



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

TATIANE ANDRADE SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES DE
EXTRAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA E
CENTESIMAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS DOS FRUTOS DA *Momordica*
*charantia L.***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018

TATIANE ANDRADE SANTOS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES DE EXTRAÇÃO
SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CENTESIMAL, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DOS FRUTOS DA *Momordica
charantia* L.**

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

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018

TATIANE ANDRADE SANTOS

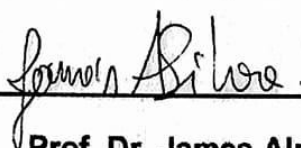
**"AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES DE EXTRAÇÃO
SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CENTESIMAL, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DOS FRUTOS DA *Momordica
charantia* L."**

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: 23/03/2018



Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADOR 1)



Prof.^a. Ma. Marília Dos Santos Bezerra
Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADORA 2)

Dedicatória

“Dedico este trabalho a toda a minha família, alicerce da minha vida, e em especial aos meus pais Edna e Edvaldo com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da vida. Desejo ter sido merecedora de todo esforço que foi dedicado a mim ”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a execução desta longa etapa. Este trabalho não seria possível sem a ajuda e colaboração de um conjunto de pessoas, que possibilitaram que este sonho se tornasse real.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido saúde, força e disposição para superar as dificuldades e chegar até aqui.

Aos meus pais, meus heróis, pela educação, amor, incentivo e apoio incondicional. Que nas horas difíceis, de desânimo e cansaço sempre estiveram ao meu lado para me fortalecer. Amo vocês infinitamente!

À minha irmã Camila, pela amizade ao longo de todo o percurso, por ser especial e tão importante em minha vida... Amo você!

Ao meu namorado Jamisson, que sempre esteve presente e me apoiou quando mais precisava e, por isso, agradeço-lhe por toda a companhia e apoio que me tem dado e toda a sua paciência para comigo. Te amo!

Ao pessoal do NEPAS em especial ao amigo Anderson e Naiane que mais do que uma amiga foi uma irmã, que dividiu comigo mais do que um trabalho, obrigada pelo apoio, companheirismo e irmandade.

Às minhas amigas, Raquel, Tailane e Marianne que por sempre estarem presentes tornaram meus dias na universidade muito mais agradáveis. Obrigada por todo o carinho, apoio e compreensão.

Não posso deixar de agradecer a minha co-orientadora Natália por toda ajuda e predisposição e a minha orientadora, a Professora Luciana Lobato e ao seu marido Victor, minha segunda família. Tenho muito que agradecer... Primeiro pela disponibilidade e dedicação na orientação desse trabalho, bem como por todo amor, motivação e confiança, você foi uma das melhores coisas que a universidade me proporcionou. Amo vocês!

Aos demais que, direta ou indiretamente, de alguma forma deram a sua contribuição para que chegasse com sucesso ao fim desta etapa.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

“Não podemos simplesmente passar pela vida, temos que fincar o pé e fazer a nossa história. A história começa sempre de um sonho que muitas vezes sonhamos só. Hoje estou riscando esse sonho do meu caderninho, pois com muita luta e determinação, consegui fazer desse sonho uma história, pois viver é estar a caminho em busca de uma grande realização pessoal”

Edíluci Malcher

RESUMO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS E SOLVENTES DE EXTRAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA E CENTESIMAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DOS FRUTOS DA *Momordica charantia* L.

Tatiane Andrade Santos, Lagarto, 2017.

INTRODUÇÃO: A *Momordica charantia* L. é popularmente conhecida como Melão de São Caetano e vem ganhando espaço no cenário científico mundial, sendo bastante comum no nordeste brasileiro e sendo creditada principalmente com atividades antidiabética, antiviral, antitumoral, anti-leucêmica e antibacteriana. **OBJETIVO:** Avaliar a influência da utilização de diferentes solventes e métodos de extração na composição fenólica e centesimal do extrato dos frutos de *Momordica charantia* L., além da atividade citotóxica e antimicrobiana. **METODOLOGIA:** Dos frutos de *Momordica charantia* foram preparados seus extratos vegetais utilizando três métodos e suas combinações: maceração, ultrassom, turbólise, ultrassom + maceração, turbólise + maceração e ultrassom + turbólise a partir da ação de cinco solventes: etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol + água (70:30). O teor de compostos fenólicos totais foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu. A triagem fitoquímica da amostra foi realizada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do ensaio da atividade metabólica mitocondrial sobre as linhagens tumorais de Colorretal, Carcinoma de pulmão, Próstata e Leucemia Mielóide crônica. Para realização da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de difusão em disco sobre linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*, e na determinação da composição centesimal foi seguido o que está descrito pelo Instituto Adolf Lutz. **RESULTADOS:** A presença de compostos fenólicos nos extratos variou substancialmente quando se alterou o solvente e o método de extração, entretanto apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. Além disso, foi demonstrada atividade antimicrobiana do extrato dos frutos de *Momordica charantia* L. sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com discos contendo 0,5 mg de extrato. Ainda esses extratos não apresentaram significativa atividade citotóxica. **CONCLUSÃO:** Através da análise dos extratos do fruto da *Momordica charantia* L, obtidos com métodos extrativos e solventes diferentes, foi possível confirmar a presença de compostos fenólicos em diferentes concentrações, e a sua atividade antimicrobiana, ratificando a importância de investigações para definição da sua potencialidade terapêutica.

Palavras - chave: Melão de São Caetano; fitoterápicos; Métodos de extração; antimicrobiano; Composição centesimal; Citotoxicidade.

ABSTRACT

EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND SOLVENTS ON PHENOLIC AND CENTESIMAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Momordica charantia* L. fruits extracts

Tatiane Andrade Santos, Lagarto, 2017.

INTRODUCTION: *Momordica charantia* L. is popularly known as Melão de São Caetano. This medicinal plant has been gaining ground in the scientific world scene, being quite common in the Brazilian northeast and being credited mainly with activities antidiabetic, antiviral, antitumor, antileukemic and antibacterial. **OBJECTIVE:** To evaluate the influence of the use of different solvents and extraction methods on the phenolic and centesimal composition of the extract of the fruits of *Momordica charantia* L., besides the cytotoxic and antimicrobial activity. **METHODOLOGY:** The fruits of *Momordica charantia* were their own plant extracts, using three methods and their combinations: maceration, ultrasound, turbolysis, ultrasound + maceration, turbolysis + maceration and ultrasound + turbolysis from the action of five solvents: Ethanol, Hexane, Dichloromethane, Acetate of Ethyl and Ethanol + Water (70:30). The method of operation is subject to the use of the Folin-Ciocalteu method. Phytochemical screening of the sample was performed by analytical thin layer chromatography (TLC). Cytotoxicity analysis was performed by mitochondrial metabolic method such as colorectal proteases, lung carcinoma, prostate and chronic myeloid leukemia. The objective of the antimicrobial collection was the disc dissemination method of bacterial bacteria of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the fungus *Candida albicans*, and in the determination of the centesimal composition was sequestered by the Adolf Lutz Institute. **RESULTS:** The presence of phenolic compounds in the extracts varied substantially when the solvent and the extraction method changed, however they presented similar chromatographic profiles. In addition, an antimicrobial activity of the extract of the fruits of *Momordica charantia* L. on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with disks containing 0.5 mg of extract was demonstrated. Even these extracts did not present significant cytotoxic activity. **CONCLUSION:** It was possible to confirm the presence of phenolic compounds in different concentrations and their antimicrobial activity, by confirming the importance of investigations to determine their potentiality, by analyzing the extracts of the fruit of *Momordica charantia* L., obtained with different extraction methods and solvents therapy.

Keywords: Melão de São Caetano; herbal medicines; Extraction methods; antimicrobial; Centesimal composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas, Flor, Frutos, Caule e Gavinhas da <i>Momordica charantia</i> L.....	20
Figura 2. Estrutura química do composto Momordicina.	232
Figura 3. Estrutura química dos glicosídeos que compõem a Charantina A: Estigmasterol e B: β -Sitosterol	243
Figura 4. Exemplo de estrutura química de compostos fenólicos.....	254
Figura 5. Estrutura química de compostos fenólicos encontrados em maior abundância nos frutos de <i>Momordica charantia</i> . A- Catequina e B- Ácido Cafeíco.	265
Figura 6. Exemplificação de produtos comerciais fitoterápicos que têm como base a <i>Momordica charantia</i> L. (A) cápsulas, (B) comprimidos e (C) florais.....	30
Figura 7. Exemplificação de produtos culinários a base de <i>Momordica charantia</i> L.(A) Refogado e temperado com pimenta e gergelim preto (B) <i>Chanpuru</i>	30
Figura 8. Organograma da obtenção dos extratos. A- Extratos obtidos com etanol e B- Extratos obtidos com diferentes solventes.....	376
Figura 9. Etapas para determinação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu	398
Figura 10. Reação de redução dos sais de tetrazolium em azul de formazan.	40
Figura 11. Etapas para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco.	421
Figura 12. Rendimento em % dos extratos obtidos a partir dos frutos de <i>Momordica charantia</i>	465
Figura 13. Curva de calibração produzida com ácido gálico para determinação de compostos fenólicos.....	498
Figura 14. Compostos fenólicos (μg EAG/mL) de extratos etanólicos dos frutos de <i>Momordica charantia</i> obtidos por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....	509
Figura 15. Compostos fenólicos (μg EAG/mL) de extratos hexânicos dos frutos de <i>Momordica charantia</i> obtidos por diferentes métodos. M – Maceração; U –	

Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).50

Figura 16. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com diclorometano por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).52

Figura 17. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com acetato de etila por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).543

Figura 18. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com etanol + água (70:30) por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).554

Figura 19. Cromatogramas dos diferentes extratos. A - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) sem revelação, B - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) sem revelação, C - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) revelados em UV, D- cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) revelados em UV, E - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) e revelados em vanilina sulfúrica, F - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) revelados em vanilina sulfúrica.576

Figura 20. Cromatograma obtido dos diferentes extratos vistas na luz UV no comprimento de onda de $\lambda = 254 \text{ nm}$. A- cromatografia dos extratos obtidos com hexano, B - cromatografia dos extratos obtidos com diclorometano, C - cromatografia dos extratos obtidos com acetato de etila, D- cromatografia dos extratos obtidos com etanol/água (70:30).598

Figura 21. Cromatograma obtido dos diferentes extratos revelados em vanilina sulfúrica. A- cromatografia dos extratos obtidos com hexano, B - cromatografia dos extratos obtidos com diclorometano, C - cromatografia dos extratos obtidos com acetato de etila, D- cromatografia dos extratos obtidos com etanol/água (70:30). ...598

Figura 22. Halos de inibição formado pelo extrato obtido a partir da maceração, utilizando Acetato de etila como solvente frente a *Staphylococcus aureus*. A- Halos formado pelo extrato (Triplicata), B- Controle Negativo (Acetato de etila).643

Figura 23. Halos de inibição formado pelo extrato obtido a partir da maceração, utilizando etanol/água como solvente frente a *Escherichia coli*. A- Halo formado pelo extrato (Triplicata), B- Halo formado pelo controle positivo (Polimixina B 300µg)...654

Figura 24. CIM do extrato produzido com Acetato de etila por meio da Turbólise frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922).676

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da <i>Momordica charantia</i> L.....	20
Tabela 2. Composição mineral e de vitaminas presentes nos frutos da <i>Momordica charantia</i> L.....	21
Tabela 3. Controles positivos e negativos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana.....	42
Tabela 4. Teor de nutrientes dos frutos analisados	47
Tabela 5. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> exibida pelos extratos dos frutos de <i>Momordica charantia</i> pelo método de MTT.....	60
Tabela 6. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos frente às linhagens bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e fúngica <i>Candida albicans</i>	62
Tabela 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American type culture collection

BHI - Caldo brain heart infusion

CCDA - Cromatografia de camada delgada analítica

CIM - Concentração inibitória mínima

DMSO - Dimetilsofóxido

EAG - Equivalentes de ácido gálico

HCT-116 - Células de câncer colorretal

K562 - Leucemia mieloide crônica

L6 - Células do músculo esquelético saudável

MAC - Maceração

MCL - Lectina *Momordica charantia*

MTT - Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)

NCHI 460 - Células de carcinoma de pulmão

NPC - Células de carcinoma nasofaríngeo

OMS - Organização Mundial de Saúde

PC3 - Células de câncer de próstata

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Política Nacional de Plantas e Medicamentos Fitoterápicos

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de interesse ao SUS

SUS - Sistema Único de Saúde

TURB - Turbulência

ULT - Ultrassom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Plantas Medicinais.....	19
2.2	<i>Momordica charantia</i> L.....	20
2.2.1	Descrição botânica e distribuição geográfica.....	20
2.2.2	Composição centesimal.....	21
2.2.3	Composição fitoquímica dos frutos.....	23
2.2.4	Usos tradicionais/populares.....	26
2.2.5	Potencial Medicinal.....	27
2.2.6	Toxicidade, efeitos colaterais e contraindicações.....	29
2.2.7	Produtos comerciais e preparações culinárias	30
2.3	Extratos Vegetais.....	32
2.3.1	Extração por Ultrassom	33
2.3.2	Extração por Turbólise.....	33
2.3.3	Extração por Maceração.....	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Coleta e identificação do material vegetal.....	36
4.2	Preparação dos extratos vegetais.....	36
4.3	Composição centesimal.....	38
4.4	Quantificação dos compostos fenólicos.....	38
4.5	Análise em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) dos extratos.....	40
4.6	Atividade citotóxica.....	40

4.7	Determinação da atividade antimicrobiana.....	41
4.7.1	Preparo das placas	42
4.7.2	Preparo dos discos	42
4.7.3	Preparo dos inóculos bacterianos.....	43
4.7.4	Realização do espalhamento em placa	43
4.7.5	Disposição dos discos	44
4.6.6	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	44
4.8	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Rendimento dos extratos.....	46
5.2	Composição Centesimal.....	48
5.3	Compostos fenólicos.....	49
5.3.1	Curva de calibração	49
5.3.2	Determinação dos compostos fenólicos dos extratos	49
5.4	Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	56
5.4.1	Análise em CCDA dos extratos etanólicos	56
5.4.2	Análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos com diferentes solventes.....	58
5.5	Atividade Citotóxica.....	60
5.6	Atividade antimicrobiana.....	62
5.6.1	Concentração inibitória mínima (CIM).....	66
6	CONCLUSÕES	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	Anexos	78

1 INTRODUÇÃO

Planta medicinal é toda planta que, administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica (LOPES *et al.*, 2005). Tais utilizações correspondem às mais antigas “armas” empregadas pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos, na prevenção e/ou na cura de doenças (MORAES & SANTANA, 2001).

As plantas medicinais são usadas como o único recurso terapêutico de uma parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta (NEWALL *et al.*, 2010). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012) mostram que cerca de 70% a 90% da população depende do uso de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde.

O Brasil destaca-se por ser o país com maior biodiversidade mundial, possuindo, de acordo com Marques (2000), 22% de todas as espécies biológicas do mundo. Nesse contexto, o uso de plantas medicinais pela população brasileira já se tornou uma prática tradicional (RITTER *et al.*, 2002; AZEVEDO & KRUEL, 2007), sendo, muitas vezes, o único recurso utilizado pela população.

No país, um conjunto de resoluções e portarias delinea os instrumentos necessários à implantação e implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (PNPMF), destacando-se a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS - BRASIL, 2009). Essa relação é constituída de espécies vegetais cujo critério de inclusão tem por base o potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse que possam subsidiar a elaboração de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2016).

Das várias plantas que constam nessa lista com potencial atividade biológica, destaca-se a *Momordica charantia*, (Cucurbitácea), uma planta medicinal bastante comum no Nordeste brasileiro, popularmente conhecida como melão de São

Caetano, erva-das-lavadeiras, fruto-de-cobra, melãozinho, fruta-de-sabiá, dentre outros (LORENZI, 2002; DI STASI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.* 2010) e utilizada para tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer e controle de infecções causadas por microrganismos. Seus frutos são bastante consumidos pela população, que, na sua maioria, não tem conhecimento científico acerca das propriedades nutricionais, farmacológicas, microbiológicas e toxicológicas desta planta (ZHANG *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados com *Momordica charantia* L. avaliando seu potencial para uso terapêutico. Eles têm creditado aos frutos dessa planta muitas atividades farmacológicas. Entre elas estão atividade antidiabética, antiviral, antitumoral, antileucêmica, antibacteriana, anti-helmíntica, antimutagênica (AHMED *et al.*, 1999; ALESSANDRA *et al.*, 2008), antioxidante, antiúlcera, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, hipotensora, imunoestimulante, cicatrizante e propriedades inseticidas (BASCH *et al.*, 2003; ALESSANDRA *et al.*, 2008; ARRUDA, 2010).

Por outro lado, a identificação dos compostos fitoquímicos realizada nos extratos revelam a presença de vários grupos de metabólitos secundários como os compostos fenólicos, que desempenham várias atividades farmacológicas. Essa identificação pode contribuir para a evidência de marcadores químicos nas espécies estudadas, cooperar em testes de qualidade e integridade de fitoterápicos, além de colaborar para o uso popular mais seguro das plantas medicinais (ANVISA, 2010). Na extração desses constituintes é possível utilizar diferentes métodos e solventes de extração. Tais fatores variam significativamente o teor de metabólitos secundários extraídos e, assim, influenciam na composição final do extrato (KARABEGOVIĆ *et al.* 2014).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da utilização de diferentes solventes e métodos de extração na composição fenólica e centesimal do extrato dos frutos de *Momordica charantia* L., além da atividade citotóxica e antimicrobiana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas Medicinais

Para muitas pessoas é fato comum a utilização de plantas medicinais na terapêutica, tanto dentro do aspecto da cultura popular, quanto de forma mais embasada cientificamente (SIMBO, 2010).

Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo estes 25% provindo de plantas (CALIXTO, 2000). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001; ABIFISA, 2011).

Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com mais de 60.000 espécies vegetais catalogadas, apenas uma pequena fração é estudada para pesquisas de compostos bioativos e avaliação de suas propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001).

Recorrer à natureza como forma de amenizar sintomas ou curar enfermidades é uma prática comum e de longa data. Nesse aspecto, urge a necessidade de investigar as riquezas da biodiversidade e, particularmente, das plantas medicinais, seu uso discriminado e racional, de forma a se obter vias terapêuticamente eficientes e seguras (ALZUGARY, 1988).

Nesse contexto, no Brasil, a partir de 2006 novos marcos regulatórios brasileiros apoiam e fomentam o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos como a PNPMF, PNPIC e a RENISUS estas normativas foram criadas a fim de adequar os marcos legais para implantação da fitoterapia no SUS. Além de destacarem a importância da valorização do conhecimento tradicional e o respeito às práticas culturais de cura e manutenção da saúde.

2.2 *Momordica charantia* L.

2.2.1 Descrição botânica e distribuição geográfica

Momordica charantia pertence à família Cucurbitaceae, e possui cerca de 1.280 espécies, subordinadas a um número aproximado de 126 gêneros, ocorrentes, principalmente, nas regiões tropicais. Seu nome tem origem do latim *Momordica* que significa “mordida”, referindo-se às bordas da folha que parecem que foram mordidas (ASSUBAIE, 2004). No Brasil, a família Cucurbitaceae está representada por 30 gêneros, com um total aproximado de 200 espécies (BARROSO *et al.*, 2004). A *M. charantia*, é conhecida vulgarmente como Melão de São Caetano, erva de lavadeira, Erva de São Caetano, fruto de cobra, fruto de negro, entre outros (ASSIS, *et al.*, 2015).

M. charantia é caracterizada por ser uma planta trepadeira, rasteira, originária do leste indiano e sul da China (AHMED, 1999). A planta cresce em áreas tropicais da Ásia, do leste da África, Ilhas do Caribe, Região Amazônica e no nordeste brasileiro (DI STATI *et al.*, 2002). Todas as suas partes, incluindo o fruto, possuem sabor amargo (GROVER & YADAV, 2004). É uma erva que cresce sobre muros, sendo muito comum nas cercas e terrenos baldios (DI STATI *et al.*, 2002),

Apresentam gavinhas simples, longas, pubescentes, filiformes com a função de agarrar ramos que sirvam de apoio para a planta em crescimento. Proporcionam caule herbáceo fino, sulcado e de coloração esverdeada, trepador de 3 a 4 metros de altura (ALONSO, 1998). As folhas são simples e apresentam características membranáceas, alternas e lobadas com cerca de cinco a sete lóbulos (CORREA JUNIOR *et al.*, 1994, DI STASI, 2002). As flores são monóicas de cor amarelo-pálidas isoladas nas axilas (ROBINSON & DECKER- WALTERS, 1997). O fruto é oblongo e assemelha-se a um pepino pequeno. O fruto novo é verde que muda para uma tonalidade alaranjada-dourado quando maduro (GROVER&YADAV, 2004), estes contêm sementes envoltas em uma substância avermelhada e comestível (GONZALES, DIAZ, LOWY, 2001; ALONSO, 1998), como apresentado na Figura 1.

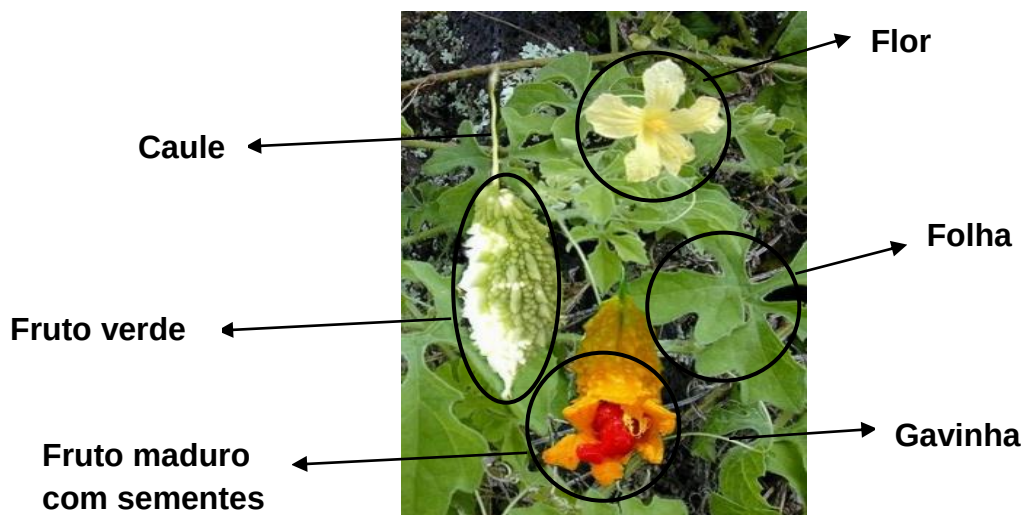


Figura 1. Folhas, Flor, Frutos, Caule e Gavinhas da *Momordica charantia* L.
Fonte: Adaptado de Meemelink - Revendedor especialista em botânica.

2.2.2 Composição centesimal

Composição centesimal é a proporção em que aparecem, em 100 g de um determinado alimento, os constituintes que o compõem (RIBEIRO, 2007). A composição centesimal do fruto da *Momordica charantia* L. está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal do fruto de *Momordica charantia* L.

Componente	%*
Teor de umidade (%)	13,74 ± 2,29
Cinzas total (%)	7,96 ± 0,52
Gordura bruta (%)	6,11 ± 0,42
Fibra bruta (%)	2,7 ± 0,5
Proteína bruta (%)	29,88 ± 3,75
Carboidratos (%)	38,31 ± 0,30
Valor calórico total (kcal/100g)	241

*Média ± Desvio Padrão. **Fonte:** adaptado de Anil Akumar *et al.* 2015.

A análise centesimal mostra que o fruto da planta tem baixo teor de umidade em comparação a outros materiais vegetais (MENSAH *et al.* 2008), o que ajuda a prevenir deterioração por microrganismos (MATHLOUTHI, 2001). Já as proteínas, encontradas em grandes quantidades são as principais responsáveis pelas várias ações farmacológicas da planta, como por exemplo, a Alfa-momorcharina (α -MMC) e proteína anti-HIV (MAP30), possuindo respectivamente atividades antitumorais e antivirais (FANG *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2014).

Ainda, segundo Anil Akumar *et al.* (2015), os frutos de *Momordica charantia* L. apresentam muitos minerais e vitaminas como apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Composição mineral e de vitaminas presentes nos frutos da *Momordica charantia* L.

Componente	ppm*
MINERAIS	
Cálcio	20510,00 $\pm$ 5,77
Magnésio	255,00 $\pm$ 0,69
Sódio	2200,00 $\pm$ 1,15
Potássio	413,00 $\pm$ 1,45
Ferro	98,00 $\pm$ 0,23
Zinco	120,00 $\pm$ 1,15
Mangânes	156,00 $\pm$ 0,33
Cobre	32,00 $\pm$ 1,85
VITAMINAS	
A	Traços
E	800 $\pm$ 14
C	66000 $\pm$ 141
B12	5355 $\pm$ 7,10
Ácido Fólico	20600 $\pm$ 42,43

*Média $\pm$ Desvio Padrão. **Fonte:** Adaptado de Anil Akumar *et al.* 2015.

O conteúdo mineral analisado na planta revelou que o valor mais elevado é o de cálcio. No organismo humano, o cálcio é um nutriente necessário em diversas

funções biológicas. Está envolvido nos processos de contração muscular, mitose, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso ou sináptico e o suporte estrutural do esqueleto (MILLER *et al.*, 2001). Yuwai *et al.* (1991) mostram que o fruto fresco contém diversos minerais (Cálcio 137,69 mg/100 g, Magnésio 119,92 mg/100g), além dos minerais traços (Cobre 3,54 mg/100g, Ferro 5,97 mg/100g, Zinco 3,53 mg/100g).

Além disso, o fruto é rico em vitaminas, contendo principalmente as vitaminas A, B1, B2 e a vitamina C, que pode ter em torno de 100 mg em 100 g do fruto. Seu uso regular pode prevenir a hipertensão, complicações oculares, neurite e metabolismo defeituoso de carboidratos (YUWAI *et al.*, 1991; BALDWA *et al.*, 1999).

2.2.3 Composição fitoquímica dos frutos

Diversos metabólitos secundários têm sido descritos nos frutos de *Momordica charantia* L. e destes vários princípios ativos são conhecidos, principalmente o triterpeno momordicina, a momordipicrina e o ácido momórdico (FERREIRA, 2008). A momordicina (Figura 2) é o metabólito responsável pelo sabor amargo apresentado pelo fruto (LEUNG *et al.*, 2009). A presença do composto ativo momordicina parece estar relacionada com os efeitos contraceptivos e, por isso, não é aconselhado o seu consumo em mulheres que pretendem engravidar (ANONYMOUS, 2007).

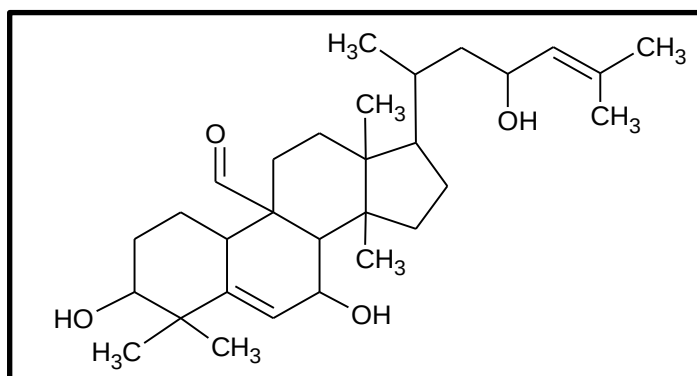


Figura 2. Estrutura química do composto Momordicina.
Fonte: Próprio autor- Chem Sketch 12.0

Outro composto ativo presente no fruto é a charantina. Esta é caracterizada por ser a mistura de dois glicosídeos esteroidais, estigmasterol e β -sitosterol (Figura 3). Este metabólito foi responsável pelo efeito antidiabético em coelhos normais, ratos e gatos (DESAI & PRATIMA, 2015) e podem ser os responsáveis por uma atividade antimicrobiana considerável (SAEED & TARIQ, 2005).

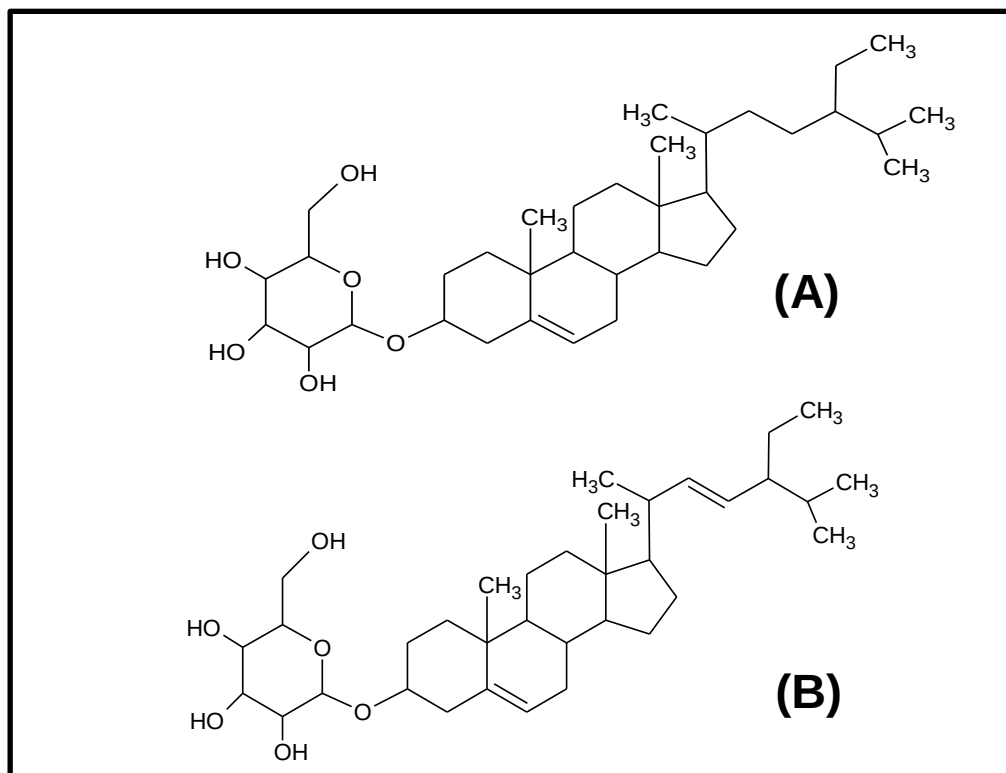


Figura 3. Estruturas químicas dos glicosídeos que compõem a Charantina A: β -Sitosterol glicosilado e B: Estigmasterol glicosilado
Fonte: Próprio autor- Chem Sketch 12.0

A planta ainda oferece algumas substâncias isoladas como o polipeptídeo-P, que apresenta grande semelhança com a insulina com apenas um aminoácido a mais (Metionina), sendo isolados do fruto e sementes da planta (BRAGANÇA, 1996).

Constatou-se também a presença de várias outras substâncias, de diversas classes tais como: Glicosídeos (momordicina, charantina), Saponinas (momorcarina), Carotenoides (criptoxantina), Ácidos graxos (*ácido esteárico*, *ácido linoleico*), Terpenos (momordenol, momordicilina), além de alcaloides, esteroides, catequinas e taninos (SENER, 1998; ISMAIL, 1999; MIURA, 2001).

2.2.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, como mostrado na Figura 4. São originados do metabolismo secundário das plantas (DUBICK & OMAJE, 2001; SOARES *et al.*, 2008).

Compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários sintetizados por plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse. No intuito de se protegerem de agressões externas, as plantas sintetizam compostos de origem fenólica que atuam na absorção da radiação nas camadas epidérmicas dos tecidos, regulando o sistema antioxidante nas células (GOBBO NETO & LOPES, 2007).

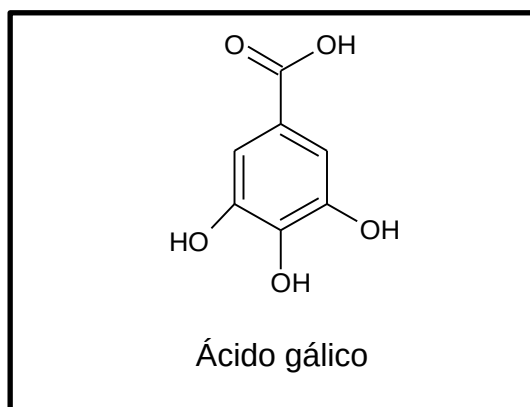


Figura 4. Exemplo de estrutura química de compostos fenólicos: ácido gálico.

Fonte: Próprio autor- Chem Sketch 12.0

Estes são encontrados em alimentos como frutas e vegetais consumidos rotineiramente em nossa dieta. Esses compostos contribuem para qualidades sensoriais, como cor, *flavor* (impressão sensorial determinada pelas sensações de sabor e aroma) e sabor de frutas e vegetais frescos e seus produtos. Além disso, muitos compostos fenólicos apresentam atividades antioxidante, antialérgica, anticarcinogênica, antimicrobianas, entre outras (KIM *et al.*, 2008).

Segundo Taiz & Zeiger (2004), os compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com, aproximadamente, 10.000 compostos.

Alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos (ácidos carboxílicos e glicosídeos) outros solúveis em água. Há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Dentre os diversos compostos fenólicos existentes nos frutos de *Momordica charantia*, destacam-se como mais abundantes o ácido gálico (Figura 4), a catequina e o ácido cafeico (Figura 5) (Kenny et al., 2013). Brudat & Shotpruk (2009) em seus estudos quantificaram 18 tipos de compostos fenólicos nos frutos de *Momordica charantia*, e mais outros cinco em nível traço. O conteúdo total de compostos fenólicos exibiam suas maiores concentrações em Apigenina (195,5 ng / mg), Catequina (725 ng / mg), ácido cafeico (576,5 ng / mg) e ácido gálico (215,6 ng / mg)

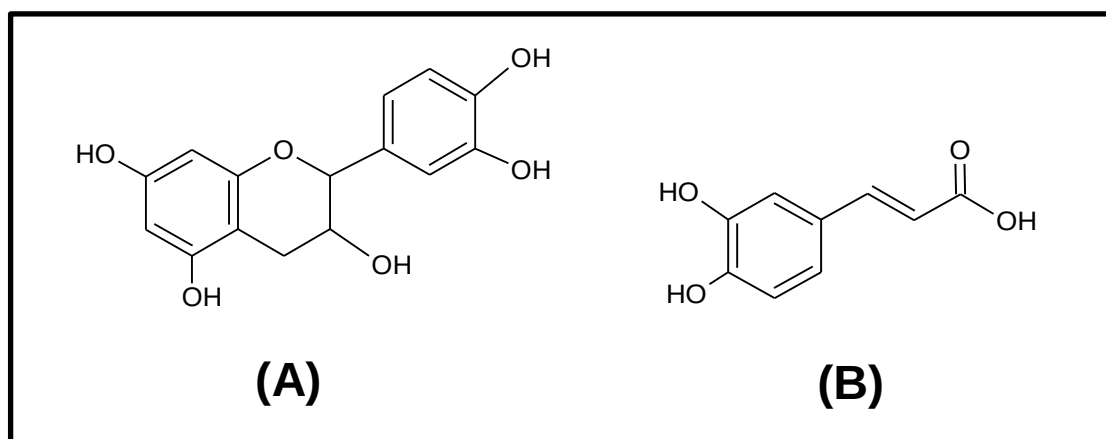


Figura 5. Estrutura química de compostos fenólicos encontrados em maior abundância nos frutos de *Momordica charantia*. A - Catequina e B - Ácido Cafeico.

