preparação do Material.....	26
4.2.1 Preparação dos extratos vegetais	26
4.3 Determinação de compostos fenólicos	28
4.4 Análise de perfil cromatográfico	29
4.4.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).....	30

4.5 Determinação de atividade antimicrobiana	30
4.5.1 Teste de difusão em disco de papel	30
4.5.2 Microdiluição em caldo.....	30
4.6 Determinação de atividade citotóxica	33
4.7 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Determinação de compostos fenólicos	35
5.2 Análise de perfil cromatográfico	40
5.3 Determinação de atividade antimicrobiana	43
5.3.1 Teste de difusão em disco de papel	43
5.3.2 Microdiluição em caldo.....	43
5.4 Determinação de atividade citotóxica	48
6 CONCLUSÃO	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8 ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para cura e tratamento de doenças acompanha a sociedade humana desde os primórdios de sua existência (REZENDE; COCCO, 2002). Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos que, ao serem experimentados no combate às doenças, revelaram empiricamente seu poder curativo (BADKE *et al.*, 2011).

O Brasil é um país privilegiado por possuir muitos recursos vegetais que são considerados como alimentos e como auxiliares nos tratamentos de saúde. Os produtos naturais advindos de plantas são amplamente utilizados no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Isto reflete a necessidade de pesquisas inovadoras que explorem a capacidade terapêutica da vasta biodiversidade brasileira (SAMPAIO, 2014). No Brasil, à vista disso, um conjunto de resoluções e portarias delinea os instrumentos necessários à implantação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, destacando-se a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS - RENISUS (BRASIL, 2009).

Dentre as diversas espécies do reino vegetal destaca-se *Momordica charantia* L., pertencente à família das Cucurbitaceae, e que consta no RENISUS. É uma planta originária da África, mas que se aclimatou facilmente no Brasil em razão do clima tropical (LORENZI, 2000), possui grande interesse popular e científico pelas propriedades curativas que demonstra. Todas as partes da planta possuem propriedades medicinais, sendo usadas topicamente para o tratamento de feridas, sistemicamente como anti-helmíntico, antiviral, antibacteriano, antitumoral e antioxidante, sendo também conhecidas por suas propriedades hipoglicemiantes (GROVER; YADAV, 2004).

As substâncias secundárias presentes nas plantas medicinais possuem papel importante sobre os efeitos farmacológicos. Diferentes métodos e solventes utilizados na extração podem resultar em diversas substâncias químicas (SIMÕES *et*

al., 2001), dentre elas, estão os compostos fenólicos que podem possuir a capacidade de inibir o crescimento de diversos microrganismos (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Esses compostos também podem contribuir para a prevenção da carcinogênese devido a redução da lesão oxidativa relacionada a sua atividade sequestradora de radicais livres, impedindo a propagação das reações e consequente dano tecidual (XU; CHANG, 2007).

A partir disso, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes métodos de extração e solventes para obtenção de compostos fenólicos a partir das folhas de *Momordica charantia* L., realizar análise do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), assim como avaliar a possível atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, como também pesquisar a atividade citotóxica dos extratos orgânicos obtidos frente às linhagens tumorais humanas de PC3 (câncer de próstata), HCT-116 (câncer de colorretal), NCIH460 (carcinoma de pulmão) e K562 (leucemia mieloide crônica).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos

A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Desde os tempos antigos, as civilizações primitivas notaram que algumas plantas, dotadas de maior ou menor toxicidade, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram o seu potencial curativo, ainda que empiricamente (REZENDE; COCCO, 2002). Ao buscar as espécies mais apropriadas para a cura de seus males, aos poucos, o ser humano foi selecionando as que serviam como medicamento, as que eram venenosas e as que causavam efeitos alucinógenos. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida verbalmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada (CUNHA, 2007). No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem na prática indígena suas bases que, influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular (ALVES, 2003).

A utilização de plantas medicinais para tratamento de doenças é favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (ISERHARD *et al.*, 2009). As plantas medicinais apresentam uma ou mais substâncias químicas com ação farmacológica capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais. Muitas vezes os constituintes químicos responsáveis pela atividade farmacológica não são conhecidos e envolvem a interação de várias moléculas presentes no extrato ou em outros componentes do vegetal (EMBRAPA, 2004). Isto reflete na necessidade de pesquisas inovadoras que explorem a capacidade terapêutica da biodiversidade brasileira, assim como na segurança do uso.

No Brasil, a vista disso, tornou-se necessária a implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF - BRASIL, 2006), destacando-se a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS – BRASIL, 2009). Tal medida tem como principal objetivo a ampliação

das opções terapêuticas aos usuários do SUS, garantindo acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção e promoção à saúde (BRASIL, 2009).

Para seleção das plantas medicinais de interesse ao SUS foi priorizada a inclusão de plantas nativas, que pudessem ser cultivadas em pelo menos uma das regiões do país e que pudessem atender às doenças mais comuns nos brasileiros. Depois de fazer um levantamento nos municípios que utilizavam plantas medicinais e fitoterápicos, em 2009, a *M. charantia* L. passou a integrar a RENISUS que é constituída por 71 espécies de plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira (SAMPAIO, 2014).

2.2 *Momordica charantia* L.

2.2.1 Aspectos botânicos

Momordica charantia L. (Figura 1), popularmente conhecida como melão-de-São-Caetano, é uma trepadeira da família Cucurbitaceae. Além deste nome popular pode também ser conhecida por “melãozinho”, “erva de São Caetano”, “erva de lavadeira” ou “fruto de cobra” (DALEFFI; ZOCOLER, 2006). O nome “momordica” deriva do latim e significa “mordida”, devido às bordas da folha que aparentam estar mordidas (GROVER; YADAV, 2004; SENANAYAKE, 2004).



Figura 1. Partes da planta *Momordica charantia* L.

Fonte: <http://healthbubbles.com/gb/?s=momordica>

O melão-de-São-Caetano é uma espécie vegetal silvestre e com flores unissexuais, assim como a maioria das espécies de Cucurbitaceae (LENZI *et al.*, 2005). Todas as partes da planta, incluindo o fruto, possuem sabor amargo. O fruto é oblongo e assemelha-se a um pepino pequeno, o fruto novo é verde que muda para uma tonalidade alaranjada quando maduro (GROVER, 2004). Quando o fruto está completamente maduro ele fica mole e se divide em segmentos que enrolam para trás para expor as sementes que são envolvidas por um arilo vermelho (ALMEIDA, 2005).

A planta é uma erva volúvel, que cresce sobre as cercas e os arbustos, se caracteriza por apresentar um caule trepador de 3 a 4 metros de extensão, folhas membranáceas, cordiformes, com base angulosa ora dentada ou lobulada com cinco a sete lóbulos (aproximadamente 3-6 cm), gavinhas simples, longas, delicadas e pubescentes, de cor verde; flores frequentemente solitárias, amarelas, unissexuais (RIGOTTI, 2017).

2.2.2 Descrição geográfica

A *Momordica charantia* L. é uma espécie vegetal silvestre comumente encontrada em áreas urbanas e rurais, sendo conhecida e utilizada por suas propriedades medicinais (RIBEIRO, 2003).

A planta cresce em áreas tropicais na Ásia, Amazônica, oeste Africano e no Caribe (CHEN *et al.*, 2008). É usada tradicionalmente na medicina caseira em países como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru (GROVER, 2004), também cultivado no sul de Kyushu, Japão, devido ao clima subtropical (SENANAYAKE, 2004).

A forma de erva daninha pode ter sido trazida junto com sementes de outras culturas e transformaram-se em um problema em plantações por todo o mundo. É tolerante a um número variável de ambientes e pode crescer em climas tropicais e subtropicais (FERREIRA, 2008). É uma planta daninha bastante frequente em pomares, cafezais, sobre cercas e entulhos de terrenos abandonados (LORENZI, 2000). No Brasil, atualmente, é encontrada em todas as regiões habitadas do país, sendo facilmente observado nos trópicos e no Nordeste brasileiro em grande abundância (BATRAN *et al.*, 2006).

2.2.3 Composição fitoquímica

Estudos fitoquímicos da *M. charantia* relatam a presença de importantes classes de metabólitos biologicamente ativos que incluem glicosídeos, flavonoides, saponinas, alcaloides, óleos essenciais, triterpenos, esteroides e proteínas (BRACA *et al.*, 2008). Os ramos e folhas apresentam como constituintes químicos mormodicina I, II e III (Figura 2) e saponina do ácido oleanólico; nos frutos e sementes encontram-se esteroides e carotenoides. Porém, o componente mais importante das sementes é a proteína alfa-tricosantina (MATOS, 2002).

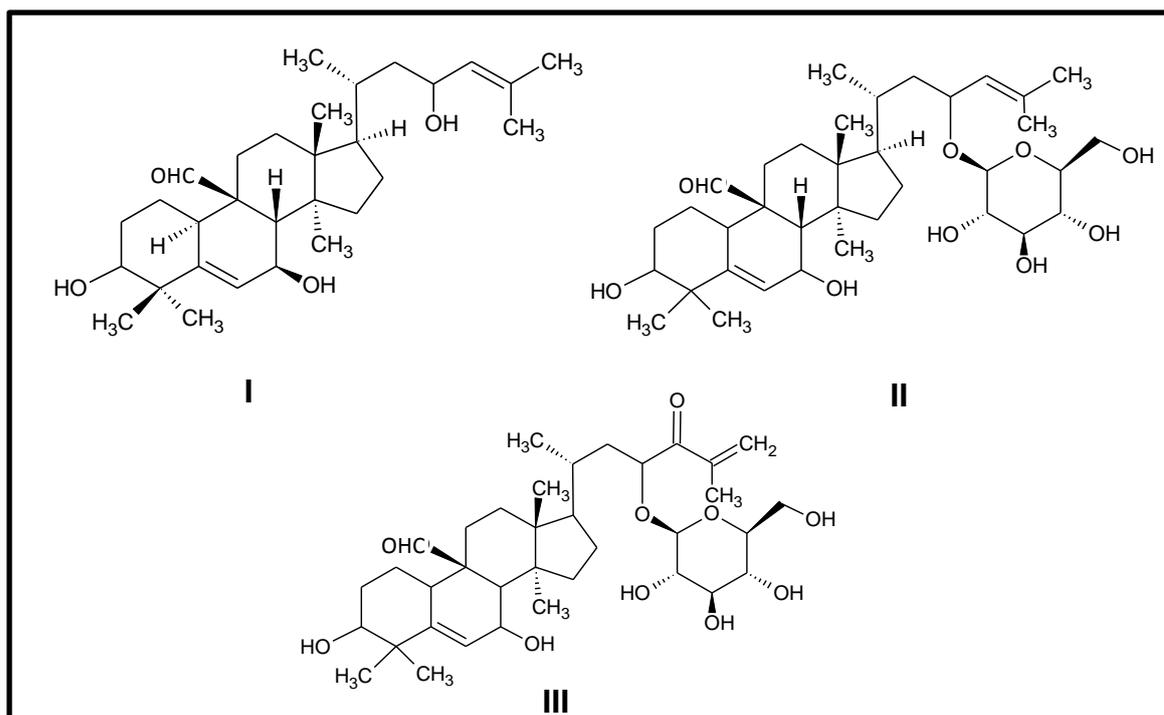


Figura 2. Estruturas químicas da momordicina I, II e III, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diversas substâncias já foram isoladas de todas as partes da planta tais como: momorcharinas, momordenol, momordicina, momordicinas (Figura 3A), momordicinina, momordina, momordolol, momorcharasídeos, charantina (Figura 3B), charina, criptoxantina, cucurbitinas, cucurbitanos, cucurbitacinas, cicloartenóis, diosgenina, eritrodíol, ácido láurico, ácido elaeostearico, ácido galacturônico, ácido gentísico, ácido oleanólico, ácido oleico, ácido oxálico, pentadecanos, peptídeos, gepsogenina, goiaglicosídeos, goiasaponinas e multiflorenol (MIURA, 2001).

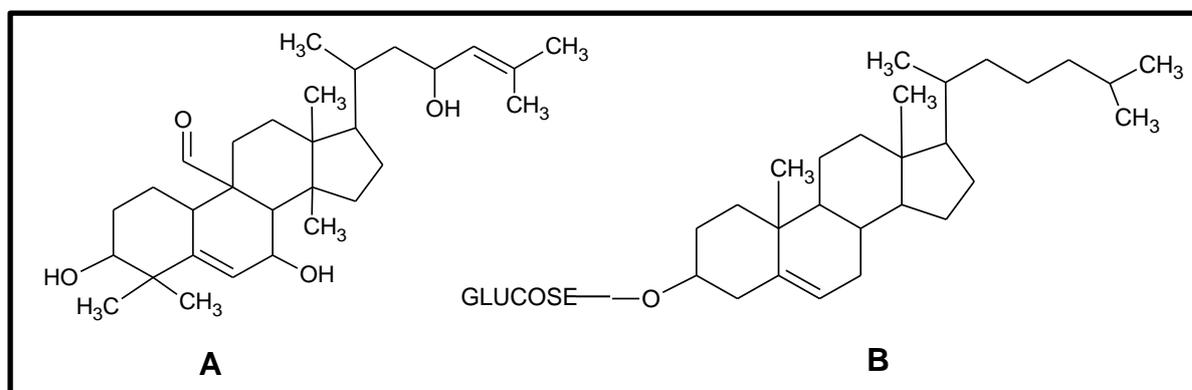


Figura 3. Exemplos de compostos isolados de *Momordica charantia* L., A- momordicina e B- charantina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os estudos fitoquímicos dos componentes do melão-de-São-Caetano têm demonstrado a presença de compostos biologicamente ativos como 50 novos glicosídeos, cucurbitinas e cucurbitane (CHEN *et al.*, 2008). Em estudos desenvolvidos por Daleffi-Zocoler *et al.* (2006) com extrato aquoso de caule e folhas de *M. charantia* obtiveram resultados positivos quanto aos grupos químicos para presença de flavonóides, saponinas, taninos e triterpenos. Os extratos preparados com folhas de *M. charantia* dessecadas e pulverizadas utilizando-se como solventes o álcool etílico a 70% (extrato hidrofílico) e o éter etílico (extrato lipofílico) apresentaram como metabólitos mais frequentes os alcaloides, catequinas, esteroides e saponinas (RODRIGUES *et al.*, 2010), enquanto em extrato etanólico do pó de folhas, talo e frutos verificou-se a presença de taninos, flavonas, flavonóis, flavanonóis e xantonas (GOMES *et al.*, 2011). Leite *et al.* (2005) em estudo fitoquímico de extrato hexânico de folhas de planta de *M. charantia*, coletada no Estado do Ceará, revelaram a presença de esteroides.

2.2.4 Histórico dos usos tradicionais e populares

Em países em desenvolvimento, 80% das pessoas continuam utilizando a medicina tradicional nos problemas básicos de saúde. Nas últimas décadas, no entanto, pesquisas têm objetivado a avaliação científica de drogas tradicionais originadas das plantas. *M. charantia*, é uma dessas plantas que tem sido comumente utilizada na medicina tradicional (BELOIN *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005).

Baseado no uso da medicina popular tem sido identificado a eficácia da *M. charantia*, sendo utilizada no tratamento de diversas desordens como reumatismo, cálculos renais, hepatite, adjuvante no tratamento de diabetes e colesterol, doenças de pele, cicatrização de feridas e tratamento de úlceras pépticas (GROVER; YADAV, 2004; BELOIN *et al.*, 2005). As partes utilizadas são, principalmente, as folhas e em menor medida os talos e os frutos. É preparada na forma de infusão (folhas e raízes), cataplasma (fruto), unguentos (folhas) e azeite (sementes). Os frutos, apesar

de terem alertas relacionados com a toxicidade apresentando efeitos adversos como sintomas gastrointestinais, são comestíveis (SUBRATTY, 2005).

Popularmente, o chá da folha do melão-de-São-Caetano é utilizado no tratamento de problemas de diabetes, menstruais, constipação, febre (malária), cólicas e dor abdominal, inflamação, infecções microbianas, vermes e parasitas (KUMAR *et al.*, 2010); de todas as vantagens terapêuticas conhecidas nas folhas, a mais importante é o seu efeito hipoglicemiante. O suco das folhas pode ser usado para tratamento de pele especialmente quando há coceiras (GROVER; YADAV, 2004).

2.2.5 Propriedades farmacológicas

A *M. charantia* L. é utilizada em diferentes sistemas da medicina tradicional para várias doenças pelas suas propriedades farmacológicas (Figura 4). Sendo abundante e muito usada na medicina popular, esta espécie tem sido foco de interesse para comunidade científica, havendo nos últimos anos diversas publicações relacionadas a estudos farmacológicos e constituintes químicos (TCHEGHEBE, 2016).

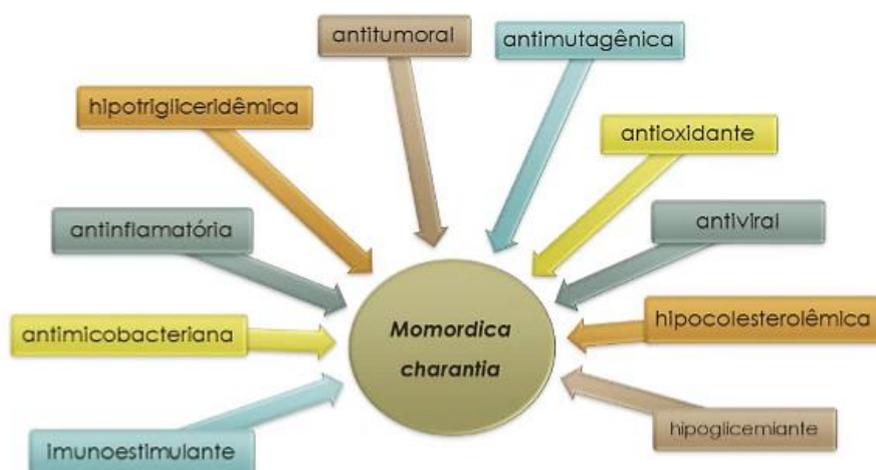


Figura 4. Propriedades medicinais da *Momordica charantia* L.

Fonte: ESPÓSITO, 2013.

A ação anti-helmíntica do extrato etanólico das folhas de *M. charantia*, segundo Cordeiro *et al.* (2010), impediu o desenvolvimento de ovos e a motilidade de larvas de nematoides gastrintestinais em caprinos. Beloin *et al.* (2005) evidenciaram a atividade antiviral e anti-helmíntica de triterpenoides isolados das folhas, classificados de momordicinas I e II, destacando principalmente a atividade nematicida dessas substâncias. Duas proteínas conhecidas como α e β -momorcharinas presentes nas sementes, frutos e folhas, foram relatadas em pesquisas *in vitro* com atividade contra o vírus HIV (KUMAR *et al.*, 2010). Além disso, ensaios preliminares com o extrato etanólico bruto de suas folhas demonstraram atividade gastroprotetora e o extrato hexânico de *M. charantia* reduziu significativamente as lesões gástricas em camundongos (LEITE *et al.*, 2005).

Topicamente é utilizado no tratamento de ferimentos e a presença de esteroides detectada em suas folhas tem sido relacionada ao seu potencial antioxidante (GROVER; YADAV, 2004). O extrato da folha de *M. charantia* pode oferecer alguns efeitos benéficos no manejo de doenças inflamatórias. Indicativos experimentais denotam potencial anti-inflamatório da *M. charantia* L., uma vez que inibiu significativamente o edema induzido em ratos (UMUKORO, ASHOROBI 2006).

O extrato de *Mormodica charantia* revelou-se eficiente no controle da infestação de insetos adultos do *Sitophilus zeamais* (gorgulho-de-milho) presente em sementes de milho armazenado. Os baixos percentuais de infestação apresentado pelo extrato de melão-de-São-Caetano, provavelmente, dá-se pela ação de compostos secundários encontrados na planta, promovendo nas sementes uma película protetora, impedindo, assim, o ataque dos insetos (ALMEIDA, 2013). Sallet (2006) mostrou que extrato etanólico de *M. charantia* apresentou atividade inseticida sobre a broca-do-café. Testes cromatográficos detectaram a presença de momordicina II e triterpeno monoglicosídico que foram identificados como compostos repelentes.

O melão-de-São-Caetano é muito estudado em relação ao seu efeito antidiabético e partes de toda a planta mostraram atividade hipoglicêmica em animais domésticos (GROVER; YADAV, 2004; BELOIN *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005). Segundo Tan *et al.*, (2008) há, ainda, um componente químico

hipoglicemiante da *M. charantia*, um glicosídeo esteroidal que é a mistura de glicosídeos de sitosterol e estigmasterol (Figura 5), conhecida como charantinas, peptídeos semelhantes à insulina, sendo mais concentradas no fruto. Segundo estes mesmos autores, estes componentes do extrato desta planta parecem ter semelhança estrutural com insulina, que mimetizam a ação hipoglicemiante em humanos.

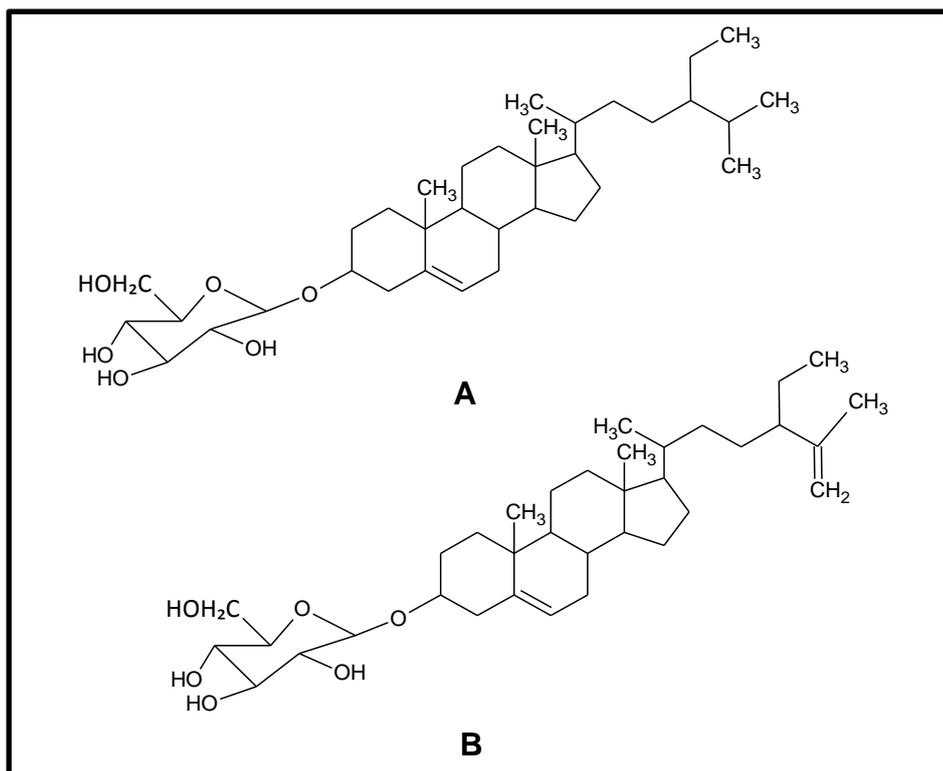


Figura 5. Estrutura química dos glicosídeos A- sitosterol e B- estigmasterol.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.5.1 Atividade antimicrobiana

Outro grande potencial farmacológico dessa espécie vegetal está relacionado a sua capacidade antibacteriana e antifúngica. Extratos hidroalcoólicos das folhas desse vegetal demonstraram atividade antimicrobiana contra de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (PONZI *et al.*, 2010). Em outro estudo, o extrato das folhas de *M. charantia* L. apresentou atividade antifúngica frente a cepas do gênero *Candida* da cavidade bucal (MACENA

et al., 2005). Além disso, Coutinho *et al.* (2010) demonstraram que extrato etanólico de *M. charantia* L. exibe acentuada atividade antibacteriana contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). E foi demonstrado um efeito potencializador entre este extrato e os aminoglicosídeos testados.

Também foi observada a atividade antimicrobiana do macerado das folhas de *M. charantia* sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae* (ADEGBOLA, 2016) e contra fungos foi efetiva sobre *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma* sp. (CELOTO, 2008).

Torres *et al.* (2002) comprovaram que no extrato de uma ou mais partes da planta de *M. charantia* (sementes, folhas, haste, raízes ou frutos) foram encontradas substâncias bioativas como alcaloides, flavonoides, saponinas, glicosídeos, açúcares redutores, resinas, constituintes fenólicos, óleo fixado e ácidos livres, justificando sua atividade antifúngica e antibacteriana.

2.2.5.2 Atividade citotóxica

O papel da *M. charantia* no controle do câncer pode ser confirmado através dos trabalhos de Fang *et al.* (2012) que demonstraram que a proteína lectina *Momordica charantia* (MCL) tem capacidade de desativar o ribossomo tipo II, em carcinoma nasofaríngeo (NPC), induzindo apoptose das células de NPC. Nerurkar e Ray (2010) citam que foi isolada uma proteína de inativação de ribossomos (MCP30) do extrato de *M. charantia*, responsável pela atividade antitumoral testada nas células de câncer de mama e de câncer de próstata humano implantados em ratos, em ambas levando a redução da expressão de importantes proteínas reguladoras do ciclo celular. Já nos estudos de Meng *et al.* (2014), foi mostrado que a Alfa-momorcharina (α -MMC) é responsável pela atividade citotóxica devido a sua capacidade de inibir a proliferação das células de adenocarcinoma pulmonar.

Kikuchi *et al.* (2012) testaram oito compostos glicosídicos (da classe dos triterpenos) isolados a partir da fração metanólica do extrato das folhas de *M. charantia* em cultura celular de melanoma, desencadeando mecanismos que culminaram na inibição do desenvolvimento destas células ou na eliminação deste tipo celular quando já desenvolvido.

2.2.6 Toxicidade

A determinação da toxicidade aguda de uma substância é extremamente importante, principalmente considerando o uso indevido. Um grande número de plantas tem sido utilizado pela população em razão dos seus efeitos terapêuticos. A grande maioria dos estudos realizados com espécies brasileiras aborda apenas aspectos botânicos e químicos (GARCIA, 2007). E na perspectiva do largo uso popular de *M. charantia* L. é conveniente investigar sua toxicidade tendo em vista o uso seguro desta planta pela população, bem como, servir de base para futuros estudos farmacológicos.

Em relação à toxicidade, *M. charantia* L. tem se mostrado segura. Estudos pré-clínicos *in vivo* tem demonstrado existir uma baixa toxicidade de todas as partes do melão-de-São-Caetano quando ingeridos oralmente (LAGARTO *et al.*, 2008). Os animais que, experimentalmente, receberam baixas doses do extrato dessa planta durante dois meses não apresentaram nenhum sinal de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além de não acarretar alteração no consumo de alimentos, no ganho de peso ou nos parâmetros hematológicos (VIRDI *et al.*, 2003). Nos testes toxicológicos do extrato bruto etanólico das folhas de *M. charantia* L demonstraram ausência de letalidade para a dose máxima administrada de 4000 mg/kg, não necessitando testar doses superiores a esta por lei, classificando-a como atóxica (PONZI, 2010).

Contudo, as suas sementes demonstram maior toxicidade comparada com as folhas e as partes aéreas da planta. De acordo com Mengue *et al.* (2001) foram isoladas glicoproteínas (alfa e beta-momorcharina) das sementes, que apresentaram

ação inibitória sobre a multiplicação celular do endométrio e miométrio de camundongos fêmeas, conferindo ação abortiva.

2.3 Extratos Vegetais

Os extratos são preparações concentradas que possuem consistências diversas, obtidas de matérias-primas vegetais secas, tratadas ou não previamente (inativação enzimática, moagem, entre outros) e preparadas por processos que envolvem a utilização de solventes (LIMA JUNIOR, 2011).

A extração é um método conveniente para retirar substâncias de órgãos ou de matrizes onde são originadas e localizadas (LIMA JUNIOR, 2011). A teoria da extração é baseada no fato que se uma substância é solúvel em algum grau num solvente, ela pode ser extraída quando a matriz, onde se encontra, é colocada intimamente em contato com ele (CHOZE, 2004). Com isso, para uma proposta específica de extração, a escolha do solvente é certamente um dos problemas principais a ser considerado. Esse agente extrator é, geralmente, um líquido orgânico volátil, que pode ser removido por evaporação após ter extraído a quantidade de material desejada. Os solventes orgânicos mais utilizados em processos de extração são pentano, hexano, éter de petróleo, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e etanol (PACHÚ, 2007).

O solvente envolvido na extração compreende a dissolução seletiva da porção solúvel dos seus constituintes num solvente apropriado, sendo a quantidade de material extraído proporcional à massa de planta imersa no solvente (PACHÚ, 2007). O processo extrativo também está relacionado em função do tempo em que o material fica em contato com o agente extrator, do grau de trituração da planta, da temperatura, da polaridade do solvente e da reatividade desse frente aos produtos a serem extraídos, da quantidade de solvente usado que deve ser adequada com a quantidade de material, já que deverá embeber as células para retirar delas as substâncias químicas aí existentes (SILVA *et al.*, 2005).

2.3.1 Maceração

A maceração explora o fenômeno de difusão do solvente através do tecido vegetal. Nesse procedimento, o material botânico deve ser dividido em pequenos fragmentos e ser mantido em contato com o solvente por um determinado tempo. Sendo, uma operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não reduz ao esgotamento a matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula (SIMÕES *et al.*, 2001).

Em suas modalidades, a maceração pode ser estática ou dinâmica. No primeiro caso, o contato do solvente com os fragmentos da planta é feito por um tempo estabelecido e em repouso. No caso da maceração dinâmica, a mistura em extração é mantida sob agitação por um tempo determinado (NAVARRO, 2005).