Fonte: Próprio autor- Chem Sketch 12.0

2.2.4 Usos tradicionais/populares

Os frutos de *Momordica charantia* L. são usados na medicina tradicional em diversos países como China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru e inclusive no Brasil. Os frutos são utilizados de diferentes formas sendo comercializadas em chá, cápsula ou seu extrato em pó (GROVER & YADAV, 2004).

Os frutos ainda podem ser consumidos frescos sendo valorizado pelo seu sabor amargo. Quando imaturos são geralmente utilizados inteiro ou em fatias, na forma de “pickles” ou conservado em salmoura. Além disso, podem ser consumidos maduro, comendo-se a polpa vermelha que reveste as sementes, de sabor adocicado, rica em licopeno (LENZI, 2005).

Tradicionalmente, os frutos possuem uma longa história de utilização no tratamento de numerosas doenças. São indicados e consumidos para inflamações hepáticas, cólicas abdominais, problemas de pele, queimaduras com leucorréias purulentas, furúnculos e hemorróidas. Seu uso também se destaca como erva medicinal para o tratamento da diabetes (VINNING, 2000).

Além disso, o fruto também vem sendo utilizado como emenagogo, antiviral especialmente para casos de sarampo e contra hepatite. Há relatos, ainda, de que seu uso externo seja bastante comum principalmente para a eliminação de parasitas. Na medicina popular turca, os frutos maduros são usados externamente para cicatrização rápida das feridas e internamente para o tratamento de úlceras pépticas (GROVER & YADAV, 2004). Os frutos também são utilizados na fabricação de sabão para lavagem de roupa no meio rural (RIGOTTI, 2005).

2.2.5 Potencial Medicinal

2.2.5.1 Atividade hipoglicemiante

Muitos componentes têm sido identificados no extrato dos frutos de *M. charantia* com atividade contra o diabetes. Raza *et al.*, (1996) demonstrou que esses extratos conseguem estimular o armazenamento de glicogênio pelo fígado e a secreção de insulina pelo isolamento das ilhotas de Langerhans, sugerindo que os frutos apresentam capacidade de mimetizar a ação da insulina em humanos. Segundo Bragança (1996), o efeito anti-hiperglicemiante se deve ao sitosterol presente nos frutos. Este tem ação periférica e consegue reduzir a síntese de

glicose hepática pela inibição das enzimas gliconeogênicas como a glicose-6-fosfato e a frutose-1,6-bifosfatase. Tais enzimas atuam aumentando a utilização de glicose pela via das pentoses, através da ativação de sua principal enzima a glicose-6-fosfato desidrogenase. Sua importância se nota nos estudos de Grover & Yadav (2004), que demonstraram que, quando administrado oralmente, o extrato cetônico do pó do fruto na concentração de 250 mg/kg por 15 a 30 dias em ratos aloxanizados houve uma redução da glicemia e a colesterolemia aos níveis normais mesmo após 15 dias de descontinuação do tratamento.

2.2.5.2 Atividade Antimicrobiana e Antifúngica

Os extratos aquosos, etanólicos e metanólicos do fruto de *M. charantia* têm demonstrado atividade antimicrobiana de largo espectro de ação (KHAN, 1998; MAIA *et al.* 2009), com atividade contra *Escherichia coli* (OMEREGBE *et al.*, 1996), *Helicobacter pylori* (YESILADA *et al.*, 1999) e *Staphylococcus aureus* (MAIA *et al.* 2009). Segundo Filho (2012) o extrato etanólico dos frutos da *M. charantia* L. apresentou eficácia *in vitro* contra todas as espécies testadas tanto fungos como bactérias. Foi efetivo contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri* e contra os fungos *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsiplosis* e *Candida glabrata*. Além disso, o extrato do fruto demonstrou propriedades antibacterianas contra *Helicobacter pylori*, a bactéria que causam úlcera gástrica (SAEED & TARIQ, 2005).

2.2.5.3 Atividade Gastroprotetora

O efeito gastroprotetor de algumas plantas medicinais tem sido atribuído à presença de constituintes como flavonóides, triterpenóides, taninos e esteróides. Os extratos obtidos de frutos e de folhas de *M. charantia* L., quando administrados por

via oral, inibiram as lesões gástricas induzidas por etanol, conferindo gastroproteção. (BRAGA *et al.*, 2007).

2.2.5.4 Atividade citotóxica

Estudos de Manoharan (2010) demonstraram o potencial efeito *in vitro* anticâncer dos extratos do fruto de *Momordica charantia* L. 800 µg/mL do extrato bruto solúvel em água dos frutos de *Momordica charantia* L. foi de grande efetividade na inviabilidade celular de seis diferentes linhagens de câncer (1231N1, Gos-3, U87-MG, Weri Rd-1, Corl-23, Sk Mel). Os resultados mostram que em todas as linhagens celulares de diferentes cânceres o extrato conseguiu diminuir significativamente a viabilidade celular, ou seja, essas células morreram em comparação com as células não tratadas.

Aliado a isso, os resultados também mostraram que o extrato bruto teve pouco ou nenhum efeito sobre a morte de linhagem de células (L6) do músculo esquelético saudável. O mesmo trabalho, afirma que os efeitos combinados de extrato bruto solúvel em água dos frutos de *M. charantia* com Vinblastina ou Temozolomida, que são medicamentos efetivos contra o câncer, promovem uma diminuição adicional na viabilidade celular (MANOHARAN, 2010). Fang *et al.* (2012), demonstraram que a Lectina *Momordica charantia* (MCL), tem capacidade inativadora de ribossomo tipo II, em carcinoma nasofaríngeo (NPC), sendo que esta proteína conseguiu induzir apoptose, fragmentação de DNA, prisão de fase G1 do ciclo celular e lesão mitocondrial em ambos os tipos de células de NPC.

2.2.6 Toxicidade, efeitos colaterais e contraindicações

Estudos clínicos têm demonstrado existir uma baixa toxicidade de todas as partes do Melão de São Caetano quando administrados por via oral em ratos. O fruto e a semente demonstram maior toxicidade comparada com as folhas e as

partes aéreas da planta. Entretanto, toxicidade e morte de animais têm sido demonstradas em laboratórios quando os extratos são injetados via intravenosa (LORENZI, 2008).

A toxicidade da *M. charantia* em animais incide, essencialmente, sobre o fígado, sistema reprodutor e principalmente sistema nervoso. Ponzi *et al.* (2010) provaram que a amostra liofilizada do extrato etanólico dos frutos de *Momordica charantia*, quando administrados por via oral em camundongos, demonstrou sinais de toxicidade aguda na dose de 2000 mg/Kg, sendo observado efeitos estimulantes do Sistema Nervoso Central (SNC) como agitação, tremores, movimentação estereotipada, agressividade e movimentação de vibrissas. Foram verificados, ainda, efeitos como cianose, piloereção, alteração respiratória, alteração da atividade motora, ocular e cardiovascular. Para a dose de 4000 mg/Kg, além destes, após 30 minutos da administração, foram observados estimulação e ação depressora específica do SNC, como saltos, taquicardia, abaixamento posterior, prostração entre outros.

Em humanos esses efeitos não foram detectados. No homem, os efeitos adversos mais frequentes foram sintomas gastrointestinais, tais como, desconforto ou dor abdominal e diarreia (DANSA *et al.*, 2007). Entretanto, é importante que pacientes que associem esta planta medicinal ao seu regime terapêutico devam ser aconselhados e monitorados, uma vez que esse uso concomitante pode gerar riscos (ROCHA, 2010).

2.2.7 Produtos comerciais e preparações culinárias

No mercado farmacêutico já existem produtos a base de *Momordica charantia* L. disponíveis nas suas diferentes formas, e comercializados, inclusive, no Brasil como demonstrado na Figura 6.



Figura 6. Exemplificação de produtos comerciais fitoterápicos que têm como base a *Momordica charantia* L. (A) cápsulas, (B) comprimidos e (C) florais.

Fonte: (A) Bioeva–Loja online de produtos naturais (B) Girassol – Loja online de produtos naturais (C) Florais de minas – Loja online de produtos naturais.

Na culinária, a *Momordica charantia* L. é bastante utilizada nas Filipinas e principalmente preparadas na forma de omeletes, saladas e pratos principais quando combinado com carnes e frutos do mar. Na Índia, é bastante utilizado na forma de *curries* temperados junto com especiarias e cúrcuma. Na Ásia, é bastante utilizada tanto na forma fresca como também enlatada ou seca. Já no Japão sua utilização é bastante comum sendo ingrediente integrante de diversos pratos. É servida, principalmente, refogada com shoyo, cozido no vapor e temperado com pimenta e gergelim preto e também na forma de *Chanpuru* que é um prato típico de Okinawa, que consiste num refogado dos melões com carne de porco e tofu como mostra a Figura 7 B (BLOG COME-SE, 2010).



(A)



(B)

Figura 7. Exemplificação de produtos culinários a base de *Momordica charantia* L. (A) Refogado e temperado com pimenta e gergelim preto (B) *Chanpuru*.

Fonte: (A) Come-se–Blogsport de culinária; (B) Skdesu – Blog de culinária japonesa

2.3 Extratos Vegetais

Extratos brutos vegetais são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais. O processo de separação desses produtos naturais bioativos corresponde a várias fases. Dentre elas, uma de grande importância é a extração a partir da matéria vegetal (JUNIOR *et al.*, 2005).

Segundo Choze (2004), a extração consegue separar um componente ou componentes específicos de uma droga vegetal através da ação de um solvente ou da mistura deles baseado em suas diferentes solubilidades. Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar (HOSTETTMAN, 2003).

Já os extratos vegetais são preparações líquidas ou em pó obtidas da retirada dos princípios ativos das drogas vegetais por diversas metodologias. Tais produtos devem receber certos cuidados principalmente no armazenamento, que deve ser feito, particularmente, no sentido de evitar que os produtos com extratos secos recebam umidade, pois, geralmente, são bastante higroscópicos, agindo a água como um facilitador para a degradação química favorecendo o crescimento microbiano (MARQUES, 2005). Já os extratos líquidos não devem ser expostos ao ar, luz, calor e umidade, pois podem apresentar substâncias extremamente sensíveis que evaporaram, oxidam e se degradam pela luz rapidamente.

Os extratos apresentam algumas limitações, como baixa estabilidade dos compostos orgânicos presentes nas soluções e o não monitoramento de possíveis substâncias tóxicas presentes nas plantas ou resultantes da decomposição dos produtos durante sua manipulação. Tais limitações fazem com que seja necessária a investigação mais aprofundada de cada extrato proveniente de plantas, bem como o desenvolvimento de produtos com maior nível tecnológico, para que produtores e consumidores possam ter segurança na utilização de extratos brutos (SILVA *et al.*, 2005).

2.3.1 Extração por Ultrassom

O ultrassom é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência de até 40 quilohertz (KHz) sendo superior à capacidade auditiva do humano. Estas ondas criam uma única vibração que causa uma variação na pressão do líquido extrator gerando assim cavitações no material vegetal em questão (LUZ, 1998).

O ultrassom pode ser usado como técnica de extração alternativa a outras técnicas, e tem sido aplicado para extração de compostos orgânicos de material aéreo particulado, carvão, xisto, solos, determinação de gordura em material biológico, determinação de estabilidade de óleo diesel e materiais vegetais. A eficiência de extração usando a técnica de ultrassom tem sido citada como igual ou melhor do que a obtida por Soxhlet (SIMÕES *et al.*, 2010).

A técnica por ultrassom apresenta ainda várias vantagens, tais como a alta reprodutibilidade, a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra, a rapidez no processamento e o baixo custo (SIMÕES *et al.*, 2010). Entretanto o banho utilizado no procedimento libera calor que pode interferir em processos metabólicos e degradação de substâncias presentes no material vegetal.

2.3.2 Extração por 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 24000 rpm. A redução drástica do tamanho de partícula e o consequente rompimento das células favorecem a rápida dissolução das substâncias, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga (SIMÕES *et al.*, 2010).

A turbólise, porém, gera problemas com substâncias voláteis, pois libera calor que pode interferir em processos metabólicos, sendo, portanto, recomendado

apenas quando se tratar de materiais de elevada dureza ou muito fibrosos como caules, raízes, rizomas ou lenhos (LEITE, 2009).

2.3.3 Extração por Maceração

Maceração é o processo no qual a droga vegetal pulverizada fica em contato com o líquido extrator em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional (estática) ou constante (dinâmica) sem renovação do líquido extrator. Ao final do processo o líquido extrator é separado e o resíduo prensado (MARTIN & BUSTAMANTE, 1993; LEITE, 2009).

Essa técnica não leva ao esgotamento total da droga vegetal devido à saturação do solvente e/ou ao estabelecimento de um equilíbrio entre o solvente e o interior da célula. Também depende de fatores como granulometria, teor de umidade, concentração e seletividade do solvente e grau de intumescimento das células (LEITE, 2009). Quando empregado em nível industrial os extratores podem ser cubas fixas ou móveis, apresentar ou não camisa de vapor e, ainda, diferenciando em tamanho, forma geométrica e presença de agitação interna (ROCHA, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar a influência da utilização de diferentes solventes e métodos de extração na composição fenólica e centesimal do extrato dos frutos de *Momordica charantia* L., além da atividade citotóxica e antimicrobiana.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o método de extração e solvente mais eficaz na extração de compostos fenólicos dos frutos da *Momordica charantia* L.;
- ✓ Quantificar os compostos fenólicos dos extratos do fruto de *Momordica charantia* L.;
- ✓ Determinar a composição centesimal dos frutos de *Momordica charantia* L.
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos do fruto de *Momordica charantia* L.
- ✓ Realizar a triagem fitoquímica dos extratos dos frutos de *Momordica charantia* L. por meio de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).
- ✓ Realizar a atividade citotóxica dos extratos do fruto de *Momordica charantia* L. em células de linhagem tumoral humanas.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

Os frutos da *Momordica charantia* foram coletados no município de Boquim, no estado de Sergipe, com localização 11°10'51.6" S e 37°35'06.7" W, ao entardecer, durante o inverno do ano de 2016 e 2017.

4.2 Preparação dos extratos vegetais

Após a coleta, os frutos foram mantidos na estufa com fluxo de ar contínuo a 40°C para secagem e, em seguida, o material foi moído e tamizado. Foram avaliados três métodos de extração e suas combinações: maceração, ultrassom, turbólise, ultrassom + maceração, turbólise + maceração e ultrassom + turbólise.

A maceração foi realizada por dois dias seguido de duas remacerações por igual período com consecutivas trocas de solvente (SIMÕES et al., 2000). A extração por ultrassom foi realizada em banho ultrassônico modelo Q1.8/40 da ULTRANIQUE®, sem aquecimento, sendo as amostras submetidas às ondas ultrassônicas durante 30 minutos (BRUNI et al., 2014, com modificações). A turbólise foi realizada em homogeneizador/triturador modelo TE-102 da TECNAL®, onde o material vegetal ficou por 5 minutos sob trituração/agitação a 20.000 rpm (OLIVEIRA et al., 2016, com modificações). Os métodos combinados foram realizados da mesma forma dos individuais. Em todos os métodos foram utilizados 5g do material vegetal para 100 mL do solvente.

Inicialmente, o solvente utilizado em todas as extrações foi etanol. O extrato etanólico foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida (temperatura aproximada de 40°C) em evaporador rotativo modelo SKL- 25A da WARMNEST®, sendo transferidos para frascos de vidro e depois para capela de exaustão para total secagem.

Posteriormente, foram obtidos novos extratos. Nestes foram utilizados o mesmo material vegetal para extração sequencial de solventes. Tais solventes foram utilizados consecutivamente para cada método de extração em ordem de sua polaridade de maneira crescente. Também foram utilizados 5 g de material vegetal para 100 mL dos solventes. A ordem utilizada dos solventes foi hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol/água (70:30). Todo o processo pode ser visualizado na Figura 8 (A e B). O rendimento das extrações foi calculado com base na massa de material vegetal seco.