2.3.2 Ultrassom

O ultrassom é um processo de extração que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano. Estas ondas sonoras criam uma variação na pressão do líquido empregado no processo, gerando cavitação (ALVES *et al.*, 2013).

A extração promovida pelas ondas ultrassônicas é atribuída à pressão acústica. Durante a propagação das ondas ultrassônicas em meio líquido, acontece agitação do solvente como efeito mecânico, aumentando a superfície de contato entre o solvente e o sólido. Com as forças de cavitação resultantes, as bolhas podem se chocar de forma intensa e gerar pressão local causando a ruptura dos tecidos, favorecendo a liberação de substâncias intracelulares no solvente potencializando o processo de extração do solvente (SHALMASHI *et al.*, 2009; TOMA *et al.*, 2009). Ademais, fatores como solvente, tipo e quantidade de material vegetal e, especialmente, polaridade e tempo de extração, podem ser modificados a

fim de se aperfeiçoar esse método. Desta forma a utilização de ultrassom pode favorecer a eficiência de um processo de extração.

2.3.3 Turbólise

Nessa técnica, a extração ocorre concomitantemente com a redução do tamanho da partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento em rotações de 2000 a 5000 rpm. A redução drástica do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células favorece a rápida dissolução das substâncias aumentando a troca de compostos entre a droga e a solução extratora, resultando o quase esgotamento da droga (SIMÕES *et al.*, 2001).

Basicamente, o processo consiste em colocar o material vegetal (previamente triturado) em contato com o solvente escolhido e submetê-los ao movimento rotacional (cisalhamento) promovido por equipamentos como liquidificadores industriais. Nesse tipo de extração, a taxa de rotação fornece calor à mistura, o que aumenta a difusibilidade do solvente, porém, podendo destruir compostos termossensíveis. Por esse motivo, as pesquisas que utilizam esse tipo de extração a fazem em curtos espaços de tempo (5 a 15 minutos) controlando a temperatura (quase sempre abaixo de 40°C), aproveitando o calor gerado para promover a extração sem, no entanto, deixar a solução vegetal aquecida por um tempo capaz de degradar substancialmente os compostos presentes (FONSÊCA, 2005; CORDEIRO *et al.* 2006; SOUZA *et al.* 2010).

2.4 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, estes não são essenciais para o crescimento e reprodução, ao contrário dos produtos de metabolismo primário. Isso não significa que eles não são importantes, além disso, metabólitos secundários se formam em condições de estresse como,

infecções, fermentos, radiações ultravioletas, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Quimicamente, os compostos fenólicos possuem, no mínimo, um anel aromático e uma hidroxila como grupo funcional em sua estrutura (sendo a estrutura mais simples o fenol), possibilitando aos compostos fenólicos eliminar e estabilizar radicais livres (SIMÕES, 2001; MALACRIDA; MOTTA, 2005) e apresentam uma grande gama de efeitos biológicos incluindo ações antioxidantes, antiviral, antimicrobiana, antitumoral e atividade antibacteriana (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Existem cerca de 8000 estruturas diferentes para os compostos fenólicos. Alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Entre os diversos compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e ligninas (Figura 6) (NACZK; SHAHIDI, 2004). Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídios) e proteínas (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

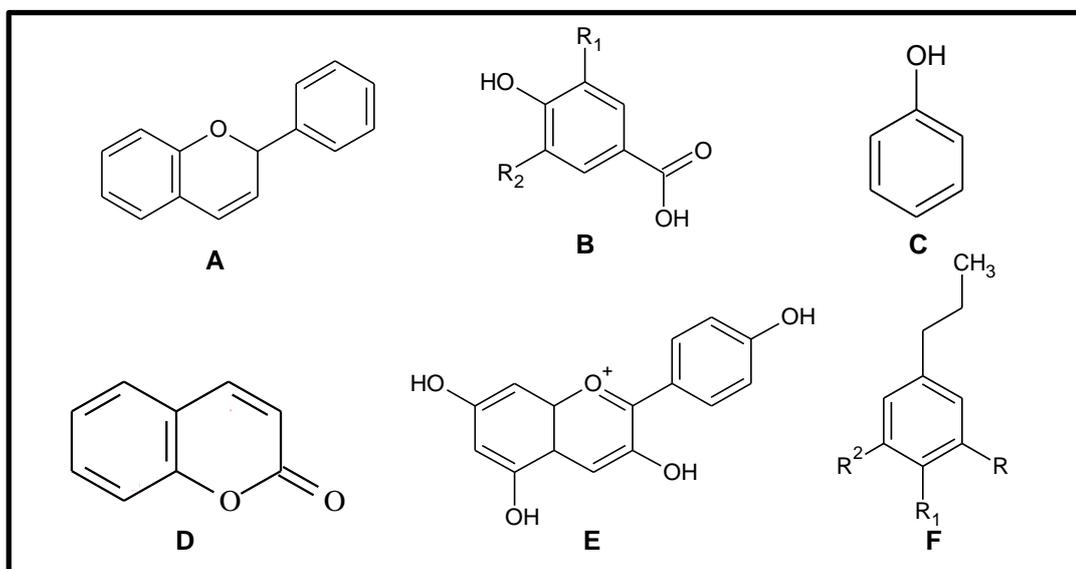


Figura 6. Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos, A- flavonoide, B- ácido fenólico, C- fenol simples, D - cumarina, E - tanino condensado e F- lignina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a extração dos compostos fenólicos das folhas de *Momordica charantia* L., variando solventes orgânicos e métodos de extração, e avaliar atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos obtidos.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar método de extração e solvente mais eficaz na extração de compostos fenólicos das folhas de *Momordica charantia* L.;
- Determinar a presença de compostos fenólicos dos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. e selecionar o extrato com maior concentração destes compostos;
- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*;
- Determinar a atividade citotóxica dos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. frente às linhagens tumorais humanas de PC3 (câncer de próstata), HCT-116 (câncer de colorretal), NCIH460 (carcinoma de pulmão) e K562 (leucemia mieloide crônica).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

As folhas de *Momordica charantia* L. foram coletadas no estado de Sergipe, na localidade do Povoado Colônia Treze do município de Lagarto, nas primeiras horas da manhã.

4.2 Preparação do Material

4.2.1 Preparação dos extratos vegetais

Após a coleta, as folhas inteiras foram colocadas na estufa de fluxo de ar contínuo a 40°C para secagem, após isso, foram moídas e peneiradas. A parte que não foi empregada de imediato foi armazenada em frasco de vidro fechado, a temperatura ambiente. Foram testados os métodos de maceração, ultrassom e turbólise. Para a extração dos compostos foram utilizados diferentes solventes com polaridade em ordem crescente (hexano > diclorometano > acetato de etila > etanol > etanol/água).

O método de maceração foi realizado em um recipiente fechado, contendo 5 g das folhas moídas da *M. charantia* L. e 100 mL do solvente extrator. O recipiente foi devidamente fechado, identificado e rotulado. As folhas permaneceram em contato com o líquido extrator durante dois dias com agitações ocasionais (SIMÔES *et al.*, 2001). Então, foi feita a filtração do líquido extrativo, que, em seguida, foi posto em rotaevaporador modelo LSRE-52CS3 da LOGEN scientific®, sob pressão reduzida, a temperatura de banho-maria de 40°C, até quase a secura. Após rotaevaporação, o

fim da secagem foi realizado em capela, a temperatura ambiente, até atingir massa constante. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados.

O estudo da extração por ultrassom foi realizado com 5 g das folhas moídas da *M. charantia* L. e 100 mL de líquido extrator, onde o tempo de extração foi de 30 minutos a 50°C no banho ultrassônico modelo USC-1450A da UNIQUE® (BRUNI *et al.*, 2014). Depois de feita a filtração do líquido extrativo foi posto em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura de banho-maria de 40°C, até quase a secura. Após rotaevaporação, os extratos obtidos foram pesados e armazenados.

O método de extração de turbólise foi realizado com 5 g das folhas moídas da *M. charantia* L. e 100 mL de líquido extrator. Depois de transferido o material vegetal com a solução extratora para uma proveta de 100 mL, foi levado à turbólise modelo TE-102 da TECNAL®. A velocidade máxima de 25.000 rpm do equipamento foi adotada para o experimento, durante um tempo de 5 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Após rotaevaporação, os extratos obtidos foram pesados e armazenados.

Além da utilização do solvente etanol de maneira individual, foram realizadas extrações com diferentes solventes com polaridade em ordem crescente como pode ser demonstrado na Figura 7, que representa fluxograma do planejamento experimental da presente pesquisa. Depois de feita a filtração do solvente inicial (hexano), o material vegetal foi reutilizado passando novamente pelos mesmos métodos com outro solvente (diclorometano), e sucessivamente com acetato de etila e etanol/água (70:30, v/v). Isso foi feito para cada método de extração descrito acima.

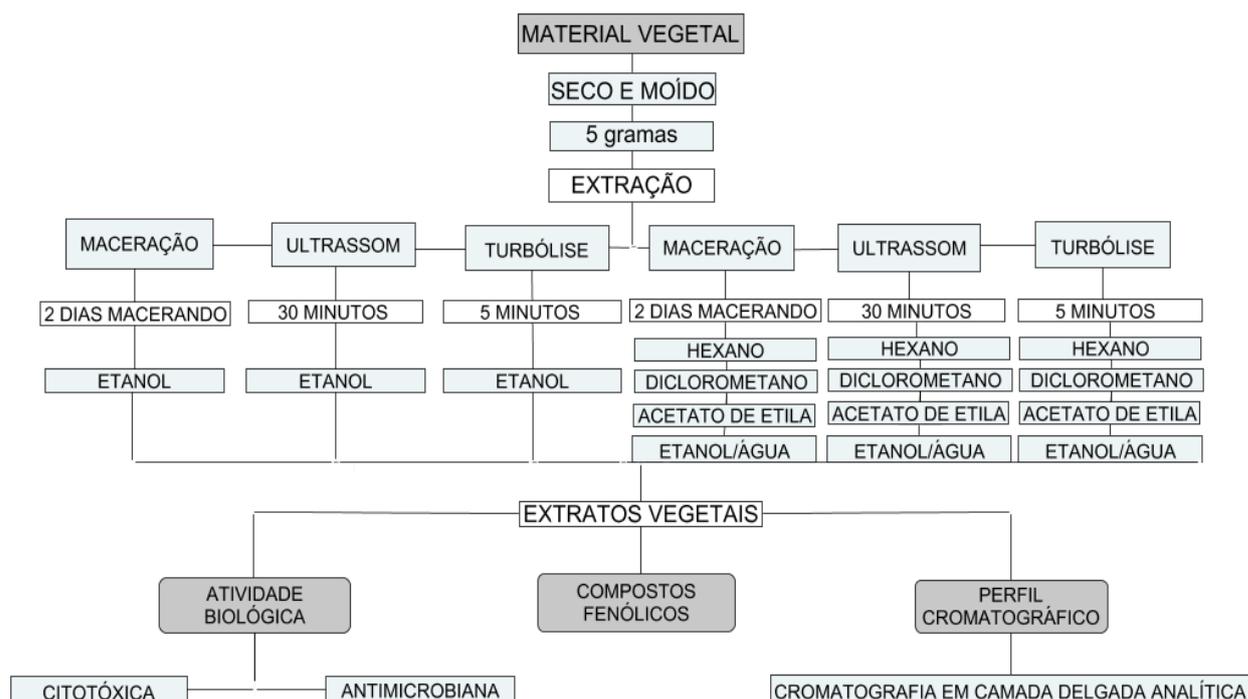


Figura 7. Fluxograma do planejamento metodológico da extração de compostos das folhas de *Momordica charantia*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Determinação de Compostos Fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu segundo metodologia proposta por Sousa *et al.* (2011) com modificações. Este método é baseado na redução do reagente Folin pelos compostos fenólicos das amostras com formação de um complexo azul. Foi utilizado o ácido gálico como padrão de referência para construção da curva padrão. Para a avaliação do teor de fenólicos totais nas amostras, as alíquotas dos extratos foram diluídas com os seus respectivos solventes usados na extração para o preparo de soluções com concentração de 2,5 mg/mL. Foram adicionados 400 µL de extrato, 8100 µL de água destilada e 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu no tubo de ensaio; a mistura foi levemente agitada e deixada em repouso por 3 minutos. Após esse período, 1000 µL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 10% (m/v) foram adicionados, agitado em vortex por

alguns segundos e deixados no escuro, à temperatura ambiente por 1 hora. Por fim, foram mensuradas as absorvâncias das amostras utilizando um espectrofotômetro modelo SP-2000UV num comprimento de onda (λ) igual a 720 nm, usando água destilada como branco, de acordo com a Figura 8. Os resultados foram apresentados como μg de equivalentes de ácido gálico por mL do extrato das folhas de *M. charantia* L. (EAG/mL).

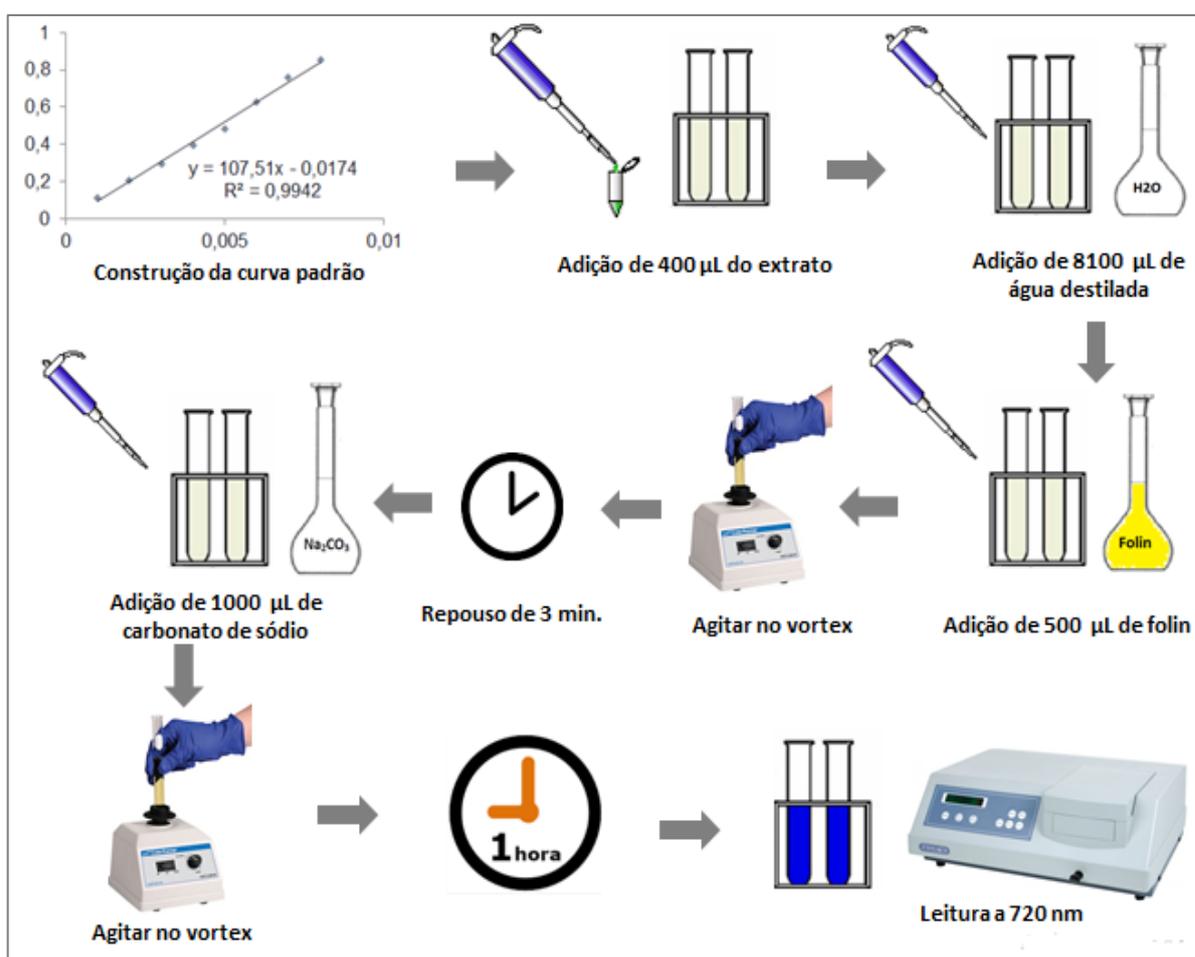


Figura 8. Fluxograma do método de Folin-Ciocalteu.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise de Perfil Cromatográfico

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

A análise cromatográfica foi feita sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica - FLUKA[®] (espessura de 0,2 mm) de fase normal, onde foram feitas a aplicação dos extratos com capilares. Como fase móvel foi utilizada hexano/acetato de etila. A revelação das substâncias nas placas foram realizadas sob luz UV (365 nm), após, foram imersas na solução de vanilina (SARAIVA, 2009, com modificações).