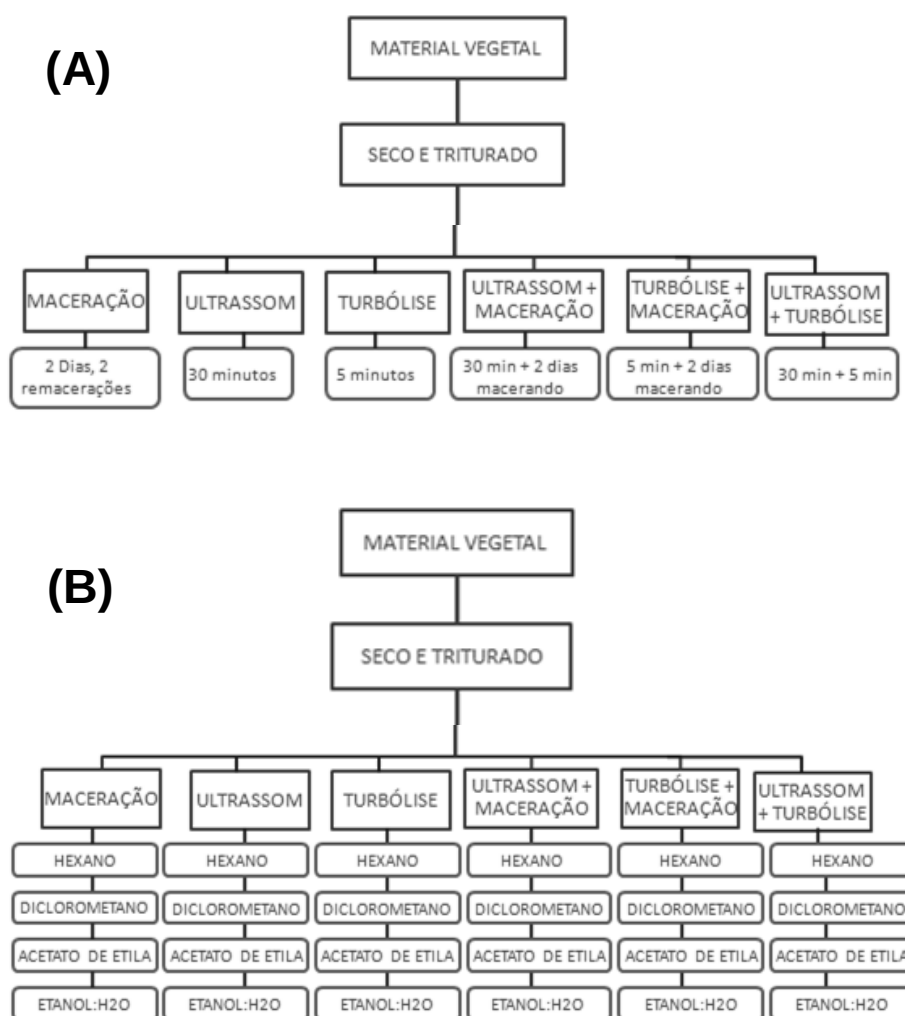


Figura 8. Fluxograma dos procedimentos para obtenção dos extratos. A - Extratos obtidos com etanol e B - Extratos obtidos com diferentes solventes

Fonte: Próprio autor

4.3 Composição centesimal

A determinação de umidade, cinzas, lipídios e proteínas foram realizadas em triplicata, de acordo com os métodos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A determinação de umidade foi realizada por gravimetria, após perda de peso da amostra submetida a aquecimento em estufa regulada a 105°C, até peso constante. As cinzas foram determinadas gravimetricamente por inicial carbonização da amostra em Bico de Bunsen e posterior incineração completa do material vegetal em mufla sob aquecimento de 550°C, por 1 hora até obtenção de um resíduo isento de carvão, com coloração branca acinzentada. O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet, que baseia-se no refluxo de solvente utilizando éter de petróleo no processo de extração intermitente. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para a transformação deste em proteína (AOAC, 1995). Os teores dos carboidratos totais foram obtidos pela diferença entre a somatória dos teores de umidade, cinzas, lipídios e proteínas em relação a 100%.

4.4 Quantificação dos compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* segundo metodologia proposta por Sousa *et al.* (2011) com modificações. Foi utilizado o ácido gálico como padrão de referência para construção da curva de calibração, obtenção da equação da reta e coeficiente de determinação. Este método é baseado na redução do reagente Folin pelos compostos fenólicos das amostras com formação de um complexo azul. As etapas do procedimento são demonstradas na Figura 9.

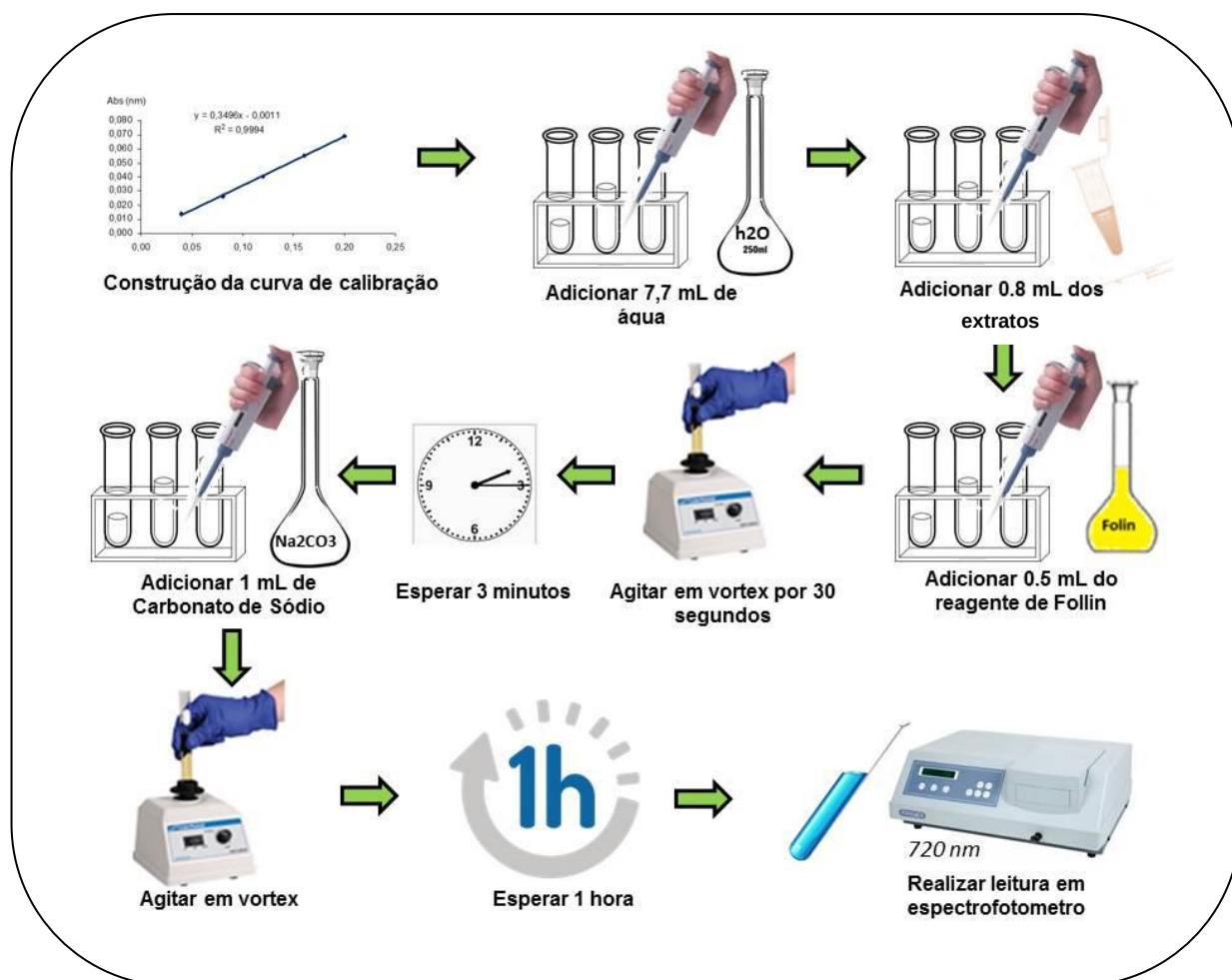


Figura 9. Etapas para determinação de compostos fenólicos pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

Fonte: Próprio autor

Inicialmente, foram adicionados 7,7 mL de água destilada em tubos de ensaio identificados e envoltos com papel alumínio. Em seguida foi acrescentado 0,8 mL dos extratos dos frutos da *Momordica charantia* L. com concentração de 2,5 mg/mL preparados no solvente extrator e, posteriormente, foram pipetados 0,5 mL do *Folin-Ciocalteu*. A solução foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e, após repouso de 3 minutos, foi adicionado 1 mL do carbonato de sódio em cada tubo. Aguardou-se 1 hora em ambiente privado de luz e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/VISÍVEL- Biospectro® SP-220 a 720 nm. Foi utilizado ácido gálico em diferentes concentrações (2 a 12,5 µg/mL), dissolvido em água destilada,

para elaboração da curva padrão e os valores de fenólicos totais foram expressos como de μg EAG (equivalente de ácido gálico) por mL de extrato.

4.5 Análise em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) dos extratos

A análise cromatográfica em camada delgada (CCDA) foi realizada sobre cromatofolhas de alumínio com gel de sílica – FLUKA® (espessura de 0,2 mm) de fase normal. A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta usando $\lambda = 254$ nm como comprimento de onda, e por imersão com solução de vanilina sulfúrica seguido de aquecimento (Adaptado de SARAIVA, 2009).

4.6 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada em parceria com o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC). Sua execução aconteceu pelo método do ensaio da atividade metabólica mitocondrial que utiliza o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) com capacidade de converter um substrato em um produto colorido (Azul de formazan), (Figura 10). Para o teste foram utilizadas linhagens tumorais humanas do tipo: HCT-116 (Colorretal), NCIH460 (Carcinoma de pulmão), PC3 (Próstata) e K562 (Leucemia Mieloide Crônica) que foram cedidas pelo *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI). Posteriormente, essas células foram cultivadas em meio específico e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os extratos foram dissolvidos em DMSO puro para concentrações de estoque de 5 mg/mL para todos os extratos. Após o tratamento, as células foram plaqueadas nas concentrações de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para linhagens PC3 e NCIH460, $0,3 \times 10^6$ e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para as linhagens K562 e HCT-116, respectivamente com tempo de incubação de 72h.

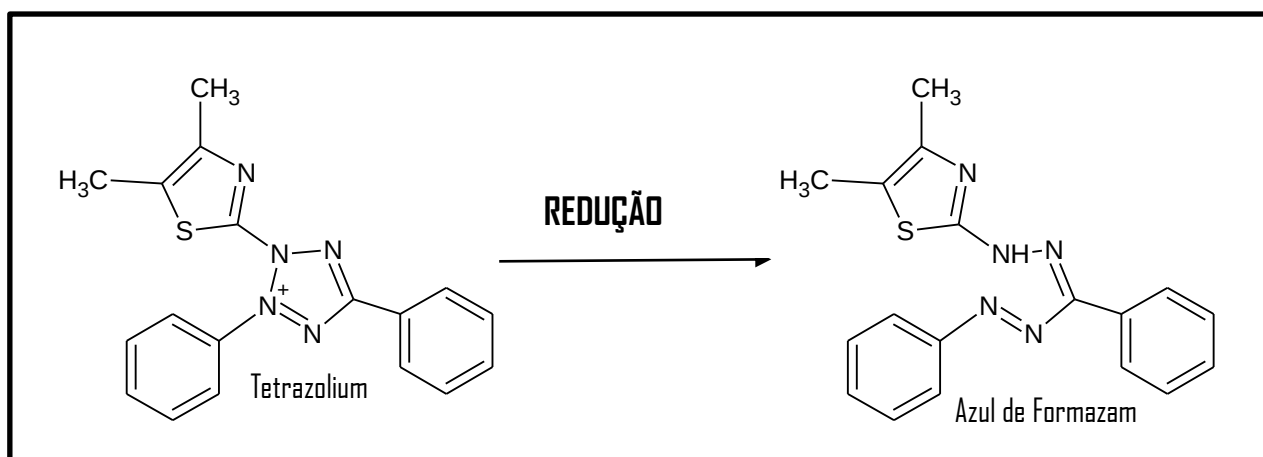


Figura 10. Reação de redução dos sais de tetrazolium em azul de formazan.

Fonte: Próprio autor- Chem Sketch 12.0

A análise de citotoxicidade pelo método do ensaio da atividade metabólica mitocondrial é comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade, como o programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 substâncias a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990).

4.7 Determinação da atividade antimicrobiana

Para a realização da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de difusão em ágar (técnica do disco) baseado no que está descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (ANVISA, 2010) e o procedimento é apresentado na Figura 11.

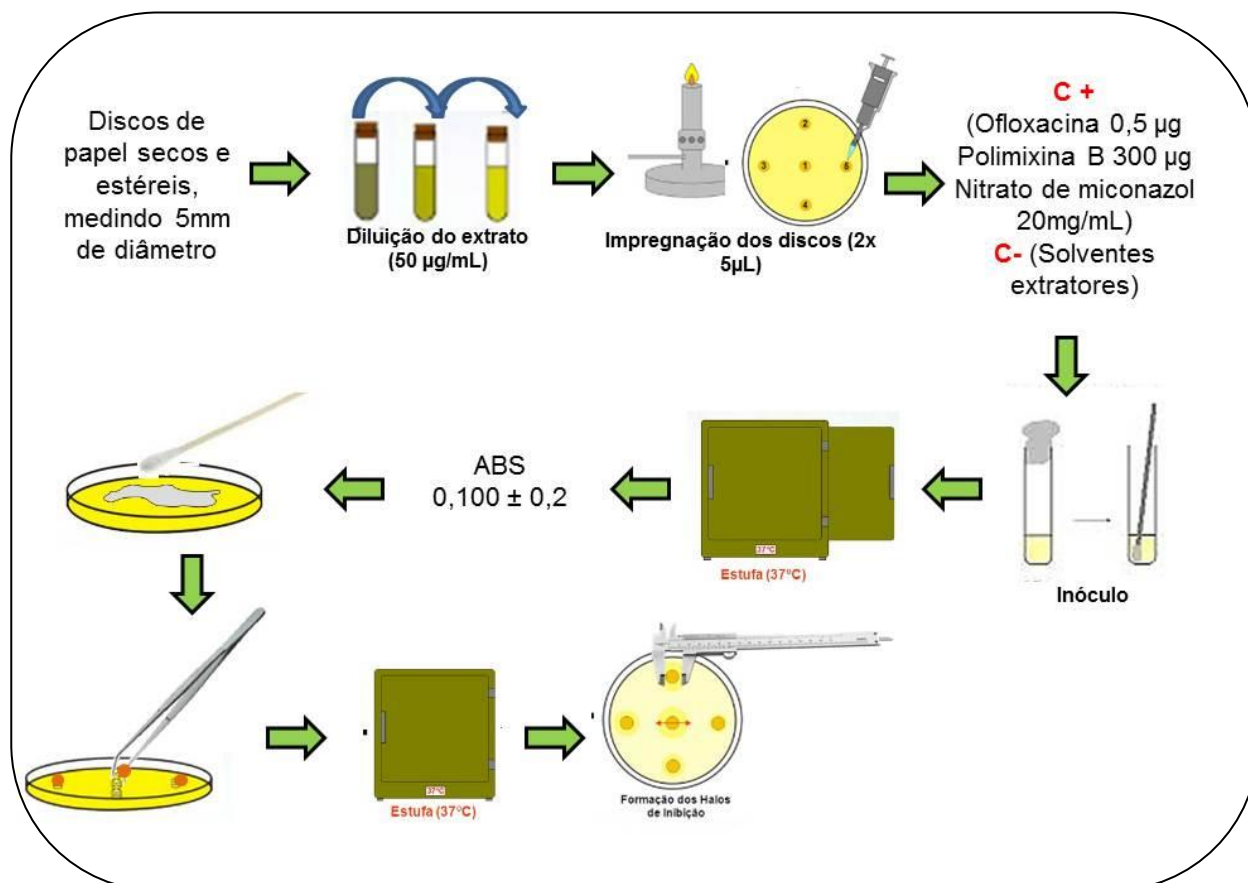


Figura 11. Etapas para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco.

Fonte: Próprio autor

4.7.1 Preparo das placas

Para o preparo de cada placa foram utilizados em torno de 20 mL de ágar nutriente ou ágar *Sabouraud por placa*, preparados de acordo com as especificações do fabricante, e vertidas nas placas de petri (Figura 11).

4.7.2 Preparo dos discos

Inicialmente, para a realização da técnica, foram utilizados discos de papel absorvente secos e estéreis, medindo 5 mm de diâmetro. Num ambiente estéril e com pipeta de volume regulável, um volume de 10 µL de extratos na concentração

de 50mg/mL dissolvidos no solvente extrator foi transferido para impregnação nos discos (realizada em duas etapas de 5 µL, quando necessário), que quando o solvente foi totalmente evaporado possuía 0,5 mg de extrato (Figura 11). Também foram preparados discos de controle negativo e positivo. Estes, continham o solvente utilizado no preparo da solução (mesmo que estes tenham evaporado antes da utilização) e uma substância conhecida com efetiva atividade contra o microrganismo em teste, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Controles positivos e negativos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
C+	Ofloxacina 0,5 µg	Polimixina B 300 µg	Nitrato de miconazol 0,2mg
C -	Metanol	Metanol	Metanol
C -	Hexano	Hexano	Hexano
C -	Diclorometano	Diclorometano	Diclorometano
C -	Acetato de etila	Acetato de etila	Acetato de etila
C -	Etanol:água (70:30)	Etanol:água (70:30)	Etanol:água (70:30)

C+ (Controle positivo), C- (Controle negativo). **Fonte:** Próprio autor

4.7.3 Preparo dos inóculos bacterianos

As linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, e o fungo *Candida albicans* ATCC 18804 foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion) e caldo Sabouraud dextrose, respectivamente, sendo posteriormente incubadas a 37°C até turvação do meio. Após turvação, cada inóculo foi lido em espectrofotômetro a uma absorbância de 600 nm e ajustada até obter a leitura com absorbância de $0,100 \pm 0,020$ de acordo com a escala de Mc Farland (Figura 11).

4.7.4 Realização do espalhamento em placa

Com um swab estéril, o inóculo bacteriano foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, deixadas em repouso em temperatura ambiente por,

aproximadamente, 3 minutos de acordo com a metodologia de Bauer & Kirby (1966) (Figura 11).

4.7.5 Disposição dos discos

Utilizando-se pinça estéril, os discos, previamente impregnados com as soluções e os controles, foram distribuídos, uniformemente, sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O halo de inibição do crescimento foi medido utilizando paquímetro. Os testes foram realizados em triplicata e em dias diferentes (Figura 11).