4.5 Determinação de Atividade Antimicrobiana

4.5.1 Teste de difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela metodologia de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel de filtro com diâmetro de 5 mm, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) para conhecer o perfil de atividade dos extratos. Para este ensaio foram utilizados alíquotas de 10 µL dos extratos na concentração de 50 mg/mL para impregnar os discos de papel. Anteriormente, os extratos foram dissolvidos com o seu solvente extrator respectivo.

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada em placas de Petri sobre as linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion – DIFCO) preparado conforme a indicação do fabricante e incubadas a 35°C por 18-20 horas. As cepas de *Candida albicans* foram incubadas, por um período igual, no caldo Sabouraud Dextrose (SBD). Após o preparo do meio de cultura a solução contendo o caldo nutriente e microrganismos incubados foram padronizados de acordo com a escala de 0,5 de Mc Farland, ou seja, a solução foi lida a absorvância de 600 nm, ajustada até obter a leitura de $0,100 \pm 0,02$, com a finalidade de padronizar a absorvância do inóculo para um teste de sensibilidade.

Os inóculos foram espalhados sobre as placas de Petri contendo Ágar Nutriente para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e as placas com Ágar Sabouraud para *Candida albicans*, com o auxílio do swab. Posteriormente, foram adicionados sobre as placas inoculadas os discos impregnados com os extratos. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h (bactérias) e por 48 h (levedura). Após este período foi realizada a leitura visual observando-se o halo formado ao redor dos discos contendo os extratos quantificando seu diâmetro em milímetros com o auxílio de paquímetro, conforme Figura 9.

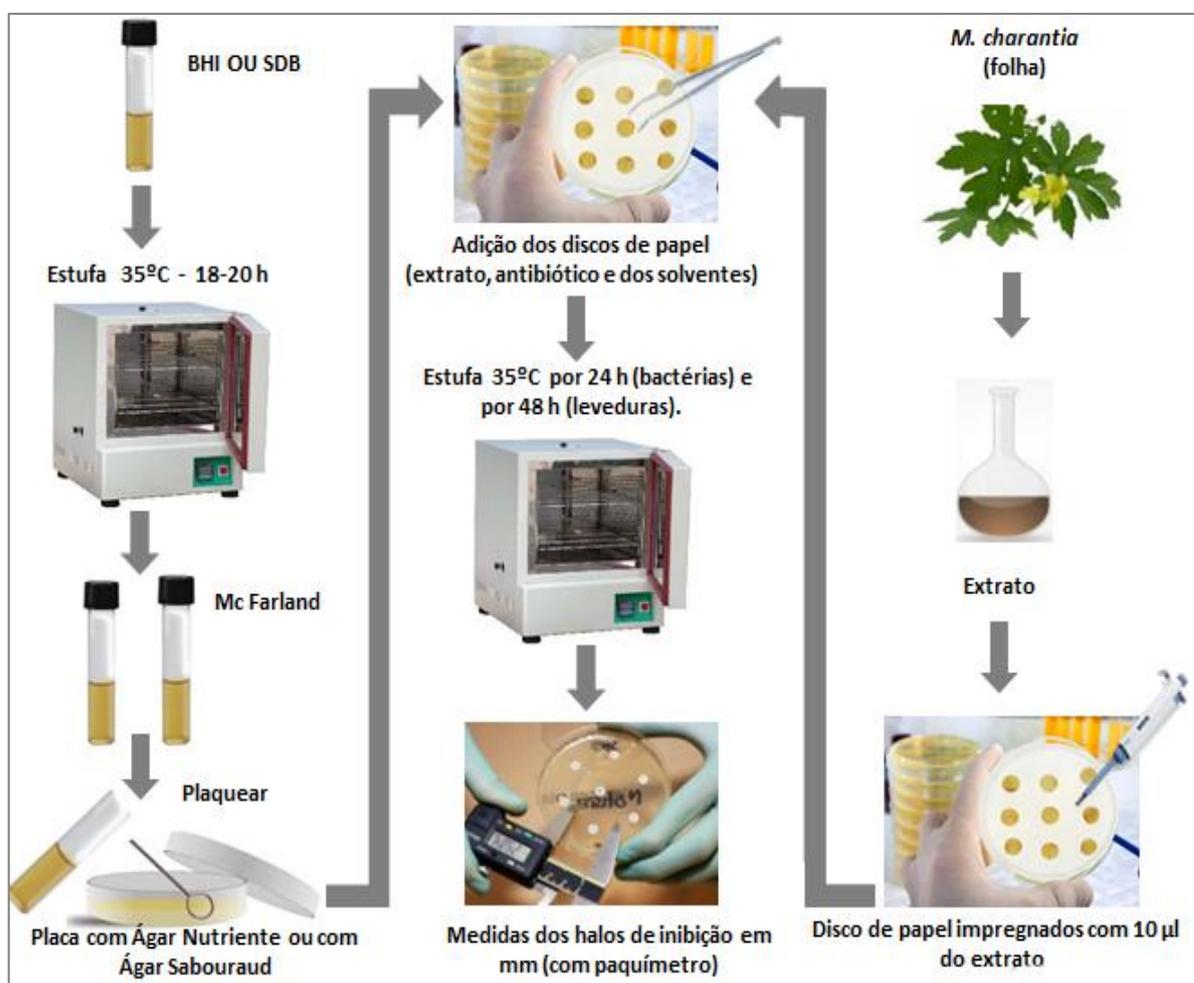


Figura 9. Fluxograma do teste de difusão em disco de papel.

Fonte: Adaptado de CAVALCANTE, 2010.

Como controle positivo foram utilizados os discos dos antibióticos (ofloxacino - 0,5µg para *S. aureus* e polimixina B - 300µg para *E. coli*) para bactérias e foram

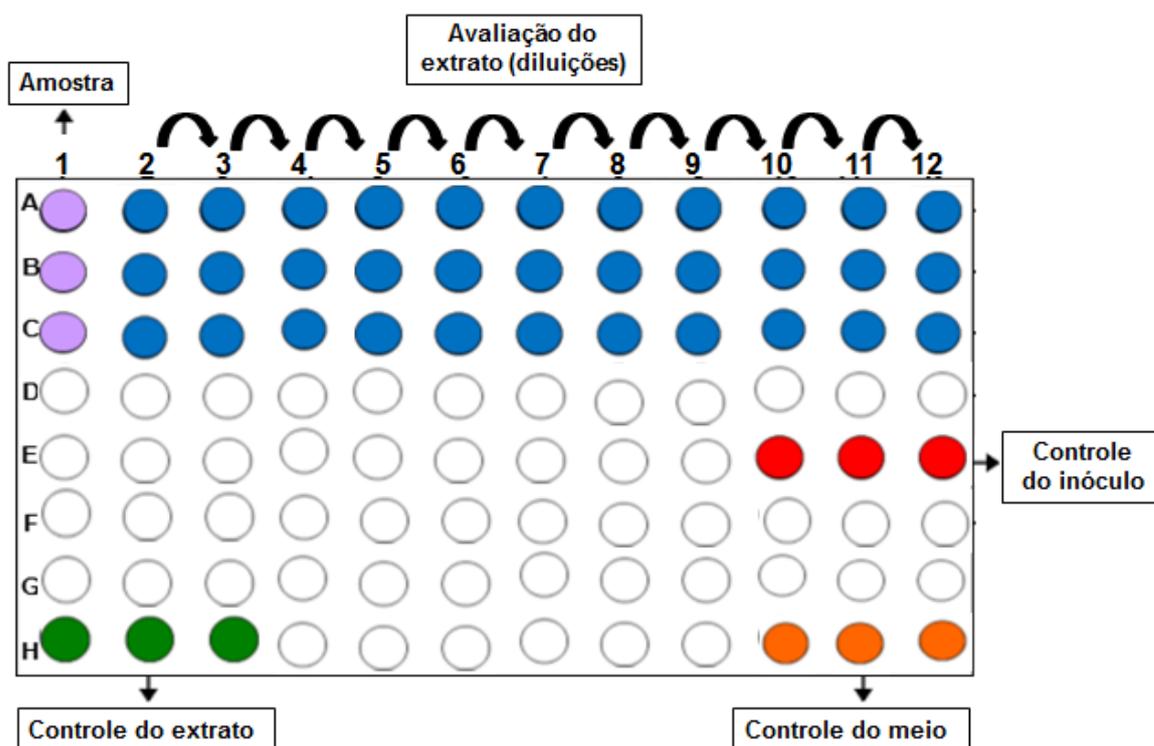
impregnados 5 µL de nistatina (100.000 UI/mL) para fungos leveduriformes e como controle negativo foram utilizados os discos impregnados com os solventes utilizados (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol/água (70:30, v/v) e etanol), mesmo que estes tenham sido evaporados antes da aplicação na placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.2 Microdiluição em caldo

A concentração inibitória mínima dos extratos foi avaliada a partir do método de microdiluição em caldo conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) adaptado, onde foram empregados pequenos volumes de inóculo adicionados a microplacas de acrílico estéreis contendo 96 poços dispostos em doze colunas (1 – 12) e oito linhas (A – H).

As microplacas de acrílico estéreis foram divididas de forma que a partir da 2ª coluna das linhas A, B e C, os poços foram preenchidos com 100 µL de BHI ou SBD. Em seguida foram adicionados na 1ª e 2ª colunas 100 µL dos extratos vegetais que apresentarem atividade antimicrobiana e foi realizada a diluição seriada (retirando 100 µL da 2ª coluna e transferindo para coluna ao lado das linhas A, B e C, e assim sucessivamente atingindo as concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,81, 3,90, 1,95, 0,97, 0,48 e 0,24 µg/mL). Adicionalmente, foram distribuídos 100 µL das suspensões dos microrganismos em cada poço das placas. Foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento dos inóculos e o controle dos extratos vegetais.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para o microrganismo teste. Após o tempo de incubação, as microplacas de 96 poços foram lidas em leitor de Elisa. Em cada microplaca foram testados um extrato em triplicata. A Figura 10 mostra esquematicamente o teste nas microplacas.



Legenda:

- Amostra (100µL de extrato + 100µL de inóculo)
- Avaliação do extrato (100µL de BHI + 100µL do extrato; depois descarta-se 100µL ao final das diluições, após adiciona-se 100µL do inóculo)
- Controle do inóculo (200 µL do inóculo)
- Controle do extrato (200 µL do extrato)
- Controle do meio (200 µL de BHI ou SBD)
- Não utilizados.

Figura 10. Representação esquemática da técnica da microdiluição em caldo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Determinação de Atividade Citotóxica

As análises de citotoxicidade foram feitas pelo método do MTT (análise colorimétrica baseada na conversão do sal de tetrazolium (MTT) em azul de formazan) que é comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade (BERRIDGE *et al.*, 1996). Foram utilizadas as linhagens tumorais, PC3 (câncer de próstata), HCT-116 (câncer de cólon-retal), NCIH460 (carcinoma de pulmão) e K562 (leucemia

mielóide crônica), onde foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, testadas na concentração única de 50 µg/mL. Após o tratamento, as células foram plaqueadas nas concentrações de 0,1 x 10⁶ cél/mL para linhagens PC3 e NCIH460, 0,3 x 10⁶ e 0,7 x 10⁵ cél/mL para as linhagens K562 e HCT-116, respectivamente com tempo de incubação de 72h. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os resultados foram expressos mediante avaliação da porcentagem de inibição do crescimento celular. Esta análise foi realizada em colaboração com os pesquisadores do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

4.7 Análise Estatística

Os resultados que foram apresentados neste estudo corresponderão à média de triplicatas. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% (P < 0,05) aplicando-se ANOVA, seguidos de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando o programa Prisma 5.0 e Excell (2010). O detalhamento das análises estatísticas de compostos fenólicos encontra-se no Anexo (p. 62).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação de Compostos Fenólicos

Para determinar o teor de fenóis totais foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como composto fenólico padrão. Foi obtida uma curva de calibração, cuja equação da reta é expressa por $y = 107,51x - 0,0174$, sendo utilizada para o cálculo de compostos fenólicos nos extratos com um coeficiente de determinação de 0,9942 (Figura 11), onde Y corresponde à absorbância e X corresponde à concentração de fenóis. O conteúdo de fenólicos nas amostras foi expresso como μg de equivalentes de ácido gálico por mL do extrato das folhas de *Momordica charantia* L. (μg EAG/mL).