4.6.6 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foi utilizado o método de microdiluição em caldo seguindo a metodologia descrita na norma M7-A6 do Manual 38 *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

Foram utilizadas placas estéreis de microtitulação, contendo 96 poços dispostos em oito linhas denominadas de A-H cada uma contendo 12 poços numerados de 1-12. Os orifícios da microplaca foram preenchidos com 5 μL do extrato dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) preparados para o uso em uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$. Essa mistura foi adicionada nas colunas 1 e 2 da microplaca, e foi realizada diluição seriada iniciando da coluna 2 com meio de cultura. Foram retirados 100 μL da mistura que posteriormente era adicionada ao poço da coluna seguinte que era homogeneizado, e sucessivamente repetia-se a processo até a coluna 12, sendo desprezado os 100 μL restantes. Subsequentemente, foi distribuída a suspensão dos microrganismos em cada poço. As concentrações dos extratos variaram de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ até 500 $\mu\text{g/mL}$. Para cada isolado foram inclusos controle negativo (apenas o meio de cultura) e positivo (meio

de cultura + suspensão bacteriana). As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, e após a incubação foram analisados os resultados em leitor de ELISA baseado na absorbância de cada amostra. Para que a cor do extrato não interferisse nos resultados, um branco com extrato + meio de cultura foi utilizado para zerar o equipamento.

4.8 Análise estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de triplicatas. Diferenças estatisticamente significativa foram reportadas quando os resultados apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$) aplicando-se ANOVA, seguidos de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas usando o programa PRISMA 5.0, *GraphPad Prism* versão 6.0. e o Microsoft office Excel 2010. O detalhamento das análises estatísticas de compostos fenólicos encontra-se no Anexo 1 (p.75).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

O rendimento dos extratos variou tanto de acordo com o método de extração utilizado como com os diferentes solventes, assim apresentados na figura 12. Para todos os métodos foi utilizada a mesma proporção de material vegetal e solvente, (5g da planta seca pulverizada e 100 mL do solvente).

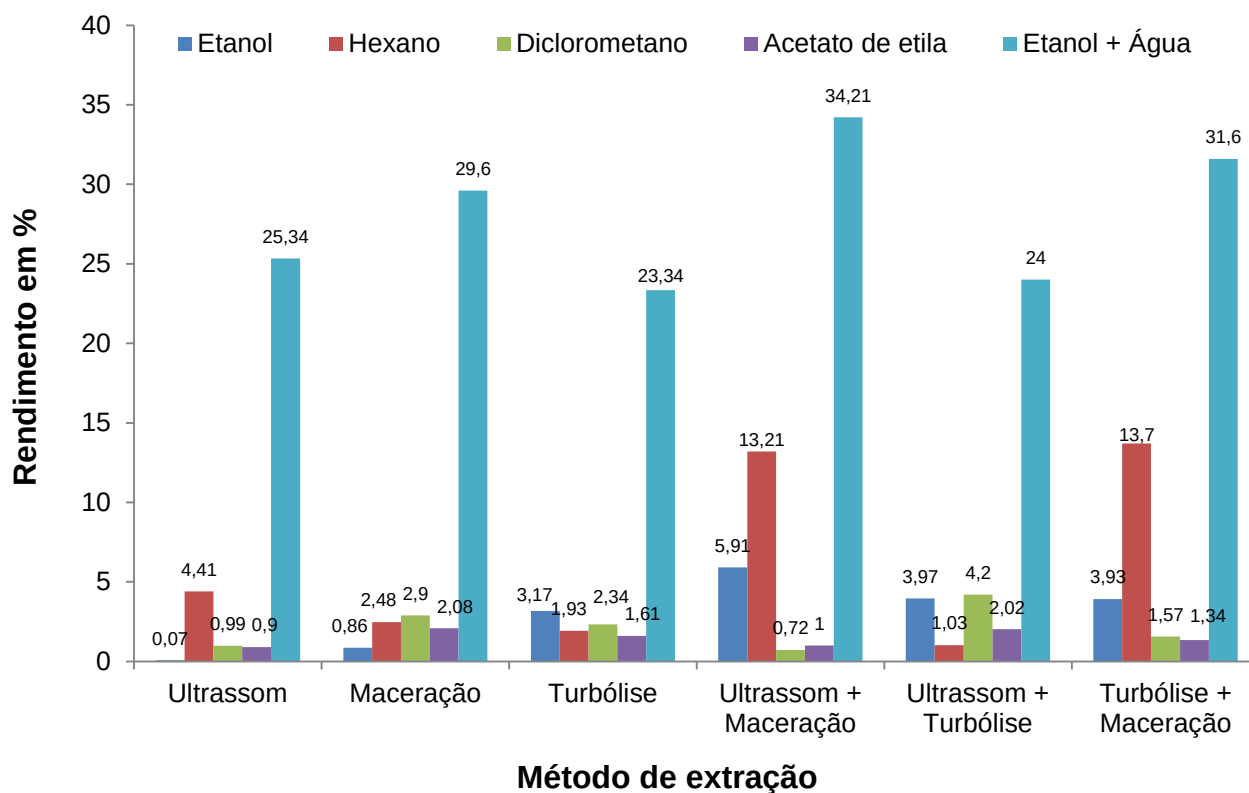


Figura 12. Rendimento em % dos extratos obtidos a partir dos frutos de *Momordica charantia*.

Fonte: Próprio autor

A partir dos resultados foi possível verificar que os maiores rendimentos aconteceram quando foi utilizado o solvente hidroalcoólico em métodos combinados.

Numericamente, o método que rendeu maiores quantidades de extrato em valores absolutos foi aquele onde se combinou os métodos de ultrassom associado a maceração seguidos da turbólise associado a maceração extraídos com etanol + água, no entanto, não foi possível realizar a análise estatística desse teste uma vez que, para cada método, foi preparado um único extrato. Segundo Tiwari *et al.* (2011), os métodos extrativos influenciam diretamente na extração, e consequentemente no rendimento total do extrato.

No processo extrativo, quando aplicado o ultrassom, ocorre alternância de compressão (pressão positiva) e rarefação (pressão negativa) nas ondas, podendo ocorrer um fenômeno chamado cavitação. A cavitação consiste no crescimento aparente e colapso de bolhas dentro do líquido, essas bolhas se expandem durante a pressão negativa e implodem violentamente, promovendo ondas com energia de cisalhamento muito elevadas e turbulência (BERNARDO *et al.*, 2016). Já a turbólise, devido à trituração e homogeneização constante da droga vegetal e do solvente também resultam em grandes rendimentos dos extratos (MARQUES & VIGO, 2009). A combinação dessas técnicas junto à maceração pode favorecer de forma positiva para um maior rendimento dos extratos.

Ainda segundo Tiwari *et al.* (2011), além do método utilizado, o solvente também influencia no conteúdo final da extração. Levando em consideração os resultados pode ser visto que o solvente hidroalcoólico possui melhor rendimento em todos os métodos. Esta diferença entre os rendimentos de extração utilizando tal solvente deve-se ao fato da mistura etanol + água se comportar como solvente anfifílico e extrair tanto substâncias com caráter polar quanto de média apolaridade, resultados semelhantes a outros estudos realizados por Karabegović *et al.* (2014). Além disso, a composição centesimal mostrou altas quantidades de carboidratos no fruto sendo estes muito solúveis em água e facilmente extratos quando a mesma é utilizada como solvente.

5.2 Composição Centesimal

Os resultados da composição centesimal dos frutos de *Momordica charantia* coletadas na cidade de Boquim são apresentados na Tabela 4. Dentre os elementos analisados, o que apresentou maiores concentrações foram os carboidratos, seguido das cinzas e proteínas. O que apresentou menor teor foram os lípideos seguidos da umidade.

Tabela 4. Teor de nutrientes dos frutos analisados

Parâmetro	g %*
Umidade	7,74 ± 0,2
Lípideos	1,47 ± 0,05
Cinzas	31,05 ± 0,05
Proteínas	14,7 ± 0,0
Carboidratos	60, 52 ± 0,22

Média ± Desvio Padrão. **Fonte:** Próprio Autor

Diante dos resultados é possível perceber que os frutos do Melão de São Caetano são ricos principalmente em carboidratos e proteínas. Por esse motivo em países como a China os frutos são consumidos como alimento nutritivo (SHIH *et al.*, 2008). De acordo com Bakare *et al.* (2010) tais características ainda determinam o alto potencial dos frutos se tornarem um componente da dieta ou um suplemento dietético.

Bakare *et al.* (2010) também determinou a composição centesimal dos frutos de *Momordica charantia* coletados em Lagos State na Nigéria. Os resultados encontrando foram similares ao deste estudo e a composição centesimal também apresentou baixas porcentagens de umidade, além de maiores quantidades de carboidratos e proteínas. Entretanto, os resultados diferem na composição de cinzas e lipídeos estando os resultados do presente trabalho respectivamente maiores e menores. Isso deve-se a fatores que podem alterar o conteúdo das substâncias presentes no extrato como, efeitos de sazonalidade e colheita.

5.3 Compostos fenólicos

5.3.1 Curva de calibração

A Figura 13 apresenta a curva de calibração obtida através das absorbâncias das diferentes concentrações de ácido gálico. A equação da reta: $y = 107,51x - 0,0174$, apresentou coeficiente de determinação linear foi de $R^2 = 0,9942$.

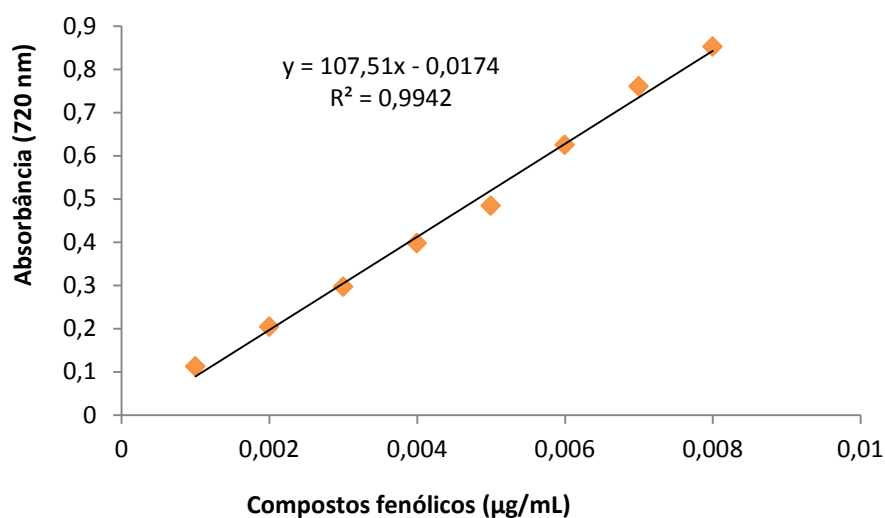


Figura 13. Curva de calibração obtida com diferentes concentrações de ácido gálico para determinação de compostos fenólicos.

Fonte: Próprio autor

Vale ressaltar que a legislação brasileira recomenda que, para métodos analíticos, seja construída uma curva com, no mínimo, cinco concentrações diferentes e que apresente um R^2 superior a 0,99 (ANVISA, 2017).

5.3.2 Determinação dos compostos fenólicos dos extratos

A quantificação total de fenóis de cada extrato foi feita através da resolução matemática da equação da reta obtida a partir da curva de calibração de ácido gálico preparada anteriormente, onde x corresponde à concentração de ácido gálico e y corresponde à absorbância da amostra. O teor de fenóis foi expresso em µg EAG

(equivalente de ácido gálico) por mL de extrato do fruto da *Momordica charantia* L. Os resultados para quantificação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos são apresentados nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18.

A partir da análise da Figura 14 pode-se afirmar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na utilização de diferentes métodos de extração de compostos fenólicos do fruto da *Momordica charantia* L quando obtidos com etanol como solvente extrator. Nesse caso, o método de extração mais eficaz foi aquele em que se combinou ultrassom com maceração, com $2,896 \pm 0,041 \mu\text{g}$ de EAG/ mL de extrato. Da mesma forma, pode-se afirmar que o método menos eficiente para extração de compostos fenólicos com esse solvente é aquele onde se utilizou apenas a ultrassom.

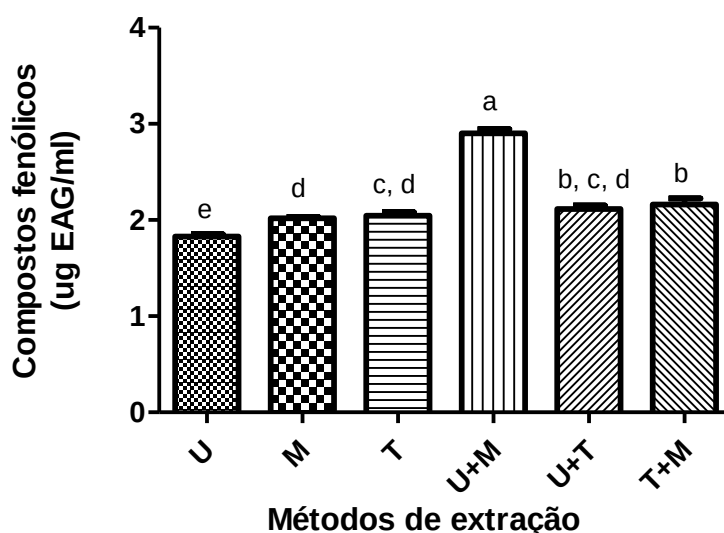


Figura 14. Compostos fenólicos (μg EAG/mL) de extratos etanólicos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor - Prisma 5.0

Nesse caso, foi possível perceber estatisticamente que quando se utiliza individualmente a maceração ou ultrassom como método extrativo estes são considerados métodos menos eficazes se aplicados individualmente do que quando são combinados. A aplicação do ultrassom pode ter causado um efeito adicional na

extração, por causar cavitações no material vegetal (Jacques, 2005) o que pode favorecer maior extração de compostos durante a maceração.

No entanto, na literatura foram achados estudos que também compararam os teores de compostos fenólicos totais de frutos de Melão de São Caetano produzidos por ultrassom. Lee *et al.* (2017) mostraram que a concentração de compostos fenólicos desses extratos foi de $425,98 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$ de material seco de compostos fenólicos totais. Mas, esses dados não podem ser comparados com o do presente trabalho pois estão em unidades diferentes.

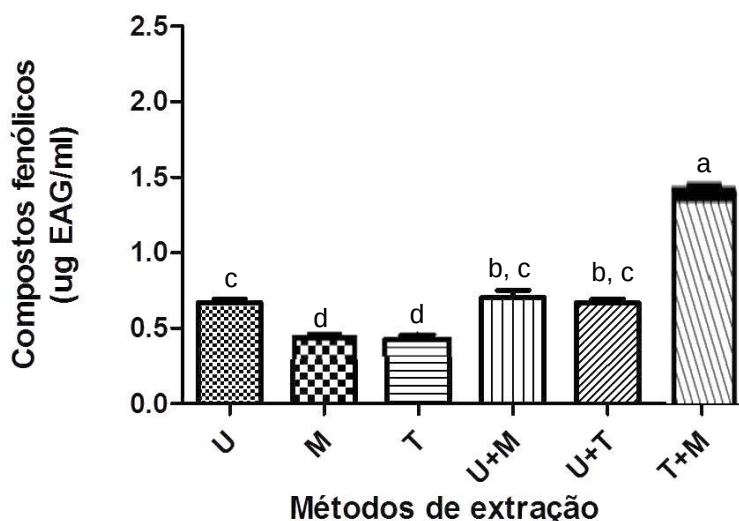


Figura 15. Compostos fenólicos ($\mu\text{g EAG/mL}$) de extratos hexânicos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor - Prisma 5.0

Através da análise da Figura 15 é possível confirmar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na utilização de diferentes métodos de extração de compostos fenólicos do fruto da *Momordica charantia* L quando obtidos com hexano como solvente extrator. Pode-se destacar nesse caso, que não houve diferença estatística entre os métodos de maceração e turbólise, sendo estes considerados os menos

efetivos. Da mesma forma, pode-se afirmar que quando utilizado a turbólise associado a maceração em combinação a eficiência do método é aumentada em relação aos métodos aplicados individualmente. A aplicação da turbólise prevê elevação da velocidade de agitação, pulverizando as partes da planta até o rompimento total das células vegetais (MARQUES, 2014), o que também pode favorecer maior extração de compostos durante a maceração.

Oliveira (2016) demonstrou a influência exercida pelos diferentes métodos extrativos na extração de compostos fenólicos utilizando pequenos volumes de solvente, onde os maiores rendimentos foram obtidos por maceração e turbólise, separadamente. Segundo ele, nessas técnicas, respectivamente, o solvente entra em contato com a droga vegetal, viabilizando a dissolução dos compostos no solvente empregado e a agitação mecânica, favorece a homogeneização e maior eficiência na dissolução de compostos e sua consequente extração. No presente trabalho pode-se verificar que a combinação deles pode favorecer ainda mais a extração de constituintes do material vegetal, pois o maior tempo de contato da droga vegetal com o solvente garantido pela maceração favorece a extração de metabólitos secundários após o rompimento das células causado por diferentes mecanismos pelas ondas ultrassônicas e a turbólise.

No entanto, na literatura foram achados estudos que também compararam os teores de compostos fenólicos totais de extratos hexânicos de frutos de Melão de São Caetano. Sirikhwan (2014) mostrou que a concentração de compostos fenólicos desses extratos foi de 40 µg/g de material seco de compostos fenólicos totais. Mas, esses dados não podem ser comparados com o do presente trabalho pois estão em unidades diferentes.

A partir da análise da Figura 16 pode-se confirmar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na utilização de diferentes métodos de extração de compostos fenólicos do fruto da *Momordica charantia* L quando obtidos com diclorometano como solvente extrator. O método de extração mais eficaz, neste caso, foi aquele em que se utilizou individualmente a turbólise, obtendo $0,713 \pm 0,045$ µg de EAG/mL de extrato. Da mesma forma, pode-se afirmar que os métodos menos eficientes para extração de compostos fenólicos com esse solvente foram aqueles onde se utilizou apenas a maceração, a maceração combinada a ultrassom e a ultrassom

combinada a turbólise. Assim sendo, subteme-se que nem a maceração nem o ultrassom são as melhores técnicas para extração com este solvente.