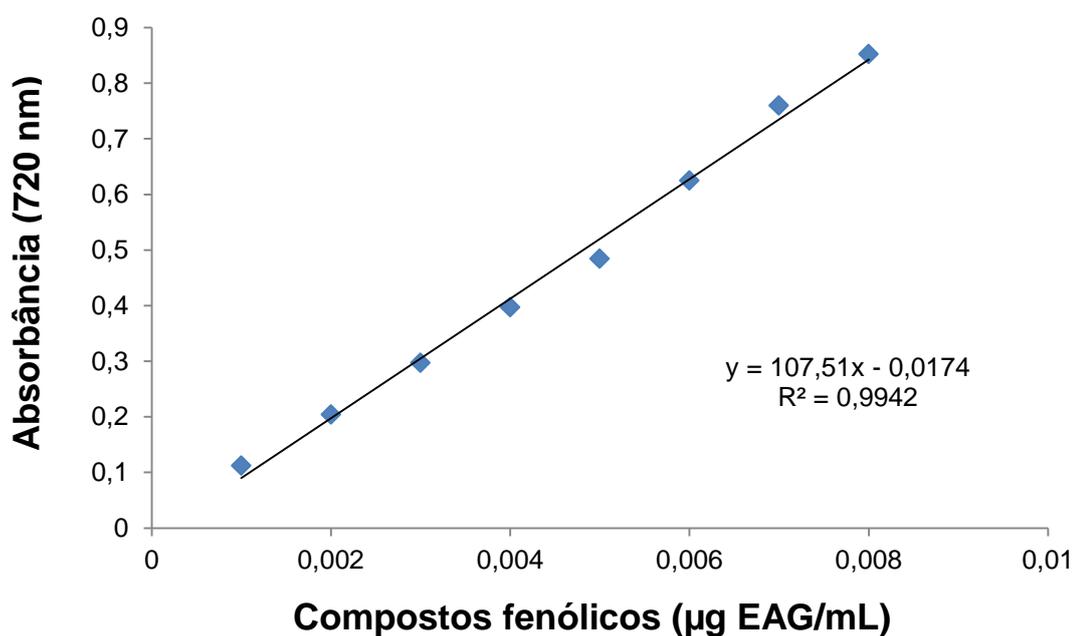


Figura 11. Curva padrão de ácido gálico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados para quantificação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos das folhas de *Momordica charantia* L. são apresentados na Figura 12.

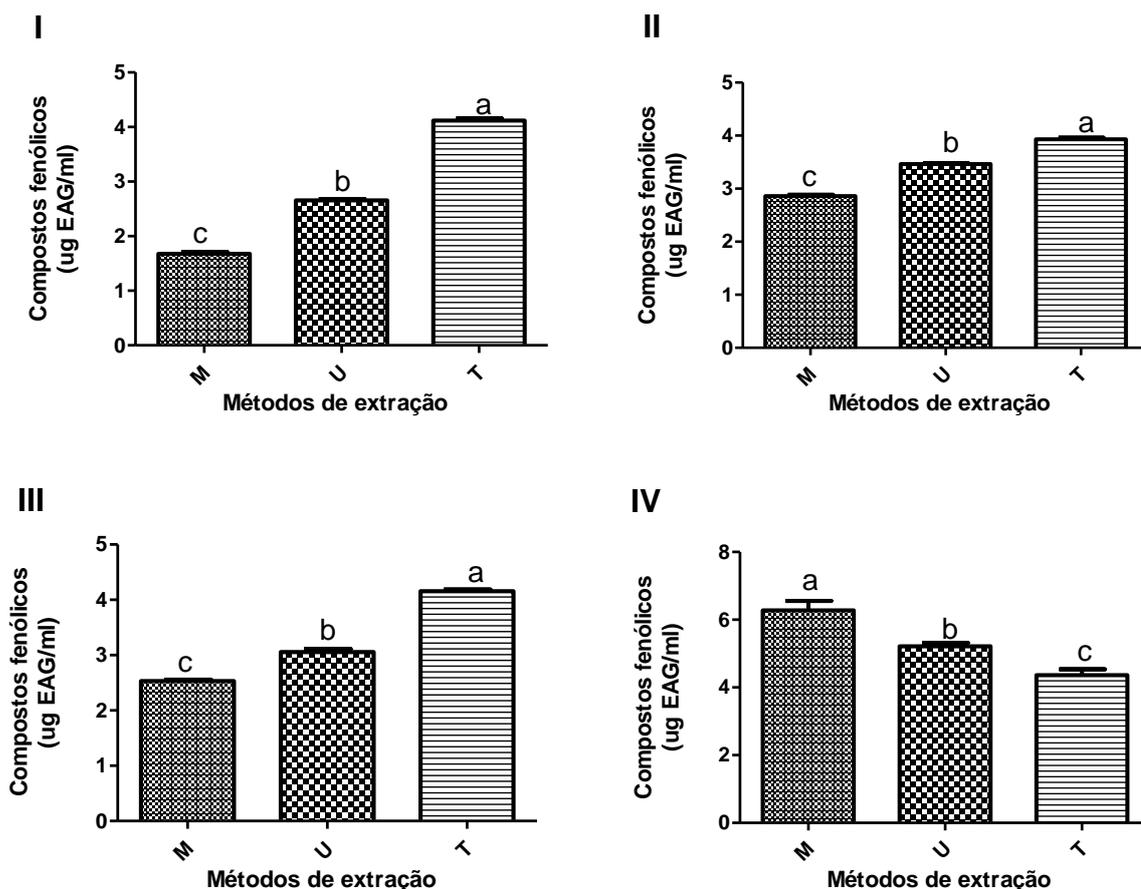


Figura 12. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos obtidos por diferentes métodos e diferentes solventes - (I) hexano, (II) diclorometano, (III) acetato de etila e (IV) etanol/água 70:30, v/v. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor – Prisma 5.0.

A partir da análise da Figura 12, pode se observar que houve diferença estatística entre os teores de compostos fenólicos obtidos quando aplicados diferentes métodos de extração ($p < 0,05$) para o mesmo solvente (vide anexo). Pode se inferir que o método para extração que obteve maior teor de compostos fenólicos das folhas de *Momordica charantia* L. para os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila foi pela turbólise (T). Este método de extração apresenta altos rendimentos devido à trituração da droga vegetal aliada à homogeneização contínua do solvente e da droga vegetal, desse modo ocorre redução do tamanho das partículas e rompimento das células, o que leva quase ao esgotamento da amostra vegetal (ALMEIDA *et al.*, 2010).

De acordo com Clementino *et al.* (2016) e Migliato *et al.* (2011), ao observarem a melhor técnica de extração, constataram-se que os extratos obtidos por turbólise foi mais eficaz dentre os métodos utilizados. As elevadas forças de

cisalhamento da turbólise empregada nesses trabalhos permitiu rendimento satisfatório, uma vez que o vegetal sofre concomitantemente com a redução do tamanho da partícula. Estes dados podem ser comparados com estudo realizado por Marzouk *et al.* (2009), que compararam componentes extraídos por diferentes solventes foram eficientemente obtidos pelo processo de turbólise a partir das folhas de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae).

Embora, o tamanho da partícula também é conhecido por influenciar a área de superfície de um material sólido. Partículas menores apresentam uma maior área de contato com o líquido extrator, mas, neste caso, nem sempre há um aumento na eficiência do processo extrativo (VASCONCELOS *et al.*, 2005). Vasconcelos *et al.* (2005) ainda explicam que o poder de penetração dos solventes depende, por exemplo, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair e principalmente do processo de extração. Partículas muito pequenas tendem a formar uma camada compacta de pó, dificultando a penetração do solvente. Contudo, foi visto que o presente trabalho indicou a turbólise como o método mais eficiente para a extração das substâncias solúveis nos diferentes solventes, não apresentando esse interferente, provavelmente devido à homogeneização obtendo uma suspensão permanente durante a extração, evitando a compactação do material vegetal.

Outro método que se destacou na extração de fenóis totais foi o ultrassom (U). A eficiência dessa técnica nas extrações de compostos fitoquímicos deve-se, em grande parte, ao fato de que o ultrassom promove, por meio de suas ondas sonoras, uma variação de pressão no líquido conseqüentemente produzindo cavitações (colapso de bolhas) (HUIE *et al.*, 2002), as bolhas se chocam de forma intensa e gera pressão local causando a ruptura dos tecido, o que aumenta a permeabilidade da parede celular, facilitando, assim, a penetração do solvente nas células vegetais e uma melhor extração dos compostos desejados (JACQUES, 2007).

A eficiência das ondas ultrassônicas em processos de extração também é reportada por outros autores estudando diferentes matrizes vegetais. Para Ko, Cheigh & Chung (2014) e Ying (2011), mostraram que o ultrassom é uma alternativa promissora para extração de compostos fenólicos totais, permitindo a obtenção de extratos ricos desses compostos quando submetidos a um tempo de extração de 20 a 40 minutos numa temperatura de 60°C, uma vez que tempos de extração

superiores podem ocasionar a degradação de compostos sensíveis às variações de temperatura. Além disso, o processo de ultrassom aumenta os poros das paredes celulares das plantas resultando numa melhor transferência de massa do soluto para o solvente, reduzindo o tempo de extração. Em relação ao rendimento do método, a extração assistida por ultrassom foi capaz de extrair 60% dos ácidos fenólicos e flavonoides totais extraídos pelo método utilizado para caracterização destas substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (MAZZA, 2017). Oliveira *et al.* (2016) e obtiveram rendimentos de 12,76% para extração por ultrassom e 7,95% para extração por método convencional.

Em geral, é conhecido que o aumento da temperatura da água do banho ultrassônico (20-50°C) promove uma maior solubilidade dos compostos a serem extraídos, além de diminuir a viscosidade e tensão superficial do solvente, o que facilita a retirada dos metabólitos presentes nas amostras vegetais, incluindo os compostos fenólicos, e, assim, aumentar o rendimento do processo extrativo (WISSAM, 2014), desta forma os fatores relacionados aos métodos extrativos vão estar ligados à agitação, temperatura e tempo. A agitação e a temperatura podem diminuir o tempo de extração, a primeira por interferir diretamente na velocidade de dissolução, e a outra por aumentar a solubilidade das substâncias (WANG, 2011).

Alguns métodos extrativos consagrados estão listados em farmacopéias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) como maceração e percolação ainda são os mais utilizados em pesquisas. Entretanto, tem-se buscado adicionar processos tecnológicos na obtenção de extratos, com isso, métodos como a extração por ultrassom e turbólise vêm ganhando espaço no meio científico. Ambos são citados na literatura (MIGLIATO *et al.*, 2011; POLITI *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2010) como que extraem grandes quantidades de princípios ativos, apresentando rendimentos superiores a outras técnicas. Além disso, se tratam de técnicas simples, rápidas, que apresentam elevada reprodutividade e permitem o uso de amostras de quantidades e tamanhos variados (FÔNSECA, 2005).

A polaridade do solvente também interfere significativamente na retirada dos compostos presentes nas amostras vegetais, pois está relacionada com a seletividade do método, bem como o grau de polaridade do grupo a ser extraído determina o solvente a ser utilizado (LEONG e SHUI, 2002). Neste contexto, observa-se que o processo de extração utilizando solventes com diferentes

polaridades possibilitou a extração de compostos fenólicos em quantidades variadas. Essa diferença significativa entre o conteúdo fenólico total dos extratos sugere a influência do solvente utilizado frente ao perfil dos fitoquímicos presentes nas amostras. Os resultados indicam que os compostos fenólicos da *M. charantia* podem ser polares, porque os solventes orgânicos polares, mistura de etanol/água (70:30, v/v) e etanol (Figura 13), foram mais eficazes na extração dos compostos fenólicos em comparação com os solventes menos polares, como hexano e diclorometano. Os compostos fenólicos também foram extraídos desta planta em estudos anteriores usando solventes polares, incluindo água (HORAX *et al.* 2010; TAN, 2014). É preciso salientar que a água quando associada a solventes orgânicos, ajuda a tornar o meio um pouco mais polar, favorecendo, dessa forma, a extração de compostos fenólicos (LAPORNIK *et al.*, 2005; LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005).

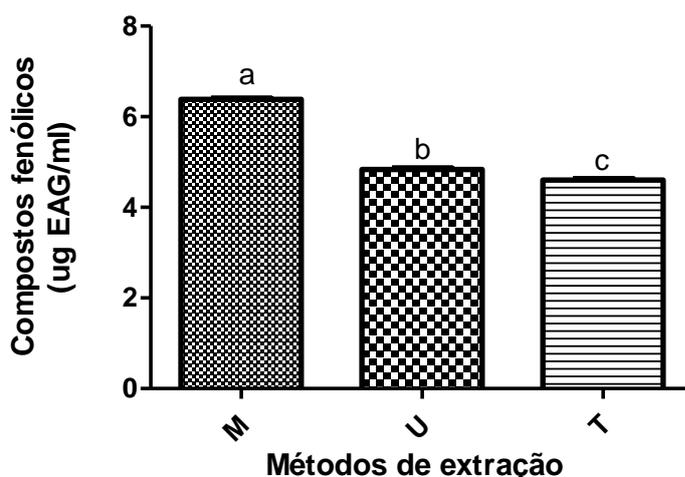


Figura 13. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos etanólicos obtidos por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor – Prisma 5.0.

Em relação a Figura 13, pode se notar que o melhor método para extração de compostos fenólicos das folhas de *Momordica charantia* L. quando utilizado o solvente etanol foi a maceração. O solvente hidroalcoólico (Figura 12 IV) e etanólico (Figura 13) mostraram perfis semelhantes sobre os métodos.

Os resultados também indicaram que a natureza do solvente de extração também pode afetar em grande medida o tipo e a concentração de compostos

extraídos e a medição da atividade biológica *in vitro*. Contudo, Melo *et al.* (2003) ressaltam que os compostos bioativos em uma matriz vegetal apresentam polaridade diferenciada. Desta forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar do fitoquímico, o que explica a inexistência de um procedimento de extração universal.

De acordo com os dados, os maiores rendimentos para ambos solventes foram observados com os extratos preparados a partir das macerações das folhas de *M. charantia*. O método de maceração é bastante utilizado, e o maior tempo de contato da droga vegetal com o solvente pode favorecer a extração de metabólitos secundários. Entretanto, de acordo com Trusheva *et al.*, (2007), um tempo de maceração mais longo seria levar a mudanças químicas, particularmente a oxidação de fenólicos compostos como flavonoides, indicando que o período de maceração inferior a 48 h. Em controversa, Cunha *et al.*, (2006) constatou que um período mais longo aumenta o rendimento da extração material. Portanto, é de grande importância usar um período de maceração ideal em combinação com solventes de extração adequados para obter compostos desejáveis.

5.2 Análise de Perfil Cromatográfico

Tendo-se a fase estacionária comumente utilizada – sílica gel (polar), foi incumbida apenas a tarefa da seleção de solventes adequados para a realização do experimento, uma vez que, em caso de fases estacionárias polares, é normal utilizar solventes de baixa ou média polaridade. Então, obtendo-se essa informação foi utilizada como eluente a mistura de hexano com acetato de etila, de média polaridade, sendo os solventes julgados como mais adequados. Dessa forma, a fase móvel foi preparada nas seguintes condições: (50:50; v/v) para o extrato hidroalcoólico, (60:40; v/v e 95:5; v/v) para o extrato etanólico, (70:30; v/v) para o extrato de acetato de etila e (90:10; v/v) para o extrato diclorometânico e hexânico.

A análise de cromatografia em camada delgada analítica de drogas vegetais permite obter um perfil ("*fingerprint*") da amostra e comparar com o perfil de uma droga padrão, para assegurar que os componentes chaves de uma amostra em particular estão presentes na amostra analisada. Contudo, nesse estudo pôde-se

então fazer análise do comportamento da banda com auxílio do solvente utilizado a partir do estudo das interações entre a fase móvel e fase estacionária e entre essas com os componentes da amostra, obtendo-se os resultados apresentados na Figura 14.

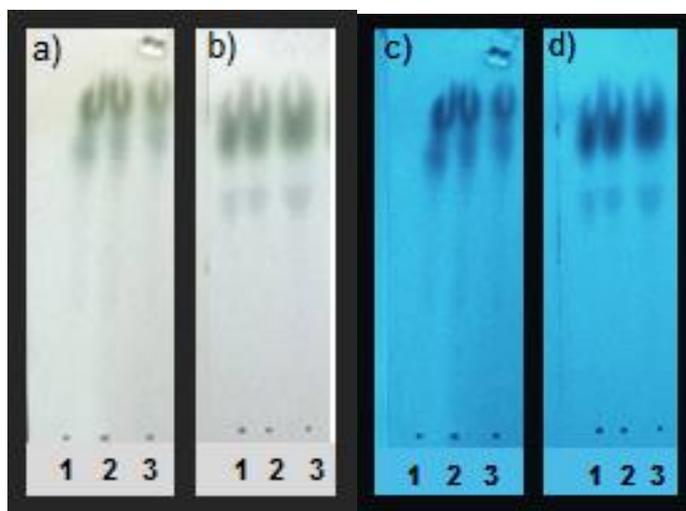


Figura 14. Placas cromatográficas em sílica gel (a) e (b) como fase móvel hexano e acetato nas proporções 60:40 e 95:5, respectivamente. (c) e (d) placas cromatográficas reveladas sob luz UV. 1 – Maceração; 2 – Ultrassom; 3 – Turbólise.

Fonte: Elaborado pelo autor

Na cromatografia em coluna delgada analítica, a utilização do hexano:acetato de etila (60:40 e 95:5) serviu para a verificação da existência de constituintes menos polares. É visto na placa (Figura 14) que todas as alíquotas do extrato das folhas de *Momordica charantia* L. nos diferentes métodos de extrações provocaram uma forte interação dos componentes do extrato com a fase móvel (média polaridade). Quanto aos perfis cromatográficos observados para cada amostra, estes apresentam-se semelhantes, isso pode ser notados através da semelhança entre os seis pontos de cada placa. Os dois cromatogramas (A) e (B) apresentaram bandas visíveis a olho nu de coloração verde e verde oliva, correspondente a pigmentos fotossintéticos presentes nas folhas desta planta que interagem diferencialmente com a fase móvel, visto que proceder a revelação sob luz UV (C) e (D) a mancha absorve a energia na faixa UV.

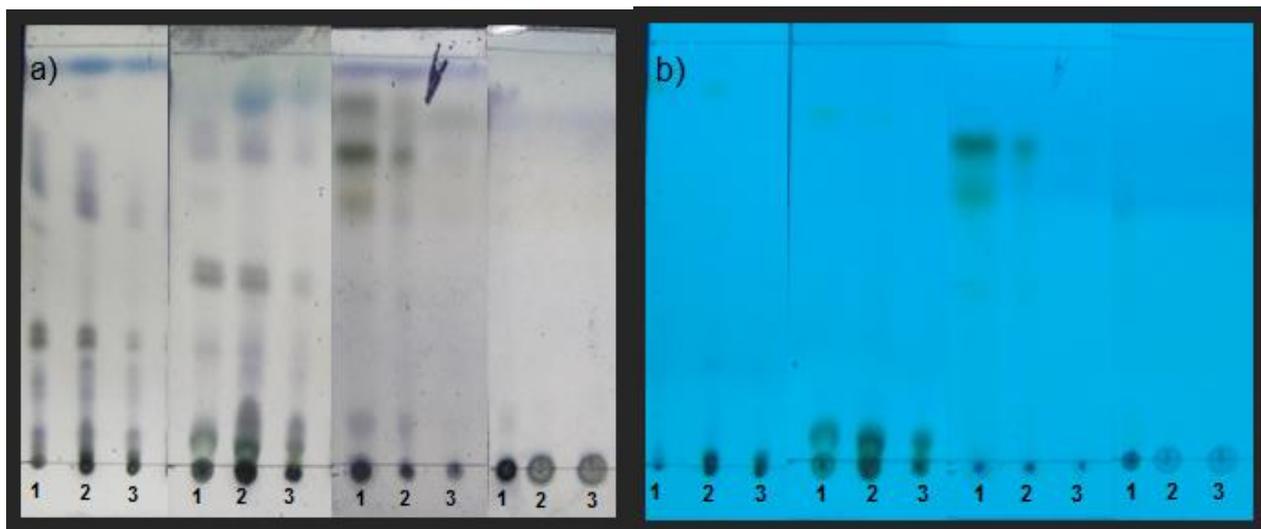


Figura 15. Placas cromatográficas em sílica gel (a), da esquerda para direita, com a fase móvel hexano e acetato nas proporções (90:10) extrato de hexano e diclorometano, (70:30) extrato de acetato de etila e (50:50) extrato hidroalcoólico, reveladas em vanilina. (b) placas cromatográficas sob luz UV. 1 – Maceração; 2 – Ultrassom; 3 – Turbólise.

Fonte: Elaborado pelo autor

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos com diferentes solventes (Figura 15) apresentaram manchas não havendo a formação de uma banda bem característica de uma para outra. Embora, utilizando-se solventes de polaridade variada sobre matrizes vegetais, é possível obter diferentes classes químicas presentes nos extratos produzidos a partir de diferentes solventes (LAPORNIK *et al.*, 2005). Isso ocorre pelas diferentes misturas que promove separação das amostras, no qual observa-se que pequenas variações na composição da fase móvel levam a grandes alterações no deslocamento das manchas. Na análise por cromatografia em camada delgada analítica, utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (90:10 e 70:30), vanilina e sob a luz UV como reveladores, revelou que o composto reagiu, visto que estas são arrastadas a velocidades distintas do ponto de aplicação, o que está atribuído pela diminuição da polaridade correspondente.

Os resultados obtidos possibilitaram analisar o comportamento de alguns compostos em relação às suas características polares ou apolares em meio ao eluente. A partir disso, entende-se que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra, pela superfície do adsorvente. Portanto, a escolha da fase móvel tem que considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel. Deve-se tomar como base a “série eluotrópica” dos

solventes (solventes em ordem de polaridade). O poder de eluição está diretamente relacionado com a polaridade (COLLINS *et al.*, 2006).

5.3 Determinação de Atividade Antimicrobiana

5.3.1 Teste de difusão em disco de papel

Atividade antimicrobiana foi avaliada através do método de difusão em disco. Os resultados mostraram que dos 15 extratos das folhas de *M. charantia*, 1 apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados. O extrato de etanol/água (70:30, v/v) por maceração (EA1) obteve o melhor resultado com o halo de inibição de 10,7 mm sobre as cepas de *S. aureus*, conforme mostrado na Figura 16. A solução do controle negativo (composta pelo solvente de extração) não apresentou formação de halo de inibição contra os microrganismos em estudo, portanto, estes solventes não foram interferentes da atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato utilizado.



Figura 16. Halos de inibição contra *Staphylococcus aureus* do extrato de etanol/água (70:30, v/v) por maceração – EA1.

Fonte: Elaborado pelo autor

No teste de antibiograma das folhas de *M. charantia*, verificou-se que o extrato vegetal hidroalcoólico apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa de *S. aureus* (Figura 16), demonstrando que a água é um solvente eficaz que pode ser usado para a extração de materiais vegetais bioativos. Esta informação é importante porque, de acordo com alguns estudos, a água geralmente é o principal solvente utilizado na medicina popular para obter preparações de plantas. Muitas dessas preparações são usadas para tratar condições que normalmente resultariam em infecções bacterianas (BRANDÃO *et al.*, 2016).

O resultado positivo obtido neste teste de ação antimicrobiana do extrato de *M. charantia* L. contra as cepas de *S. aureus* numa concentração inibitória mínima de 50 mg/mL corroboraram com Ponzi *et al.*, (2010), Lorenzi (2000) e Khan (1998) que já defendiam o potencial farmacológico ativo desta planta corroborando que os extratos das folhas (hidroalcoólico) de *M. charantia* têm demonstrado clinicamente e experimentalmente atividade antimicrobiana. Coutinho *et al.*, (2010) relataram que o extrato alcoólico de *M. charantia* poderia ser uma fonte de metabolitos com atividade antibacteriana modificante a ser usado contra bactérias de *S. aureus* multirresistentes. Para Shoba *et al.* (2014) a zona de inibição máxima para *S. aureus* foi de 8 mm sendo que o presente trabalho apresentou resultado superior com 10,7 mm.

Por outro lado, não foi encontrada atividade antimicrobiana frente à concentração utilizada de extrato para os microrganismos *E. coli* e *C. albicans*. Resultado similar foi observado por Lima (2008), que avaliou a atividade antimicrobiana do extrato aquoso da *Momordica charantia* L, sobre a bactéria de *Escherichia coli*, também verificou que seus extratos não apresentaram grande eficácia sobre a bactéria utilizada. Em um experimento utilizando extratos de diclorometano, acetato de etila e etanol também não foram eficazes contra *E. coli*. Entretanto, o extrato de *M. charantia* mostrou atividade antibacteriana notável contra *S. aureus* (9,8 ± 1,2 mm) (CEBALLOS *et al.*, 2017).

Esses resultados, contudo, discordam dos observados por Ponzi *et al.* (2010), que foram verificados halos de inibição de 12 mm para *C. albicans* para o extrato da planta inteira (melão-de-São-Caetano). Enquanto Mada *et al.* (2013), demonstraram que o extrato das folhas da mesma planta exibiu atividade antibacteriana

evidenciando maior halos de inibição de 17 mm para *E. coli*, 16 mm para *S. aureus*, 15 mm para *B. subtilis* e 14 mm para *P. aeruginosa* em relação ao extrato hidroalcoólico.

Os extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila das folhas apresentaram atividade antimicrobiana menos pronunciada em comparação com o extrato hidroalcoólico. Esses resultados estão de acordo com Jagessar *et al.* (2008). Os mesmo autores informaram que os extratos de hexano, diclorometano e acetato de etila não tiveram uma atividade antimicrobiana significativa, o que certamente indica que os extratos hidroalcoólico contêm maior concentração de agentes antimicrobianos ativos sobre determinada cepa. No entanto, isso também pode ser atribuído à natureza de polaridade de agentes antimicrobianos ativos.

Por conseguinte, é possível sugerir que após o processo de evaporação, os compostos químicos ativos da *M. charantia* que nos extratos que não apresentaram ação antimicrobiana contra os patógenos testados foram evaporados durante o processo de evaporação dos extratos. E o extrato que não demonstrou ação nas outras linhagens é provável que os princípios ativos que possuem atividades são diferentes, para as diferentes cepas testadas (SILVA, 2011). Para Gobbo-Neto e Lopes (2007), há vários fatores que podem interferir no teor de metabólitos secundários nas plantas, dos quais os compostos fenólicos fazem parte. Dentre eles estão a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, adição de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataque de patógenos.

Além disso, a parede celular Gram-negativa (composta de lipopolissacarídeos) é uma estrutura complexa e multicamada, o que torna o acesso à membrana mais restrito e barreira a muitas substâncias ambientais, incluindo antibióticos sintéticos e naturais (RAKHOLIYA *et al.*, 2014). Contudo, é válido ressaltar que mesmo com a ausência de halo de inibição dos outros extratos testados, não pode ser descartada a possibilidade da presença de substâncias antimicrobianas em outras partes da planta ou a possibilidade da presença de substâncias antimicrobianas nestes extratos, pois o volume das partículas influencia a taxa de difusão, ou seja, moléculas de maior massa molecular difundem-se no meio com menor velocidade uma vez que o solvente usado para dissolver os

produtos naturais é evaporado antes de colocar discos na superfície do ágar (VALGAS *et al.*, 2007). Para uma melhor avaliação seriam necessárias repetições dos testes, com diferentes concentrações.

Os resultados apresentados também indicaram que não foi encontrada uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos totais e a atividade antimicrobiana, pois o extrato etanólico que demonstrou perfil semelhante de compostos fenólicos com o extrato hidroalcoólico, não apresentou atividade antimicrobiana.

5.3.2 Microdiluição em caldo

Foi selecionado o extrato que apresentou halos de inibição de crescimento do microrganismo testado (*S. aureus*) para ser submetido à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Através da técnica de microdiluição em caldo verificou-se a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *Momordica charantia* L, em baixas concentrações sobre a bactéria de *S. aureus* (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Momordica charantia* em diferentes concentrações frente às espécies estudadas.

<i>S. aureus</i>	
Concentração µg/mL	Amostra EA1
500	S
250	S
125	S
62,5	R
31,2	R
15,6	R
7,81	R
3,90	R
1,95	R
0,97	R
0,48	R
0,24	R

Amostra EA1 (extrato de etanol/água 70:30,v/v por maceração) e **S** (sensível); R (resistente).

Fonte: Elaborado pelo autor

O extrato hidroalcoólico demonstrou inibição em diferentes concentrações (Figura 17). Sua atividade é diretamente atribuída à presença de certos fitoquímicos presente nas plantas que contribuem para a sua propriedade bacteriana. Estes compostos botânicos extraídos dependem do tipo de solvente utilizado no procedimento de extração. Além disso, este vegetal é uma planta que cresce facilmente em áreas tropicais, estando adaptada a diferentes fatores (sazonalidade, luminosidade, pH do solo, etc.) o que pode contribuir para o acúmulo de substâncias polares em sua biomassa (GOMES, 2011). Assim, utilizando-se solventes polares (hidrofílicos), tais como água destilada e etanol, obtêm a presença minoritária de constituintes hidrofílicos no material vegetal.

Estudos anteriores também demonstraram que a *M. charantia* é muito rica em triterpenos, proteínas e esteroides. É especulado que as atividades antimicrobianas dos triterpenos dependem das interações entre seus componentes lipídicos com a carga superficial líquida das membranas microbianas, o que resulta na permeabilidade da membrana e em vazamentos de materiais intracelulares (TROMBETTA *et al.*, 2005).