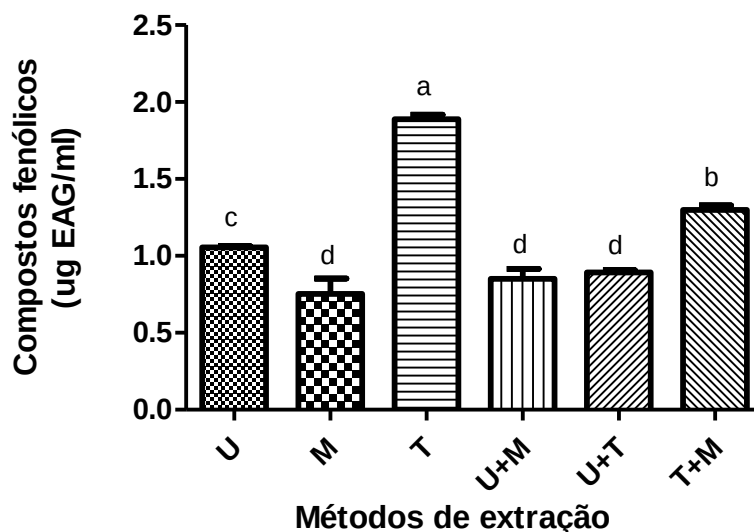


Figura 16. Compostos fenólicos (µg EAG/mL) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com diclorometano por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor - Prisma 5.0

Nesse caso, a turbólise foi considerada como melhor método extrativo para compostos fenólicos quando utilizado diclorometano como solvente, justamente pela sua alta capacidade de pulverização das partes da planta. Além disso, é possível afirmar que métodos combinados não exercem um efeito adicional sob a extração de compostos fenólicos quando utilizado esse solvente. Ao mesmo tempo em que, a maceração e ultrassom não foram tão eficazes combinadas a turbólise quanto a ela individualmente. Isso pode ser explicado porque a maceração é uma técnica lenta que não leva ao esgotamento total da droga vegetal diferentemente da turbólise, que leva ao quase esgotamento total (ASPÉ & FERNANDEZ, 2011). Já no ultrassom, o calor e a pressão exercidos pelo equipamento podem degradar e modificar irreversivelmente alguns compostos, por isso, quando combinado a turbólise esse método tenha sido um dos menos eficazes (BOUABDELLI *et al.* 2012).

No entanto, na literatura foram achados estudos que também compararam os teores de compostos fenólicos de extratos de frutos de Melão de São Caetano produzidos com diclorometano. Sirikhwan (2014) mostrou que a concentração de compostos fenólicos desses extratos foi de 351 $\mu\text{g/g}$ de material seco de compostos fenólicos totais. Mas, esses dados não podem ser comparados com o do presente trabalho pois estão em unidades diferentes.

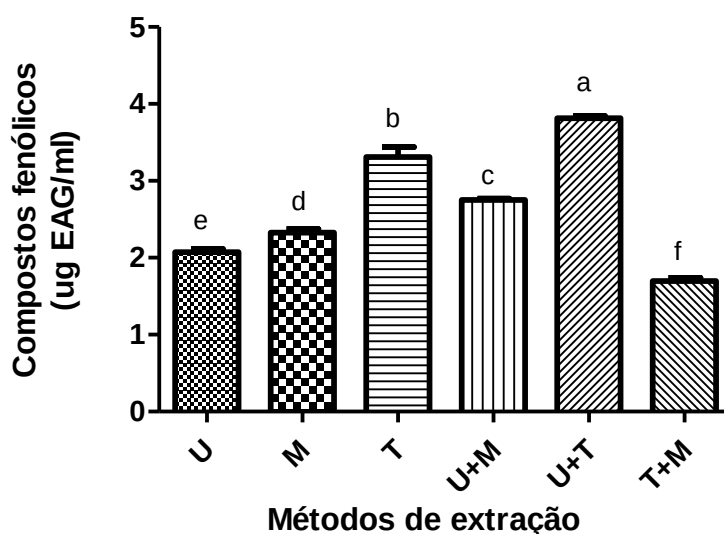


Figura 17. Compostos fenólicos (μg EAG/mL) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com acetato de etila por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor - Prisma 5.0

Analisando a Figura 17 foi possível concluir que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na utilização de diferentes métodos de extração de compostos fenólicos do fruto da *Momordica charantia* L quando obtidos com acetato de etila como solvente extrator. Pode-se afirmar nesse caso, que o método de extração mais eficaz foi aquele em que se utilizou de forma combinada a ultrassom e turbólise, obtendo $3,814 \pm 0,028$ μg de EAG/ mL de extrato.

Da mesma forma, pode-se afirmar que o método em que se combina turbólise e maceração é menos eficiente para extração de compostos fenólicos com este solvente. Isso pode ser possível porque as cavitações geradas no material vegetal

seguidas da alta força de cisalhamento garantiram um efeito adicional na extração dos compostos fenólicos.

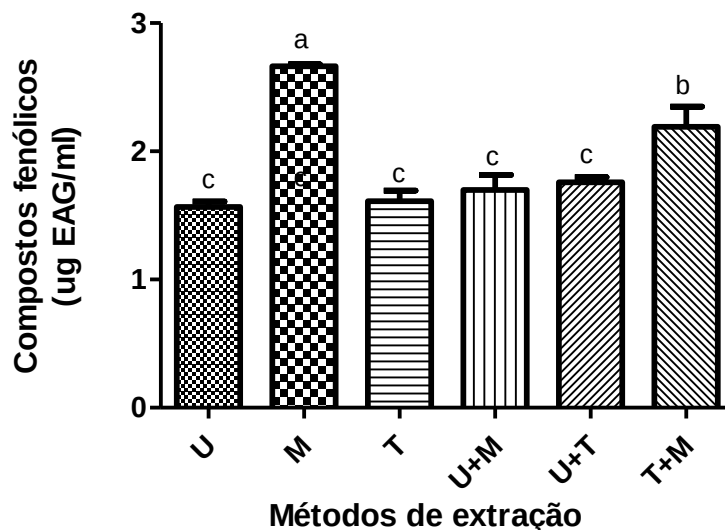


Figura 18. Compostos fenólicos (µg EAG/mL) de extratos dos frutos de *Momordica charantia* obtidos por extração com etanol + água (70:30) por diferentes métodos. M – Maceração; U – Ultrassom; T – Turbólise; U+M – Ultrassom + Maceração; U+T – Ultrassom + Turbólise; T+M – Turbólise + Maceração. Diferentes letras sobre as colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Próprio autor - Prisma 5.0

A partir da análise da Figura 18 pode-se verificar que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na utilização de diferentes métodos de extração de compostos fenólicos do fruto da *Momordica charantia* L. utilizando solvente hidroetanólico.

Pode-se afirmar que o método de extração mais eficaz utilizando esse solvente foi aquele em que se realizou a maceração, pois se obteve $2,663 \pm 0,0016$ µg de EAG/ mL de extrato, seguida de turbólise associado a maceração, obtendo $2,192 \pm 0,0151$ µg de EAG/ mL de extrato. Da mesma forma, pode-se afirmar que todos os outros métodos foram igualmente menos eficientes para extração de compostos fenólicos, já que não diferiram estatisticamente, sendo aqueles em que se utilizou somente a ultrassom ou somente turbólise, ou quando combinava-se Ultrassom e Maceração ou ultrassom e turbólise.

A maceração se mostrou como a melhor técnica extrativa para obtenção de compostos fenólicos. Assim sendo, esta é uma técnica menos suscetível de

provocar a degradação dos metabólitos termolábeis. Além disso, nessa técnica também pode-se efetuar agitação ocasional ou constante e se utilizar de solvente fresco depois da filtração, assim respectivamente a velocidade de extração de fitoquímicos pode ser aumentada e uma extração exaustiva garantida (LEITE, 2009).

No entanto, na literatura foram achados estudos que determinaram compostos fenólicos nos extratos dos frutos maduros de Melão de São Caetano colhidos na Tailândia produzidos por maceração através da ação de uma mistura de etanol e água. Sirikhwan (2014) mostrou que a concentração de compostos fenólicos desses extratos foi de 335 µg/g de material seco de compostos fenólicos totais. Mas, esses dados não podem ser comparados com o do presente trabalho pois estão em unidades diferentes.

Entretanto, levando em consideração que as concentrações de compostos fenólicos foram obtidas da extração sequencial de solventes, sendo utilizado o mesmo material vegetal, os extratos que exibiram os maiores valores total de compostos fenólicos foi em sequência ultrassom + turbólise, ultrassom + maceração e maceração com respectivamente 7,647, 7,075 e 6,012 µg EAG/5g de material seco. Porém, outros estudos não foram identificados realizando extração sequencial de compostos fenólicos em frutos de *Momordica charantia*.

5.4 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

5.4.1 Análise em CCDA dos extratos etanólicos

A análise cromatográfica dos extratos orgânicos em CCDA está apresentada na Figura 19. Observou-se que tanto utilizando a fase móvel 1 (hexano: acetato de etila (60:40)), como a fase móvel 2 (hexano: acetato de etila (95:5)) foi possível eluir o extrato pela placa, entretanto, houve melhor separação dos componentes dos extratos aplicados com a utilização da fase móvel 2, com maior separação das substâncias.

Os extratos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, mesmo sendo obtidos por métodos de extração diferentes. Isso pode indicar que, possivelmente, os mesmos compostos bioativos foram extraídos. Além disso, foi observada uma afinidade pela fase móvel (apolar), podendo concluir a presença de compostos apolares nos extratos.

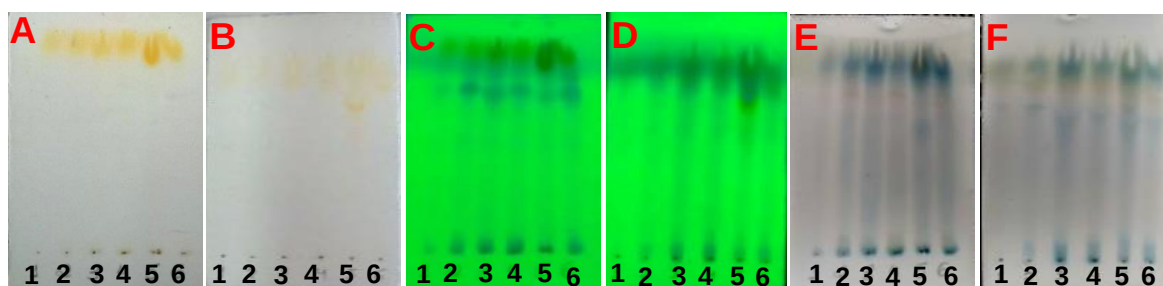


Figura 19. Cromatogramas dos diferentes extratos. A - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) sem revelação, B - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) sem revelação, C - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) revelados em UV, D- cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) revelados em UV, E - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (60:40) e revelados em vanilina sulfúrica , F - cromatografia do extrato com fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) revelados em vanilina sulfúrica. 1 – Ultrassom + Turbólise; 2 - Turbólise + Maceração; 3 – Ultrassom + Maceração; 4 - Turbólise; 5 - Maceração; 6 - Ultrassom.

Fonte: Próprio autor

Quanto aos perfis cromatográficos observados para cada amostra, pode-se notar que as manchas dos extratos fluidos obtidos por maceração correspondente à amostra 5 seguidos da ultrassom e maceração correspondente a amostra 3 foram mais intensas que as obtidas por outros métodos de extração, sugerindo que a variação do método utilizado responde às variações de concentrações de compostos bioativos entre os extratos.

Estes resultados corroboram parcialmente com os resultados obtidos para compostos fenólicos extraídos com etanol onde o maior teor desses constituintes foram aqueles obtidos por ultrassom e Maceração.

5.4.2 Análise em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos com diferentes solventes

Os extratos brutos e suas frações, de várias técnicas extrativas com vários solventes foram analisados por CCDA. Os extratos foram organizados de acordo com o solvente utilizado em 4 placas de 5x3 mm dispostos na seguinte ordem: Hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol:água e nestas distribuídos os seis métodos extrativos na seguinte ordem: Ultrassom, Ultrassom + Turbólise, Ultrassom + Maceração, Turbólise + Maceração, Turbólise e Maceração. Para revelação das substâncias os extratos obtidos com hexano, acetato de etila, diclorometano e etanol/água (70:30) a eluição aconteceu com 3 diferentes fases móveis, hexano: acetato de etila (90:10), para os extratos hexânicos e diclometânicos, hexano: acetato de etila (30:70) para os extratos obtidos com acetato de etila, e metanol (100%) para os extratos hidroalcoólicos. As placas foram vistas na luz UV no comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm e reveladas com vanilina sulfúrica.

Os compostos observados podem ser vistos nas Figuras 20 e 21. Através das placas analisadas na luz UV (Figura 20) não foi possível observar o perfil cromatográfico. Devido a este fato, tornou-se necessária a utilização de reveladores químicos, que tornaram visíveis o perfil fitoquímico com prováveis diferentes compostos que não foram captados pela luz UV.

As placas reveladas com vanilina sulfúrica indicam grandes variedades de compostos que conseguiram ser extraídos pelos diferentes métodos e solventes (Figura 21), compostos tanto com características polares como apolares. De uma forma geral, os diferentes métodos de extração apresentaram perfil cromatográfico semelhante, isso pode ser notado através da semelhança entre os seis pontos de cada placa, quando se era utilizado o mesmo solvente.

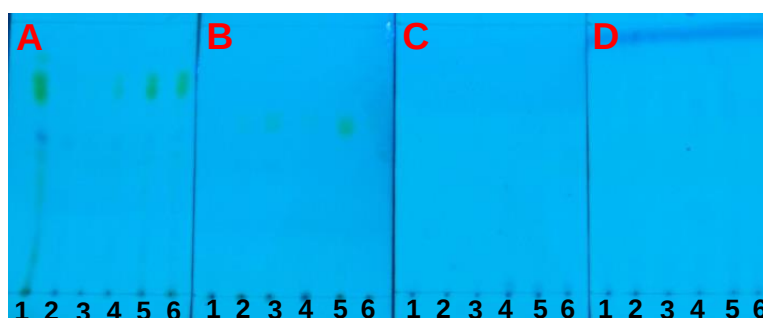


Figura 20. Cromatograma obtido dos diferentes extratos vistas na luz UV no comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm. A- cromatografia dos extratos obtidos com hexano, B - cromatografia dos extratos obtidos com diclorometano, C - cromatografia dos extratos obtidos com acetato de etila, D- cromatografia dos extratos obtidos com etanol/água (70:30). 1 -Ultrassom; 2 – Ultrassom + Turbólise; 3 – Ultrassom + Maceração; 4 – Turbólise + Maceração; 5 - Turbólise; 6 - Maceração.

Fonte: Próprio autor

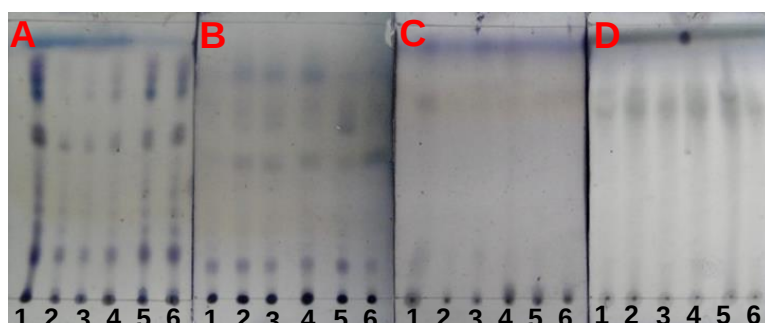


Figura 21. Cromatograma obtido dos diferentes extratos revelados em vanilina sulfúrica. A- cromatografia dos extratos obtidos com hexano, B - cromatografia dos extratos obtidos com diclorometano, C - cromatografia dos extratos obtidos com acetato de etila, D- cromatografia dos extratos obtidos com etanol/água (70:30). 1 -Ultrassom; 2 – Ultrassom + Turbólise; 3 – Ultrassom + Maceração; 4 – Turbólise + Maceração; 5 - Turbólise; 6 - Maceração.

Fonte: Próprio autor

Ainda analisando a Figura 21 é possível notar que os diferentes solventes extraíram concentrações diferentes dos mesmos componentes químicos, possivelmente, demonstrados pela intensidade da cor durante o percurso dos solventes. Neste estudo não foi possível verificar diferenças, mas Lapornik *et al.* (2015) e Pompeu *et al.* (2009) afirmaram que, utilizando-se solventes de polaridade variada sobre matrizes vegetais, é possível obter diferentes classes químicas presentes nos extratos produzidos a partir de diferentes solventes.

5.5 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica dos extratos está apresentada na Tabela 5, com seus respectivos percentuais de inibição. Os dados estão apresentados como média dos valores de percentual de inibição do crescimento celular, quando comparado ao controle, em $\mu\text{g/mL}$ e Erro Padrão Médio (EPM) de experimentos realizados pelo método do MTT após 72 horas de incubação.

Apenas as substâncias que apresentarem valores de inibição $\geq 75\%$ 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. Sendo assim, e diante dos resultados foi possível observar que nenhum dos extratos testados apresentaram potencial citotóxico *in vitro*.