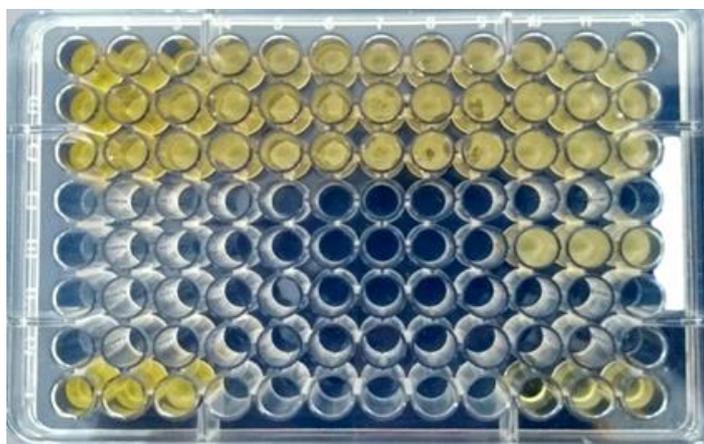


Figura 17. Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico (EA1) contra bactéria *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Elaborado pelo autor

A atividade antibacteriana das folhas desta planta foi anteriormente constatada por Braca *et al.* (2008), que encontraram resultados com valores de CIM variando de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ sobre as estirpes de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Rakholiya (2014) que, ao analisar diferentes extratos

hidroalcoólicos (75 e 100% de EtOH) de *M. charantia*, apresentaram valores de 312 e 156 µg/ml, respectivamente. Segundo Ceballos *et al.* (2017), os valores de CIM do extrato de alcoólico das folhas desta planta variaram de 31,25 a 1000 µg / mL, apresentaram atividade antimicrobiana significativa de 50 a 99% contra *S. aureus*. Resultados esses, que quando comparados com os encontrados no presente trabalho se mostram semelhantes a depender das condições de extração (variáveis de estudo).

Porém, há estudos que evidenciam atividade antimicrobiana das folhas desta planta, como o experimento realizado por Mada *et al.* (2012), que encontraram atividade antifúngica e bactericida do seu extrato. Costa *et al.* (2011) determinaram a CIM do extrato das folhas de *M. charantia* para diferentes bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*). Os extratos das folhas foram analisados e demonstraram inibição, variando os valores entre 32 µg/mL a 128 µg/mL.

A microdiluição em caldo tem sido considerada um excelente método para analisar a atividade de antimicrobianos, com maior sensibilidade quando comparados aos outros métodos (ANDEWS 2001; ALVES *et al* 2008).

5.4 Determinação de Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada conforme preconiza o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) (Skehan *et al.*, 1990). Os resultados obtidos através do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos na concentração de 50µg/mL estão apresentados na Tabela 2. Apenas as substâncias que apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) são escolhidas para avaliações subsequentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral. Dentre as 15 amostras testadas, dois extratos se mostraram promissores: DC2 e AE1. O extrato DC2 mostrou valores de inibição acima de 90% contras as linhagens HCT-116 (câncer de cólorretal) e NCIH 460 (carcinoma de pulmão). Já o extrato AE1 exibiu atividade em células de câncer de próstata e de pulmão.

Tabela 2. Inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos das folhas de *M. charantia* frente a linhagens tumorais testados na dose única de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostra	Linhagens							
	HCT-116		PC3		K562		NCIH 460	
	Média %	SEM %	Média %	SEM %	Média %	SEM %	Média %	SEM %
DC2	93,93	0,27	60,05	2,56	73,91	1,20	93,35	1,10
AE1	69,29	2,08	81,80	0,09	59,96	2,27	97,36	0,34

Os dados estão apresentados como média dos valores de percentual de inibição do crescimento celular, quando comparado ao controle, em µg/mL e Erro Padrão da Média (SEM) de experimentos realizados pelo método do MTT após 72 horas de incubação. Os valores foram calculados a partir de regressão não linear, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. DC2 (extrato diclorometânico por ultrassom), AE1 (extrato de acetato de etila por maceração), HCT-116 (câncer de cólorretal), PC3 (câncer de próstata), K562 (leucemia mielóide crônica) e NCIH460 (carcinoma de pulmão).

Fonte: Elaborado pelo autor

Chia-Jung *et al.* (2012) avaliaram o efeito do extrato de *Momordica charantia* sobre a atividade citotóxica em quatro linhagens celulares de câncer humano: células de carcinoma nasofaríngeo (HONE-1), células de adenocarcinoma gástrico (AGS), células de carcinoma cólorretal (HCT-116) e células de adenocarcinoma pulmonar (CL1-0). Este extrato mostrou atividade citotóxica em relação a todas as células cancerígenas testadas. Segundo Alshehri (2016), o extrato desta planta tem um efeito potencial para diminuir a taxa de proliferação de diferentes linhas celulares de câncer especialmente câncer de cólorretal. Esse resultado corrobora com a presente pesquisa que constatou uma potente ação citotóxica do extrato DC2 sobre essa linhagem.

A Cucurbitacina B (cucB), uma triterpenoide dos vegetais da família Cucurbitaceae que compõem a *M. charantia* induz a apoptose em células de câncer de adenocarcinoma de cólon humano (CHIA-JUNG *et al.*, 2012; PITCHAKARN *et al.*, 2011). Curiosamente, na Ásia, as pessoas consomem frutas e/ou folhas do melão-de-São-Caetano como alimento, e este e outros componentes da dieta podem estar ligados a baixas incidências de câncer de próstata (PITCHAKARN *et al.*, 2011). Os

efeitos citotóxicos do extrato das folhas de *M. charantia* em células de câncer de próstata de rato *in vitro* e *in vivo* foram investigados, mostrando que exerce efeitos inibitórios na progressão destas células e o mesmo extrato pode exercer potencial inibidor contra as propriedades metastáticas de células neoplásicas inibindo significativamente a migração e a invasão de células em experiências *in vitro* (PITCHAKARN *et al.*, 2010).

Além disso, Rutina, um flavonoide presente nas folhas de *Momordica charantia*, demonstrou inibição do crescimento de células de leucemia e carcinoma de próstata e ovário (LIN *et al.*, 2009). Takemoto *et al.* (1982) mostraram que o extrato da planta de *M. charantia* inibe a enzima guanilato ciclase envolvida na proliferação de linfócitos leucêmicos, que está inibição se correlaciona com seus efeitos citotóxicos preferencias para essa mesma célula. Já nos estudos de Meng *et al.* (2014), foi mostrado que a Alfa-momorcharina (α -MMC) é responsável pela atividade citotóxica devido a sua capacidade de inibir a proliferação da células de adenocarcinoma pulmonar.

Esses achados sugerem que *M. charantia* tem um grande potencial como alimento para a saúde ou como fonte de desenvolvimento de novos medicamentos. No presente estudo, estendeu-se o potencial citotóxico das folhas de *M. charantia* a outros tipos diferentes de câncer conforme mostrados anteriormente. Contudo, os resultados apresentados também indicaram que não foi encontrada uma relação entre a quantidade de compostos fenólicos totais e a atividade citotóxica, pois as amostras do estudo, que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos, não demonstraram atividade citotóxica.

Embora que o extrato etanol/água (70:30, v/v) tenha se destacado na atividade antibacteriana, o mesmo não foi visto na atividade citotóxica. O estudo de Chipps *et al.* (2012) mostrou efeito citotóxico significativo dos extratos hidroalcoólico e etanólico de *M. charantia* sobre células tumorais humanas. O efeito citotóxico indica a presença de compostos químicos ativos nesses solventes. Estes resultados estão de acordo com Tongia *et al.*, (2004), que identificou diferentes compostos biologicamente ativos na análise cromatográfica do extrato etanólico *M. charantia*.

O ensaio citotóxico pelo método do MTT permite demonstrar facilmente a citotoxicidade de uma amostra, mas não o mecanismo de ação (Berridge *et al.*, 1996), a avaliação da citotoxicidade é um passo importante no desenvolvimento de novos fármacos com indicação para a aplicação clínica (SAURAV E KANNABIRAM, 2011). Sabendo que o câncer representa a segunda causa de morte da população mundial, mesmo diante de todo o arsenal de fármacos anticâncer disponíveis na terapêutica. A toxicidade dos agentes quimioterápicos afetam todos os tecidos normais, produzindo os conhecidos efeitos colaterais como nefrotoxicidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxico com mecanismos de ação diferentes.

6 CONCLUSÃO

Após as caracterizações apresentadas, pode-se concluir que os dados encontrados no presente trabalho evidenciam a presença de compostos fenólicos, bem como, componentes fitoquímicos de média polaridade. Verificou-se que a depender do solvente o melhor método de extração será maceração ou turbólise.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *M. charantia* L. aponta o potencial antimicrobiano “*in vitro*” com ação frente a bactéria *Staphylococcus aureus* com um halo maior de 10 mm.

O extrato de diclorometano por ultrassom (DC2) mostrou valores de inibição acima de 90% contras as linhagens HCT-116 e NCIH 460. Devido ao potencial citotóxico *in vitro* demonstrado pelos extratos julgam-se necessário um fracionamento bioquímico e posterior isolamento das substâncias puras que conferem essa atividade.

Desta forma, o presente estudo colaborou para a ampliação dos conhecimentos em relação aos compostos fenólicos, caracterização fitoquímica e ação antimicrobiana e citotóxica dos extratos hexânico, diclorometânico, de acetato de etila, etanólico e etanol/água (70:30, v/v) das folhas de *M. charantia* L.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOLA, R.; AKINBILE, Y. A.; AWOTOYE, J. A. *Momordica charantia* Linn. A Potential Antibiotic and Anti-Fungal Drug. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**. v. 5, n. 6, p.21-27. 2016.

ALMEIDA, W.V.F. Uso de plantas medicinais no controle de helmintos gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande – Patos. p. 63. 2005.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. *et al.* Ferramentas químicas aplicadas aos estudos etnobotânicos. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. Recife. p. 501-526. 2010.

ALMEIDA, F. A. C. *et al.* Extratos botânicos de *Momordica charantia* e *Capsicum baccatum* no controle do gorgulho do milho. **Revista Verde (Mossoró – RN - Brasil)**, v. 8, n. 3, p. 169 – 174. 2013.

ALVES, A.R., SILVA, M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem, USP**. v.37, n.4, p.85-91. 2003.

ALVES, E.G., VINHOLIS, A.H.C., CASEMIRO, L.A., FURTADO, N.A.J.C., SILVA, M.L.A., CUNHA, W.R., MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. v.31,n. 6, p.1224-9. 2008.

ALVES, L.L. *et al.* O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v.43, n.8, p.1522-1528. 2013.

ALSHEHRI, M. A. Anticancer activity of methanolic extarct of *Momordica charantia* against human colon, liver and breast cancer cell lines- *In vitro*. **Alshehri Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**. v.6, n.6,p. 6. 2016.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentracions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.48, n. 8, p. 5-16, 2001.

BADKE, M.R. *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132-9. 2011.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. & SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191-203. 2006.

BATRAN, S.A.E.S.E.; EL-GENGAIHI, S.E.; SHABRAWY. O.A.E. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 7, p. 236–242. 2006.

BELOIN, N.; GBEASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON, J.; SOUSSAM, K.; KOUMAGLO, K.; ARNASON, J.T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to is its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 2, p. 49-55. 2005.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, n. 1, p.14-19. 1996.

BRACA, A.; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANO, M.P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, n.2, p.123-125. 2008.

BRANDÃO, D.O, GUIMARÃES, G.P, SANTOS, R.L, JÚNIOR, F.J, DA SILVA, K.M, DE SOUZA, F.S, MACÊDO, R.O. Model nalytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. v. 2016, n. 7, p. 15. 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 60 p. 2009.

BRUNI, G. P; *et al.* Estudo do método de ultrassom para a extração de óleo de sementes de uva provenientes de rejeitos do processo vinícola. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, nº 20, 2014, Florianópolis/SC. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Santa Catarina: UFP, 19 a 22 de outubro de 2014.

CAVALCANTE. A. L. F. A. Plantas medicinais e saúde bucal: Estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa. p. 210. 2010.

CEBALLOS, L. C., HOYOS, F. S., ESTRADA, H. G. Atividade antibacteriana de *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn e *Momordica charantia* Linn da costa norte da Colômbia. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**. v. 46, n.2, p.143-159. 2017.

CHEN, J.C.; TIAN, R.R.; QIU, M.H.; LU, L.; ZHENG, Y.T.; ZHANG, Z.Q. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1043-1048. 2008

CLEMENTINO, E. L. C., *et al.* Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 21, n. 4, p.2-6. 2016.

CHIA-JUNG, L. I., SHIH-FANG, T., CHUN-HAO, T., HSIN-YI, T., JONG-HO, C., HSUE-YIN, H. *Momordica charantia* Extract Induces Apoptosis in Human Cancer Cells through Caspase- and Mitochondria-Dependent Pathways. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2012, n. 8, p.11. 2012.

CHIPPS, E. S., JAYINIA, R., ANDO, S., PROTZMAN, A. D., ZUBAYED MUHI, M., MOTTALEB, M. A., AHMED MALKAWI, A., ISLAM, R. M. Cytotoxicity Analysis of Active Components in Bitter Melon (*Momordica charantia*) Seed Extracts Using Human Embryonic Kidney and Colon Tumor Cells. **Natural Product Communications**. v. 7 , n.9, p.1203-1208. 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition. Approved standard M7-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

CHOZE, RAFAEL. Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas. Trabalho de conclusão no Curso de Química do Centro de Ciências Física e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p.47. 2004.

COLLINS, CAROL H.; BRAGA, GILBERTO L. E BONATO, PIERINA S. Fundamentos de Cromatografia. 1ª ed. Campinas: Editora da Unicamp,2006.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M.; Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.395-404. 2006.

CORDEIRO, L. N. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2010.

COSTA, J. G. M., NASCIMENTO, E. M. M., CAMPOS, A.R.,RODRIGUES, F. F. G. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) extracts and fractions. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**. v. 02, n. 5, p. 46-51. 2011.

COUTINHO, H. D. M., COSTA, J. G. M., FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P., LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L.in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v.33, n. 2, p. 467-471. 2010.

CUNHA, A. P. D. O emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até ao presente. Disponível em: www.antoniopcunha.com.sapo.pt. Acesso em: setembro de 2017.

CUNHA, I. B. S., RODRIGUES, M. L. T., MEURER, E. C., BANKOVA, V. S., MARCUCCI, M. C., EBERLIN, M.N., SAWAYA, A. C. H. F. Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. **Journal of Apicultural Research**. v. 45, n.3, p.137-144. 2006.

DALEFFI ZOCOLER, A. M.; MATHIAS MOURÃO, K. S.; PALAZZO de MELLO, J. C.; MARQUES, L. C. Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.1, p. 22-7. 2006.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisas agropecuária. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/plantasmed.html>. Acessado em: setembro de 2017.

ESPÓSITO, R. C. Avaliação *in vitro* da Eficácia de Produtos Homeopáticos contendo *Momordica charantia* através de Bioensaios. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. p.102 . 2013.

FANG, F. E. *Momordica Charantia* Lectin, a Type II Ribosome Inactivating Protein, Exhibits Antitumor Activity toward Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **American Association for Cancer Research**, 2012.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010.

FERREIRA, R. M. D.Sc. Efeito de infusão dos frutos de *Momordica charantia* L. em ratas diabéticas. Tese de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. p.76 . 2008.

FONSÊCA, S.G.C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. 1ª ed. Fortaleza/Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2005.

GARCIA, C. M. Estudo fitoquímico e atividade biológica de *pavonia distinguenda* - Hill ET *Naudin* e *Dorstenia brasiliensis*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2007.

GOBBO - NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundário. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 – 381, 2007.

GOMES, R.V.R.de S.; VILELA, V.L.R.; GOMES, E. N.; MAIA, A.J.; ATHAYDE, A.C.R. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GROVER, J.K., YADAV, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, n. 6, p.123–132. 2004.