Tais resultados diferem de muitos outros estudos com atividades já comprovadas. Como os estudos de Pitchakarn *et al.* (2010) que confirmaram que dentre os diversos compostos presentes nos frutos de *Momordica charantia*, o isolado dos triterpenos tem demonstrado potente atividade citotóxica *in vitro* frente ao câncer de próstata durante 24 e 48 h quando usado em concentrações superiores a $100\ \mu\text{g} / \text{mL}$. Além disso, Kwatra *et al.* (2013) comprovaram que o extrato etanólico dos frutos do Melão de São Caetano conseguiu inibir a proliferação das células de câncer de cólon humano na concentração de $57\ \mu\text{g} / \text{ml}$, através da parada do ciclo celular nas fases S, G2 e M. Já relacionado ao carcinoma de pulmão, Fan *et al.* (2015) demonstraram que a proliferação celular de adenocarcinoma de pulmão humano foi significativamente suprimida após o tratamento com proteínas isoladas dos frutos de *Momordica charantia*. As proteínas α -Momorcharina (α -MMC) e a Proteína momordica (MAP30) usadas na proporção de 210 mg e 100 mg, respectivamente, apresentam uma atividade antitumoral potente.

Tabela 5. Atividade citotóxica *in vitro* exibida pelos extratos dos frutos de *Momordica charantia* pelo método de MTT.

Amostra	Linhagens							
	HCT-116		PC3		K562		NCIH460	
	Média %	EPM %	Média %	EPM %	Média %	EPM %	Média %	EPM %
1	3,65	2,97	20,40	5,32	-	-	1,35	3,13
2	0,00	0,94	12,08	4,21	-	-	2,09	2,30
3	8,17	6,54	23,53	7,49	-	-	11,44	0,98
4	10,24	3,62	23,06	4,50	-	-	8,97	3,20
5	6,03	10,34	30,12	7,93	-	-	19,85	5,30
6	20,93	6,08	31,09	5,82	-	-	15,11	-
7	0,14	5,06	14,72	1,52	30,89	4,49	13,91	6,02
8	14,00	0,63	21,77	1,61	30,89	4,49	35,54	3,39
9	13,17	1,26	20,83	2,94	28,31	5,29	22,90	0,76
10	14,19	0,00	0,00	0,95	22,18	1,38	0,19	5,42
11	13,17	0,54	21,37	0,85	18,53	4,67	17,69	2,88
12	19,36	2,98	22,44	2,18	25,87	3,56	24,34	3,81
13	6,40	0,00	20,03	0,47	37,56	2,44	36,56	4,15
14	8,12	2,44	10,36	1,80	22,80	7,33	4,99	0,85
15	19,49	1,53	29,09	0,95	26,09	5,20	32,07	0,85
16	47,07	1,90	33,79	0,57	56,53	0,44	54,11	1,69
17	10,68	2,08	18,82	2,18	46,62	0,22	19,13	1,02
18	8,51	0,09	12,51	1,23	40,76	1,02	6,48	2,80
19	7,68	0,00	23,05	0,76	34,04	0,53	16,79	2,46
20	21,34	1,99	18,89	3,61	34,71	2,18	17,81	1,02
21	17,89	0,18	6,26	3,80	45,20	1,11	9,00	3,13
22	0,00	0,18	11,10	2,47	34,76	5,42	6,37	0,93
23	10,61	4,70	45,81	4,08	53,42	0,18	55,67	1,02
24	44,84	4,70	12,98	0,38	37,24	1,42	13,19	0,93

EPM - Erro Padrão Médio; HCT-116 – Cólorretal; PC3 – Próstata; K562 - Leucemia Mieloide Crônica; NCIH460 - Carcinoma de pulmão.

Fonte: Próprio autor

Ainda nesse sentido a citotoxicidade dos cucurbitanos isolados dos frutos de *Momordica charantia* também foi testada contra outras linhagens de células tumorais *in vitro*, MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), Doay (meduloblastoma), HEp-2 (carcinoma da laringe humano) e wDr (adenocarcinoma do colon humano), também utilizando o método colorimétrico MTT, tal substância demonstrou promissora atividade citotóxica quando utilizada nas concentrações 10-20 µg / mL (ZHANG et al., 2010).

Entretanto, é possível perceber que a maioria das atividades comprovadas acima utilizam substâncias isoladas dos frutos de *Momordica charantia* diferentemente do que foi realizado nesse trabalho. Geralmente, os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (MUNDO, 2007), tais substâncias, quando utilizadas isoladamente, favorecem a ocorrência de efeito adicional nas atividades biológicas por se tornarem mais seletivas e potentes. Além disso, a influência da sazonalidade sobre a constituição química das plantas pode alterar a amplitude das ações biológicas desempenhadas por seus extratos ou frações (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Porém, é importante destacar que dentre os extratos testados aqueles que obtiveram maiores porcentagens de inibição celular foram os extratos obtidos turbólise + maceração (Hexano) obtendo % de inibição de 56,53 e 54,11 e o extrato obtido por maceração (Etanol + água) com % de inibição de 53,42 e 55,67 para linhagens de leucemia mieloide crônica e carcinoma de pulmão respectivamente.

5.6 Atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram testados 30 extratos, destes seis etanólicos, seis hexânicos, seis diclorometânicos, seis extraídos com acetato de etila e seis hidroalcoólicos. No presente estudo, foi demonstrada atividade antimicrobiana do extrato dos frutos de *Momordica charantia* L, somente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* na concentração testada de 50mg/mL, equivalendo a 0,5 mg em cada disco como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos frente às linhagens bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e fúngica *Candida albicans*.

Extratos		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C.albicans</i>	
		Halo (mm)	DP	Halo (mm)	DP	Halo (mm)	DP
1	ETANOL- Ultrassom + Turbólise	-	-	-	-	-	-
2	ETANOL- Turbólise + Maceração	-	-	-	-	-	-
3	ETANOL- Ultrassom + Maceração	-	-	-	-	-	-
4	ETANOL- Turbólise	-	-	-	-	-	-
5	ETANOL- Maceração	-	-	-	-	-	-
6	ETANOL- Ultrassom	-	-	-	-	-	-
7	HEXANO- Ultrassom + Turbólise	-	-	-	-	-	-
8	HEXANO- Turbólise + Maceração	10,4	0,1	-	-	-	-
9	HEXANO- Ultrassom + Maceração	-	-	-	-	-	-
10	HEXANO- Turbólise	-	-	-	-	-	-
11	HEXANO- Maceração	9	0,3	8,5	0,5	-	-
12	HEXANO- Ultrassom	-	-	-	-	-	-
13	ACETATO DE ETILA- Ultrassom + Turbólise	9,76	0,231	-	-	-	-
14	ACETATO DE ETILA- Turbólise + Maceração	-	-	-	-	-	-
15	ACETATO DE ETILA- Ultrassom + Maceração	-	-	-	-	-	-
16	ACETATO DE ETILA- Turbólise	9,8	0	-	-	-	-
17	ACETATO DE ETILA- Maceração	12,56	0,35	-	-	-	-
18	ACETATO DE ETILA- Ultrassom	-	-	-	-	-	-
19	DICLOROMETANO- Ultrassom + Turbólise	-	-	-	-	-	-
20	DICLOROMETANO- Turbólise + Maceração	-	-	-	-	-	-
21	DICLOROMETANO- Ultrassom + maceração	-	-	-	-	-	-
22	DICLOROMETANO- Turbólise	-	-	-	-	-	-
23	DICLOROMETANO- Maceração	-	-	-	-	-	-
24	DICLOROMETANO- Ultrassom	-	-	-	-	-	-
25	ETANOL+ ÁGUA - Ultrassom + Turbólise	-	-	-	-	-	-
26	ETANOL+ ÁGUA- Turbólise + Maceração	-	-	-	-	-	-
27	ETANOL+ ÁGUA- Ultrassom + Maceração	-	-	-	-	-	-
28	ETANOL+ ÁGUA- Turbólise	-	-	-	-	-	-
29	ETANOL+ ÁGUA- Maceração	-	-	18,36	0,4	-	-
30	ETANOL+ ÁGUA- Ultrassom	-	-	-	-	-	-

DP - Desvio Padrão. Fonte: Próprio autor

Dentre os resultados obtidos, foi possível notar uma maior sensibilidade da bactéria *Staphylococcus aureus* comparada à *Escherichia coli* uma vez que 5 dos 7 extratos com atividade conseguiram inibir o seu crescimento (Figura 22).

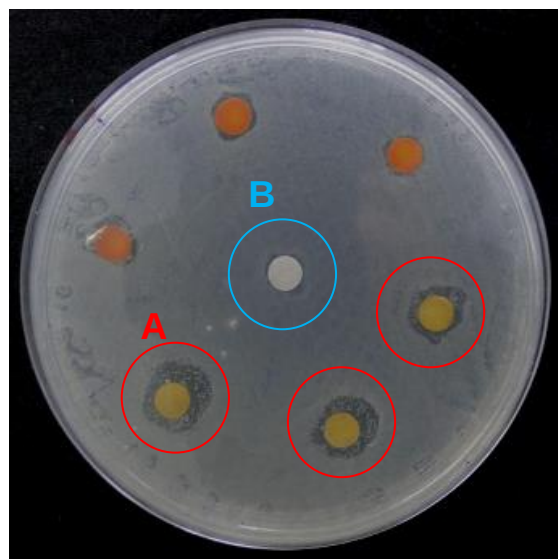


Figura 22. Halos de inibição formado pelo extrato obtido a partir da maceração, utilizando Acetato de etila como solvente frente a *Staphylococcus aureus* . A - Halos formados pelo extrato (Triplicata), B - Controle Negativo (Acetato de etila).

Fonte: Próprio autor

Esse resultado é bastante pertinente uma vez que o *S. aureus* é um microrganismo que apresenta maior capacidade multiresistente. Filho (2012) provou em seus estudos que o extrato dos frutos de *Momordica charantia* Linn, apresentaram maior sensibilidade dos isolados multiresistentes quando comparados com cepas padrão. No presente estudo não foram utilizadas cepas resistentes.

É importante salientar, o resultado da análise do extrato de número '29' frente à linhagem bacteriana de *Escherichia coli*, sendo este obtido por meio da maceração e utilizando etanol/água (70:30) como solvente extrator. O halo de inibição desse extrato apresentou-se maior do que o controle positivo utilizado no teste, a Polimixina B 300 µg, com halo de inibição de $18,36 \pm 0,4$ mm comparado ao halo de 12,1 mm do medicamento, como pode ser visualizado através da Figura 23 (p.61). Entretanto, o tamanho dos halos de inibição é diretamente proporcional à taxa de difusão das substâncias dos extratos impregnadas no papel para o meio além das suas propriedades de solubilidade e peso molecular.

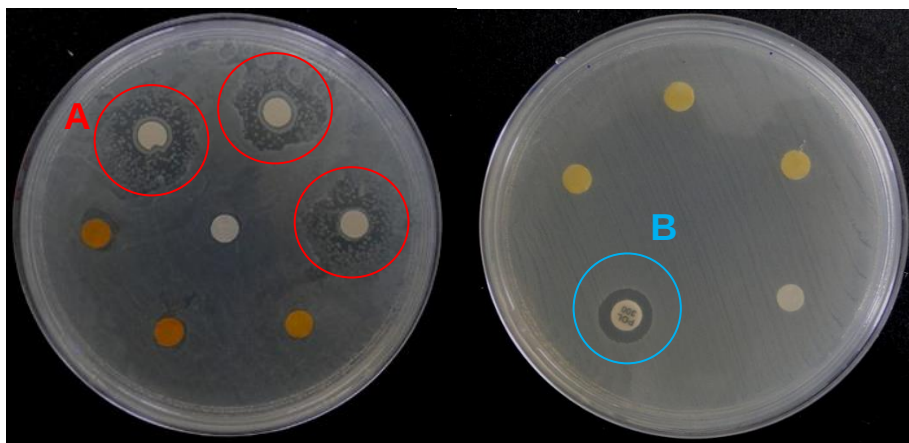


Figura 23. Halos de inibição formado pelo extrato obtido a partir da maceração, utilizando etanol/água como solvente frente a *Escherichia coli*. A- Halo formado pelo extrato (Triplicata), B- Halo formado pelo controle positivo (Polimixina B 300µg).

Fonte: Próprio autor

Entretanto, tal extrato apresentou colônias satélites (Figura 23), ou seja, colônias que podem surgir dentro do halo de inibição. Esse fenômeno pode ocorrer devido às substâncias presentes no extrato sofrerem alguma alteração nas primeiras horas de incubação o que possibilita o desenvolvimento dos microrganismos, mesmo que sensíveis a elas, a presença de mutantes resistentes ao extrato dentro da população bacteriana testada ou simplesmente a concentração utilizada não foi suficiente para inibir 100% da população bacteriana testada.

A inibição contra essa cepa também foi confirmado por Manfrin (2009), que avaliou o efeito do extrato aquoso de *M. Charantia* sobre *Escherichia coli* nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/L, observou-se que o resultado foi bastante satisfatório no controle deste microrganismo em todas as concentrações. Filho (2012), também demonstrou a eficácia do extrato dos frutos de *Momordica charantia* em baixas concentrações frente à *Escherichia coli*.

Entretanto, poucos extratos apresentaram atividade antimicrobiana, inclusive contra *Candida albicans*. Tais resultados, foram diferentes daqueles apresentados por Ponzi *et al.* (2010) que provou que o extrato hidroetanólico de *M. charantia* L. nas concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/mL foi eficaz, inibindo a linhagem *Candida albicans*. Jagessar *et al.* (2012) também comprovaram a eficiência extrato etanólico

dos frutos do Melão de São Caetano contra *Candida albicans*. Tais extratos, quando utilizados na concentração de 20mg/mL exibiram uma zona de inibição de 20 mm. No presente trabalho tais resultados podem ter ocorrido por possível perda dos metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de micro-organismos (BRAZ, 2010). Essa perda pode ter acontecido por fatores como a temperatura, idade da planta, solo, umidade, disposição ou falta de nutrientes e armazenamento que segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007) alteram a composição e a qualidade dos compostos bioativos. Contudo Jagessar *et al.* (2012) também testaram o efeito de extratos produzidos com hexano, diclorometano e acetato de etila para *Candida albicans*, todos na concentração de 3mg/mL e não tiveram uma atividade antimicrobiana significativa.

Apesar de poucos extratos terem apresentado atividade antimicrobiana, aqueles que exibiram esse efeito foram os que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos totais nas amostras. Especificamente aqueles produzidos por ultrassom + turbólise (acetato de etila), turbólise + maceração (hexano) e maceração (etanol + água). Segundo Kim *et al.* (2003), muitos dos compostos fenólicos é que são responsáveis por apresentar atividades antimicrobianas. Tal efeito só é possível, pois os compostos fenólicos exercem ação bactericida (principalmente contra bactérias Gram-positiva) e seu grupo hidroxila, que altera a permeabilidade da membrana plasmática e inativa e desnatura proteínas (ALMEIDA, 2015)

5.6.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Com base nos resultados obtidos a partir do extrato bruto (50 mg/mL), procedeu-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com todos os extratos que apresentaram halo de inibição. A Tabela 7 e a Figura 24 apresentam esses resultados.

Tabela 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

AMOSTRA / CONCENTRAÇÕES OBTIDAS (µg / mL)						
Microrganismos	Acetato de etila Ultrassom + Turbólise	Hexano Turbólise + Maceração	Acetato de etila Turbólise	Hexano Maceração	Acetato de etila Maceração	Etanol+água Maceração
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	500	250	500	500	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	500	-	500

Fonte: Próprio autor

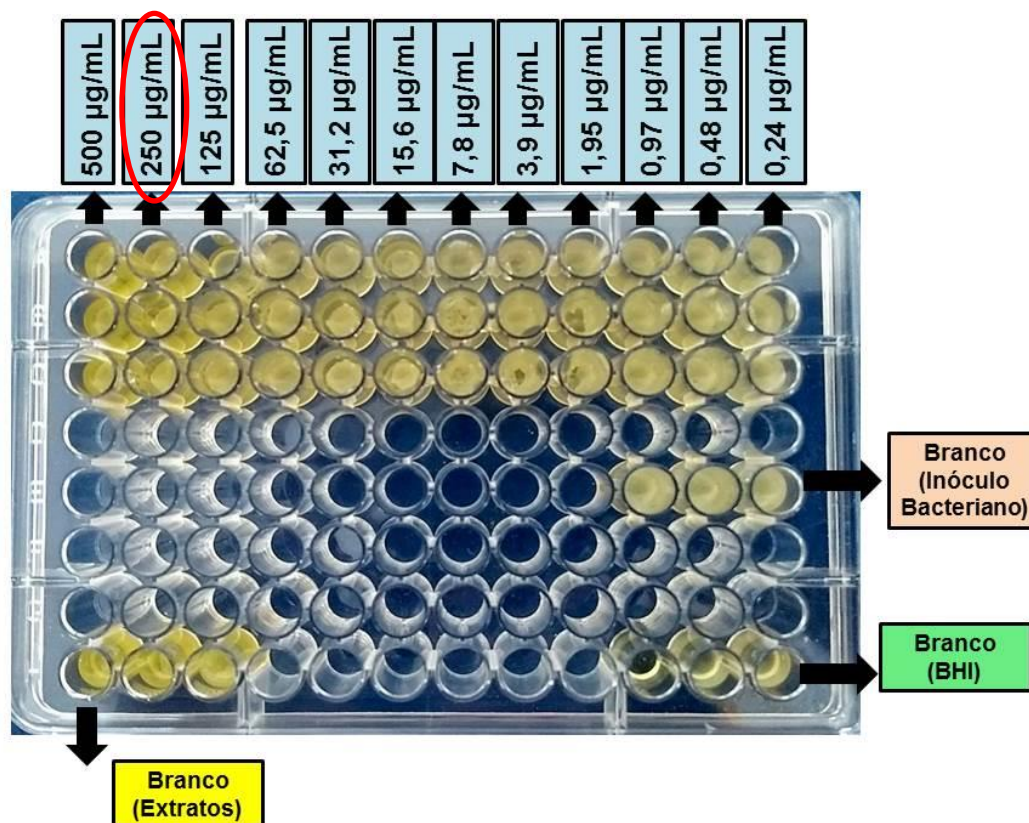


Figura 24. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato produzido com Acetato de etila por meio da Turbólise frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Fonte: Próprio autor

Diante dos resultados é possível perceber que, a menor concentração para inibir o crescimento *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi a de 125 µg/mL, garantido pelo extrato obtido por Ultrassom associada a Turbólise utilizando Acetato

de etila como solvente seguido do extrato obtido por Turbólise utilizando Acetato de etila. Ao mesmo tempo em que a menor concentração para inibir o crescimento da *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi de 500 µg/mL, provindo dos extratos obtidos por Maceração utilizando hexano ou etanol + água como solvente. Esses resultados estão de acordo com os demonstrados por Rakholya *et al* (2014), que comprovou concentrações inibitórias mínimas numa faixa de 39-1250 µg/mL para extratos do fruto de *Momordica charantia* obtidos com vários solventes e testados contra bactérias gram-positivas, gram-negativos e cepas de fungos.