HAMINIUK, W. I. C. *et al.* Phenolic compounds in fruits – an review: **Journal Food Science and Technology**, v.27, n. 5, p.2023-2044. 2012.

HORAX, R., HETTIARACHCHY, N., CHEN, P. Extraction, quantification, and antioxidant activities of phenolics from pericarp and seeds of bitter melons (*Momordica charantia*) harvested at three maturity stages (immature, mature, and ripe). **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 2010;v. 58, n. 9, p.4428–4433.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.373, p.23-30. 2002.

ISERHARD, A.R.M., BUDÓ, M.L.D., NEVES, E.T., BADKE, M.R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Escola Anna Nery**, v.13, n.1, p.116-22. 2009.

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extration of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparation with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2007.

JAGESSAR, R. C., MOHAMED, A., GOMES, G., “An Evaluation of the Antibacterial and Antifungal activity of leaf extracts of *Momordica charantia* against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*”, **Nature and Science**, v. 6, n. 1, p. 38-51. 2008.

KALEMBA, D; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry** v.10, n. 8, p.813–829. 2003.

KHAN, M.R., *Momordica charantia* and *Allium sativum*: broad-sepctrum antibacterial activity. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 4, p.155-158. 1998.

KIKUCHI, T.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; WATANABE, K.; ISHII, K.; YAMAMOTO, A.; FUKATSU, M.; TANAKA, R.; AKIHISHA, T. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Momordica charantia*. **Chemistry e Biodiversity**, v. 9, n. 7, p. 1221- 1230. 2012.

- KO, M. J., CHEIGH, C. I., CHUNG, M. S. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). **Food Chemistry**. v. 14, p. 147-155. 2014.
- KUMAR, D.S.; SHARATHNATH, K.V.; YOGESWARAN, P.; HARANI, A.; SUDHAKAR, K.; SUDHA, P.; BANJI, D. A medicinal potency of *Momordica charantia*. **International Journal of Pharmaceutica Sciences Review and Research**, v. 1, n.2, p. 95-100. 2010.
- LAGARTO, A. *et al.* Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, v.13, n. 3, p. 1-9. 2008.
- LAPORNIK, B.; PROŠEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**. v.71, p.214-501. 2005.
- LEITE, K.L.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; CAMPELLO, C.C. Efeito gastroprotetor do extrato hexânico de partes aéreas de *Momordica charantia*. **Ciência Animal**, v. 15, n. 1, p. 15-20. 2005.
- LENZI, M.; *et al.* Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, V.28, n.3, p.505-313. 2005.
- LIMA JUNIOR, A. F. Efeito de diferentes extratos vegetais no controle de *Anthoscelides obtectus* e *Sitophilus* sp. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – UEG. Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.
- LIMA, PAULO MOISÉS. Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma oncocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus*. 2008. 33 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN.
- LIN, J.P., YANG, J.S., LU, C.C., *et al.* Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo. **Leukemia Research**. v. 33, n. 6, p. 823–828. 2009.
- LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. v.93, p.45-56. 2005.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 3º ed. 640p. 2000.
- MACENA, M. S. A.; ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antifúngica *in vitro* do extrato de *Momordica charantia* L. (melão de São Caetano) sobre cepas de *Cândida* oral. **Brazilian Oral Research**, v. 19. n. 7, p. 68-89. 2005.
- MADA, S. B., GARBA, A., MOHAMMED, H. A., MUHAMMAD, A., OLAGUNJU, A., MUHAMMAD, A. B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of aqueous and ethanol extracts of *Momordica charantia* L. leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 3, p. 579-586. 2013.
- MALACRIDA, C. R. & MOTTA, S. D. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n.4, 659-664. 2005.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 4 ed. Ceará: UFC. 2002.

MARZOUK, B.; MARZOUK, Z.; DÉCOR, R.; EDZIRI, H.; HALOUI, E.; FENINA, N.; AOUNI, M. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. **Journal Ethnopharmacol.** v.7, n. 2, p. 344. 2009.

MAZZA, K. E. L. Extração assistida por ultrassom e microencapsulação por spray drying de compostos fenólicos do bagaço de uva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Rio de Janeiro, 2017. 118 f.

MELO, E. A.; MANCINI, J. F.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**v. 12, n. 2, p. 195-199. 2003.

MENG, Y. Um novo método para a produção simultânea de duas proteínas de inativação de ribossomos, α -MMC e MAP30, de *Momordica charantia* L. **PLoS One**, 2014.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 21-35. 2001.

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova.** v.34, n.4, p.695-699, 2011.

MIURA, T.; ITOH, C.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; KAWAI, M.; PARK, S.R.; SUZUKI, I. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. **Journal of Nutrition Sciences Vitaminology**, v. 47, n. 9, p. 340–344. 2001.

NACZK, M. & SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography.**v. 54, n. 9, p.95-111. 2004.

NAVARRO, D. de. Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 37 p. 2005.

NERURKAR, P.; RAY, R. B. Bitter melon: antagonist to cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 1049-1053. 2010.

OLIVEIRA, V. B.; *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por *clae-dad* de *dicksonia sellowiana* (*presl.*). *Hook, dicksoniaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1. 2016.

OLIVEIRA, C. F. *et al.* Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** p. 01-08. 2015.

PACHÚ, C. O. Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. p.102 . 2007.

PITCHAKARN P, OGAWA K, SUZUKI S, *et al.* Momordica charantia leaf extract suppresses rat prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Science.**v. 101, n.10,p. 2234–2240. 2010.

PITCHAKARN P, SUZUKI S, OGAWA K, *et al.* Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. **Cancer Letters**. v. 306, n. 2, p. 142–150. 2011.

PIZARRO, C. Plasma Lipidomic Profiling Method Based on Ultrasound Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. 2013.

POLITI, F. A. S. *et al.* Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Science**. v.12, p.2757-2768. 2011.

PONZI, E. A. C. Avaliação da cicatrização de feridas em dorso de ratos com e sem laserterapia, determinação da toxicidade aguda e atividade antimicrobiana de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas. Recife. 2010a.

PONZI, E.A.C.; OLIVEIRA, T.L.; MORAIS, I.A.F.; JÚNIOR, J.J.S.; GERBI, M.M.; SOUZA, I.A.; PSIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S. Antimicrobial activity of the *Momordica charantia* L. extract. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 10, n. 1, p. 89-94, 2010b.

RAKHOLIYA, K., VAGHELA, P., RATHOD, T., CHANDA, S. Comparative study of hydroalcoholic extracts of *Momordica charantia* L. against foodborne pathogens. **Indian journal of pharmaceutical sciences**. v. 76, n. 5, p. 148–156. 2014

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renisus.pdf>>. DAF. MS fev/2009. Acessado em: agosto de 2017.

REZENDE, H.A., COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola de Enfermagem, USP**. v.36, n.3, p.282-8. 2002.

RIBEIRO, L. F.C.; MELLO, A. P. A.; BEDENDO, I. P.; KITAJIMA, E. W.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 3, p. 98-107. 2003.

RIGOTTI, M. Melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), uma planta com grande potencial para a economia agrária e saúde alternativa. Seção Pesquisa com Plantas Medicinais Espontâneas. Disponível em: <http://www.ppmac.org/sites/default/files/melaosaocaetano_rigotti.pdf> Acesso em: setembro de 2017.

RODRIGUES, K.A.da F.; DIAS, C.N.; FLORÊNCIO, J.C.; VILANOVA, C.M.; GONÇALVES, J. de R.S.; COUTINHO-MORAES, D.F. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, n. 2, p. 467- 471. 2010.

SALLET, L.A.P. TEIXEIRA, C.A.D. LIMA, D.K.S. GAMA, F. C. FACUNDO, V. A. COSTA, J.N.M. Atividade inseticida do extrato etanólico de *Momordica charantia* L. sobre a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), In Proceedings, 32nd Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Poços de Caldas, Brasil. p. 383 – 384. 2006.

SAMPAIO, D.M.; *et al.* Associação Brasileira de Biologia, “Ervas Medicinais na Escola. **Revista SBenBIO**.v.2, n.7, p.6652. 2014.

SARAIVA, N. N. Estudo químico do fungo antagonista (*Trichoderma harzianum*). 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SHALMASHI, A. Ultrasound-assisted extraction of oil from tea seeds. **Journal of Food Lipids**, v.16, n. 4, p. 465-474. 2009.

SENANAYAKE, G. V. K.; MARUYAMA, M.; SHIBUYA, K.; SAKONO, M.; FUKUDA, N.; MORISHITA, T.; YUKIZAKI, C.; KAWANO, M.; OHTA, H. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n. 7, p.257–262. 2004.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**.v. 82, n. 13, p. 1107-1112. 1990.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JR., T. J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p.221- 246. 2005.

SILVA, M. S. P. D. Ensaio pré-clínicos com extratos de plantas medicinais do semi-árido nordestino: contribuição para o tratamento de infecções da cavidade bucal. Digitado Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 81f. 2011.

SIMÕES, C.M.O., SCHEKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC. 2001.

SOUSA, F.S. & MACIEL, C.C.S. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de microbiológico. **Revista Eletrônica de Ciências**, v.3, n.2, p.22-30. 2011.

SOUZA, A.P.T.B. BARNI, S.T.; FERREIRA, R.A.; COUTO, A.G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.1, p.13-21. 2010.

SOUSA, C. M. M; SILVA, H. R; JR, G. M. V; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S; ARAÚJO, D. S; Luis Carlos D. CAVALCANTE, L. C; BARROS, E. D. S; Paulo ARAÚJO, P. B. M; Marcela S. BRANDÃO, M; CHAVES, H. C. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, p. 351-355. 2007.

STATISTICA 7.0. Stat Soft. Programa Estatístico. 2006.

SUBRATTY, A.H., F. MAHOMOODALLY, A. GURIB-FAKIM. Bitter Melon: An exotic vegetable with medicinal values. **Nutrition Food Science**, v.35, n. 11, p.143-147. 2005.

TAKEMOTO, D.J., DUNFORD, C., VAUGHN, D., *et al.* Guanylate cyclase activity in human leukemic and normal lymphocytes. Enzyme inhibition and cytotoxicity of plant extracts [J]. **Enzyme**. v. 27, n. 3, p.179–188. 1982.

TAN, M.J.; *et al.* Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. **Chemistry & Biology**, v.15, p. 263–273. 2008.

TAN, S.P., PARKS, S.E., Stathopoulos C.E., Roach P.D. Greenhouse-grown bitter melon: Production and quality characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 94, n. 6, p. 1896–1903. 2014.

TONGIA, A., S. K. TONGIA, AND M. DAVE. Phytochemical determination and extraction of *Momordica charantia* fruit and its hypoglycemic potentiation of oral Cytotoxic Activity hypoglycemic drugs in diabetes mellitus (NIDDM). **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. v.48, p. 241–244. 2004.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNKY, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics and Sonochemistry**, v.8, n. 7, p.137-142. 2001.

TORRES, L. D.; ORTINERO, C. V.; MONSERATE, J. J. Crop wastes as potential sources of natural medicine/cosmetic products, pesticides/insecticides, and paper products. PCARRD Highlights (Philippines). 2002.

TROMBETTA, D., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., VENUTI, V. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, n. 8, p. 2474–2478.2005

TRUSHEVA, B., TRUNKOVA, D., BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal** . v. 1, p. 13. 2007.

UMUKORO, S.; ASHOROBI, R.B. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 5, p. 119-124. 2006.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, n. 6, p. 369-380, 2007.

VASCONCELOS, E. A. F.; BARBOSA, R. M.; MEDEIROS, M. G. F.; MOURA, T. F. A. Influence of Extrative Process, Solvent and Particle Size of Plant Material on the Total Solids Content of Schinus terebinthifolius Raddi Extractive Solutions. **Revista Fitos**. p. 74-79. Rio de Janeiro. 2005.

VIRDI, J.; SIVAKAMI, S.; SHAHANI, S.; SUTHAR, A.C.; BANAVALLIKAR, M.M.; BIVANI, M.K. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n. 1, p. 107-111. 2003.

WANG, Z., PAN, Z., MA, H., ATUNGULU, G.G. Extraction of phenolics from pomegranate peels. **Open Food Science Journal**. v. 45, n. 5, p. 17–25. 2011.

WISSAM, Z., GHADA, B., WASSIM, A., WARID, K. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**.v. 23, n. 4, p. 675–682. 2012.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. Sensory & Nutritive Qualities of Food: A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. **Journal of Food Science**, v.72, n.2, p.159-166. 2007.

YING, Z., HAN, X., LI, J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. **Food Chemistry**. v. 1, n. 3, p. 1273. 2011.

8 ANEXOS

ANEXO 1

Análise estatística ANOVA de uma via e Tukey para amostra de hexano.

Parameter					
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	4377				
R squared	0,9993				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	9,046		24,523		
Residual (within columns)	0,006200	6	0,001033		
Total	9,052	8			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
M vs U	-0,9797	52,79	Yes	***	-1.060 to 0.8991
M vs T	-2,440	131,5	Yes	***	-2.521 to -2.359
U vs T	-1,460	78,69	Yes	***	-1.541 to -1.380

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 2

Análise estatística ANOVA de uma via e Tukey para amostra de diclorometano.

Parameter					
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	1671				
R squared	0,9982				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1,726	2	0,8630		
Residual (within columns)	0,003099	6	0,0005166		
Total	1,729	8			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
M vs U	-0,6043	46,06	Yes	***	-0.6613 to -0.5474
M vs T	-1,070	81,52	Yes	***	-1.127 to -1.013
U vs T	-0,4653	35,46	Yes	***	-0.5223 to -0.4084

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 3

Análise estatística ANOVA de uma via e Tukey para amostra de acetato de etila.

Parameter					
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	1453				
R squared	0,9979				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	4,109	2	2,055		
Residual (within columns)	0,008483	6	0,001414		
Total	4,118	8			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
M vs U	-0,5240	24,14	Yes	***	-0.6182 to -0.4298
M vs T	-1,622	74,70	Yes	***	-1.716 to -1.527
U vs T	-1,098	50,56	Yes	***	-1.192 to -1.003

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 4

Análise estatística ANOVA de uma via e Tukey para amostra de etanol/água (70:30, v/v).

Parameter					
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	71,18				
R squared	0,9596				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5,530	2	2,765		
Residual (within columns)	0,2331	6	0,03885		
Total	5,764	8			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
M vs U	1,063	9,341	Yes	**	0.5692 to 1.557
M vs T	1,916	16,84	Yes	***	1.423 to 2.410
U vs T	0,8533	7,499	Yes	**	0.3596 to 1.347

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 5

Análise estatística ANOVA de uma via e Tukey para amostra de etanol.

Parameter					
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	3724				
R squared	0,9992				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5,616	2	2,808		
Residual (within columns)	0,004524	6	0,0007540		
Total	5,620	8			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
M vs U	1,547	97,58	Yes	***	1.478 to 1.616
M vs T	1,780	112,3	Yes	***	1.711 to 1.849
U vs T	0,2330	14,70	Yes	***	0.1642 to 0.3018

Fonte: Prisma 5.0