Ainda, é possível afirmar que esses resultados corroboram com os resultados encontrados para compostos fenólicos uma vez que aquele extrato em que foi utilizada uma menor concentração para inibir o microrganismo em teste foi o produzido por ultrassom + turbólise (acetato de etila), sendo este o que obteve maiores quantidades de compostos fenólicos com $3,814 \pm 0,028$ µg de EAG/ mL de extrato.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados pode-se verificar que a utilização de diferentes métodos de extração e de diferentes solventes influenciou significativamente na concentração de compostos fenólicos extraídos. De uma maneira geral pode-se concluir que a combinação de métodos pode, na maioria das vezes, trazer benefícios na extração, como no caso da combinação Ultrassom/ maceração e Turbólise/ maceração. O método e solvente que mais extraíram compostos fenólicos foram ultrassom + turbólise produzidos com acetato de etila.

Também pode-se concluir que os extratos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, mesmo sendo obtidos por métodos de extração diferentes, isso indica que possivelmente não houve diferença entre a variedade de compostos bioativos que foram extraídos mas provavelmente nas quantidades

Foi possível observar que nenhum dos extratos testados apresentou potencial citotóxico *in vitro* e que poucos desses extratos apresentaram potencial antimicrobiano desejável, o que indica que, possivelmente, a sazonalidade influenciou a constituição química.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, I. & SHARMA, A. K. The influence of *Momordica charantia* on ultrastructural abnormalities of myelinated fibres in experimental diabetes. **International Journal of Diabetes**, v. 7, p.110-121, 1999.
- ALESSANDRA, B.; TIZIANA, S.; MANUELA, D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.2, p.123-125, 2008.
- ALMEIDA, R. R. Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol. 2015. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Química) – Universidade Federal de São João del-Rei, Minas Gerais.
- ALONSO. J. R. **Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas**. Ed. ISIS Ediciones SRL: Buenos Aires, p. 900, 1998.
- ANIL AKUMAR, K. R.; KUMAR, G. P.; ILAIYARAJA, N. Propriedades nutricionais, farmacológicas e medicinais *Momordica charantia*. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 1, 2015.
- ANONYMOUS, B. *Momordica charantia* (Bitter melon). **Alternative Medicine Review**, v.12, n. 4, 2007.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução no 166, de 24 de julho de 2017. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, de 02 jun 2003.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução no 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, de 05 abr 2010.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.16th ed. Washington, 1995.
- ARRUDA, E. C. P. 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). 2010. 105 f. Tese (Pós - graduação em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.
- ASPÉ, E.; FERNANDEZ, K. The effects of diferente extration techniques on extration yield phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata bark*. **Industrial Crops and Poducts**, v. 34, p. 838-844, 2011.
- ASSIS, J. P.; *et al.* Avaliação biométrica de caracteres do melão de São Caetano (*Momordica charantia* L). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.17, n.4, p.505-514, 2015.
- ASSUBAIE, N. F. & EL-GARAWANY, M. M. Evaluation of Some Important Chemical Constituents of *Momordica charantia* Cultivated in Hofuf. **Saudi Arabia Journal of Biological Sciences**, V.4, p. 628-630, 2004.

- BAKARE, R. I, et al. Nutritional and chemical evaluation of *Momordica charantia*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 21, p. 2189-2193, 2010.
- BALDWA, V. S.; BHANDARI, C. M.; PANGARIA, A.; GOYA, L. R.K. Ensaio clínico em doentes com diabetes mellitus de um composto semelhante à insulina obtido a partir de uma fonte vegetal. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 82, p.39-41, 1999.
- BARROSO, G. M; GUIMARAES, E. F; ICHASO; COSTA, C.G, PEIXOTO, A .L, **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, v.1, ed. 2ª, editora UFV, 2004.
- BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. **American Journal of Health and Systemic Pharmacology**, v. 65, p.356-359, 2003.
- BAUER A.W., KIRBY W.M.M., SHERRIS J.C. & TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. **Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.12, p.493-496, 1996.
- BERNARDO, C. O. et al. Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos. **Ciência Rural**, v.46, n.4, p. 739-746, 2016.
- BOUABDELLI, F. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 24, p. 530-535, 2012.
- BRAGA. L., T. et al. Efeito do levamisol e do extrato etanólico de folhas de *Momordica charantia* sobre a dermatofitose experimental em coelhos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2. , 2007.
- BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas. Uma abordagem multidisciplinar**. Rio de janeiro: Editora EDUFF, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **O SUS de A a Z: garantindo saúde nos municípios / Ministério da Saúde**. 3. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso: em 15 mar. 2016.
- BRAZ, R. F. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**. São Paulo, v.33, n.1, p. 229-239, 2010.
- BRUDAT, P.; SHOTRIPUK, A. Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 1, 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.
- CHOZE, RAFAEL. Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas. 2004, 47f. Trabalho de conclusão no Curso de Química do Centro de Ciências Física e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6 th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CORREA JÚNIOR, C. MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 162, 1994.

DANSA, A.; VILLARRUZA, M.; JIMENO, C.; et al. The effect of *Momordica charantia* capsule preparation on glycemic control in Type 2 Diabetes Mellitus needs further studies. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 60, p. 554-559, 2007.

DESAI, S.; TATKE, P. Charantin: An important lead compound from *Momordica charantia* for the treatment of diabetes. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, 2015;

DI STASI, L.C. & HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DUBICK, M. A.; OMAJE, S. T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: Wildman, R. E.C. (org). **Handbook of Nutraceutical and Functional Food**, v. 14, p. 143-153, 2001.

FAN, X. et al. α -MMC and MAP30, two ribosome-inactivating proteins extracted from *Momordica charantia*, induce cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, 2015.

FANG, F. E; et al. *Momordica Charantia* L., a Type II Ribosome Inactivating Protein, Exhibits Antitumor Activity toward Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells *In Vitro* and *In Vivo*. **American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 9, 2012.

FERREIRA, R. M. Efeito da infusão dos frutos de *Momordica charantia* L. em ratas diabéticas. 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais.

FILHO, J. H. S. L. Extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* sobre espécies padrão e isolados multirresistentes. 2012. 36 f. Dissertação (Bacharelado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GONZALES, F.; DIAZ, J. N.; LOWY, P. Flora Ilustrada de San Andrés y Providencia. **Sena/Universidad Nacional**, p.121, 124, 164 e 242, Colombia, 2001.

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

HOSTETTMAN, K. et al. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **edUFScar**, p. 152, 2003, São Paulo.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, p. 21, 2008.

ISMAIL, Z.; ISMAIL, N.; LASSA, J. Malaysian Herbal Monograph. **Malaysian Monograph Committee**, v.1, n. 3, 1999.

JACQUES, R. A. Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. 2005. 139 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

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, 2012.

JUNIOR, A. *et al.* Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba e da sacaca. **Química Nova**, v.28, n.4, p.719-722, 2005.

KARABEGOVIĆ, I.T. *et al.* The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v.54, p.142-148, 2014.

KENNY, O.; *et al.* Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. **Food Chemistry**, v. 141, 2013.

KHAN, M. R. *Momordica charantia* and *Allium sativum*: Broad-spectrum antibacterial activity. Korean. **Journal of Pharmacognosy**, v. 29, 1998.

KIM, J. H.; OM, A. A quantitative structure-activity relationship model for radical scavenging activity of flavonoids. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n.1: p. 29-37, 2008.

KWATRA, D. *et al.* Methanolic Extracts of Bitter Melon Inhibit Colon Cancer Stem Cells by Affecting Energy Homeostasis and Autophagy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, 2013.

LAPORNIK, B.; PROSEK, 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. 214-222. 2015.

LEE, S. H. Phenolic acid, carotenoid composition and antioxidant activity of bitter melon (*Momordica charantia*) at maturation stages. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n.3, p.1266-1273, 2017.

LEUNG, L. *et al.* Anti-diabetic and hypoglycaemic effects of *Momordica charantia* (bitter melon): a mini review. **British Journal of Nutrition**, v. 12, 2009.

LENZI, MAURÍCIO; ORTH, AFONSO I.; GUERRA, TÂNIA M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, 2005.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 328 p, 2009.

LI, W.; *et al.* Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomed**, v.3, p. 617–620, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. 1ª Ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; ABREU M., F.J. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum**, 2ª Edição, Nova Odessa – SP - Brasil, 2008.

LUZ, L. P. Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos. 1998, 108f. Dissertação (Pós-Graduação em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

MAIA, R. R., et al. Estudo do efeito antimicrobiano do extrato da goiabeira (*Psidium guajava* linn) sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.05, 36-40, 2009.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres do município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botânica Brasileira**, v.21, n.2, p.263-75, 2007.

MANFRIN, M. G.; VIEIRA, J. A.; LEME, S. G. F.; BORGES, C. M. Estudo da Atividade Antimicrobiana da *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) em Sistemas de Injeção em Fluxo, **32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza – CE, 2009.

MANOHARAN, G. Anti – câncer effects of *Momordica charantia* in- vitro. 2010. 250 f. Tese (doutorado em filosofia) - University of Central Lancashire, Inglaterra.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P. **Physical pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993.

MARQUES, M. B. **Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil**. História, Ciências, Saúde, Manguinhos, v. 7, n. 1, p. 7-21, 2000.

MARQUES, C. L. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.3, n.2, p.74-76, 2005.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. **Revista Racine**, v. 3, n. 1, 2009.

MATHLOUTHI, M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. **Food control**, Elsevier, v. 12, n. 7, p.409-417, 2001.

MENG, Y.I; et al. Um novo método para a produção simultânea de duas proteínas de inativação de ribossomos, α -MMC e MAP30, de *Momordica charantia* L. **PLoS One**, v. 13, n. 5, 2014.

MENSAH, J.K.; OKOLI, R. J.; OHAJU- OBODO, J.O. e EIFEDIYI, K. Phytochemical, nutritional and medicinal properties of some leafy vegetables consumed by Edo people of Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 14, p. 2304-2309, 2008.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; BEAN M. C. A importância de atender às necessidades de cálcio com alimentos. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n.2, 2001.

MIURA T, et al. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 47, p. 340–44, 2001.

MUNDO, S. R. Caracteres morfoanatômicos de folha e caule de espécies brasileiras de uso medicinal: *Calophyllum brasiliense* cambes (Clusiaceae), *Cupania vernalis* cambes (Sapindaceae) e *Lafoensia pacari* (Lythraceae). 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON J. D. Tr Mirtes Frange de Oliveira Punheiro. **Plantas Medicinais: guia para profissional de saúde**. São Paulo: Editorial Premier, 2010.

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

OMS. **Práticas integrativas e complementares: Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. OMS, p. 67, 2006.

OMEREGBE, R. E. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella pratyphi* and *Shigella sonnei*. **African Journal of Medical Science**, v. 25, 1996.

OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, B. S. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.3,2010.

PITCHAKARN, P. et al. *Momordica charantia* leaf extract suppresses rat prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. **Japanese Cancer Association**, v. 101, p. 2234-2240, 2010.

PITHON, M. M.; et al. Citotoxicidade *in vitro* de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. **Revista de Saúde Comunitária**, v. 4, n. 1, p. 19-26, 2008.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6076– 6082. 2009.

PONZI, E. A. C. et al. 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*). 2010. 105 f. Tese (Pós graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PONZI, et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. **Revista de cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial**, v. 10, n.1, p. 89-94, 2010.

RAKHOLIYA, K.; et al. Comparative Study of Hydroalcoholic Extracts of *Momordica charantia*L. against Foodborne Pathogens. **Indian Journal of Pharmacy**, v. 76, n. 2, p. 148–156, 2014.

RAZA, H. et al. Effect of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.)Fruit Juice on the Hepatic Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases and GLUTATHIONE S. Transferases in Streptozotocin – Induced Diabetic Rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 1, 1996.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALI, E. A. G. **Química dos Alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2007.

RIGOTTI, M. **Melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) uma planta com potencial para a economia agrária e saúde alternativa**. 2005. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/melaosaocaetano_rigotti.pdf>

RITTER, M. R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.51-62, 2002.

ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTER, D. S. Cucurbits. **New York: Cab International**, p. 226, 1997.

ROCHA, L. M. **Controle de qualidade de produtos fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Quebecor-Impreandes, 2000.

ROCHA, M. T. A. Efeitos de *Momordica charantia* L. em ratos diabéticos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2010.

SAEED, S. P. & TARIQ. Antibacterial activities of *Mentha piperita*, *Pisum sativum* and *Momordica charantia*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n 4, p. 997-1001, 2005.

SENER, B.; TEMIZER, H. Biologically compounds of *Momordica charantia* L. **FABAD. Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 516-521, 1998.

SHIH, C. C.; et al. Effects of *Momordica charantia* on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet. **Diabetes research and clinical practice**, v. 34, n. 43, 2008.

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, 2000.

SIRIKHWAN, T. Comparação de atividades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de frutas maduras e maduras de *Momordica Cochinchinesis* Spreng (Gac Fruit) . **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 28, 75 – 82, 2014 .

SOUZA, M. A ; DIEHL, C. A.; DOMINGOS, L. E. C. O uso da estatística descritiva na pesquisa em custos: análise do xiv congresso brasileiro de custos. **Con Texto**, v. 7, n. 12, 2007.

SOUZA, 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.

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, 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**, p.221- 246, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK.P.R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SHAHIDI, F. & NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Technomic**, p. 235-276, 1995.

SOARES, A. H. R; MOREIRA, M. C. N; MONTEIRO, L. M. C. Jovens portadores de deficiência: sexualidade e estigma. **Ciência Saúde Coletiva**, v.13, n.7, p.185-194, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **International e Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

VINNING, G. **Market Compendium of Asian Vegetables**. RIRDC Research Paper No. 95/12. Canberra, Rural Industries Research and Development Corporation, p. 386, 2000.

YESILADA, E. *et al.* Composition of *Momordica charantia* L. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1999.

YUWAI, K. E.; RAO, K. S., KALUWIN, C.; JONES, G. P.; RIWETT; D. E. Chemical Composition of *Momordica charantia* L. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p. 1762-1763, 1991.

ZHANG, X. M., ZHOU, L., LI, Z. R., & KUGUACINS, F. S. Cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, 70, 133–140, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – Dados estatísticos relacionados aos compostos fenólicos de extratos obtidos com etanol.

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	6				
F	270,3				
R squared	0,9912				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2,078	5	0,4156		
Residual (within columns)	0,01845	12	0,001537		
Total	2,096	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
U vs M	-0,1893	8,364	Yes	***	-0.2969 to -0.08178
U vs T	-0,2173	9,601	Yes	***	-0.3249 to -0.1098
U vs U+M	-1,073	47,38	Yes	***	-1.180 to -0.9651
U vs U+T	-0,2853	12,60	Yes	***	-0.3929 to -0.1778
U vs T+M	-0,3317	14,65	Yes	***	-0.4392 to -0.2241
M vs T	-0,02800	1,237	No	ns	-0.1356 to 0.07955
M vs U+M	-0,8833	39,02	Yes	***	-0.9909 to -0.7758
M vs U+T	-0,09600	4,241	No	ns	-0.2036 to 0.01155
M vs T+M	-0,1423	6,287	Yes	**	-0.2499 to -0.03478
T vs U+M	-0,8553	37,78	Yes	***	-0.9629 to -0.7478
T vs U+T	-0,06800	3,004	No	ns	-0.1756 to 0.03955
T vs T+M	-0,1143	5,051	Yes	*	-0.2219 to -0.006782
U+M vs U+T	0,7873	34,78	Yes	***	0.6798 to 0.8949
U+M vs T+M	0,7410	32,73	Yes	***	0.6334 to 0.8486
U+T vs T+M	-0,04633	2,047	No	ns	-0.1539 to 0.06122

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 2 – Dados estatísticos relacionados aos compostos fenólicos de extratos obtidos com hexano.

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	6				
F	1655				
R squared	0,9986				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	6,630	5	1,326		
Residual (within columns)	0,009614	12	0,0008012		
Total	6,639	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
U vs M	-1,237	75,70	Yes	***	-1.315 to -1.159
U vs T	-1,218	74,55	Yes	***	-1.296 to -1.141
U vs U+M	-0,03433	2,101	No	ns	-0.1120 to 0.04331
U vs U+T	0,0000	0,0000	No	ns	-0.07764 to 0.07764
U vs T+M	0,2237	13,69	Yes	***	0.1460 to 0.3013
M vs T	0,01867	1,142	No	ns	-0.05897 to 0.09631
M vs U+M	1,203	73,59	Yes	***	1.125 to 1.280
M vs U+T	1,237	75,70	Yes	***	1.159 to 1.315
M vs T+M	1,461	89,38	Yes	***	1.383 to 1.538
T vs U+M	1,184	72,45	Yes	***	1.106 to 1.262
T vs U+T	1,218	74,55	Yes	***	1.141 to 1.296
T vs T+M	1,442	88,24	Yes	***	1.364 to 1.520
U+M vs U+T	0,03433	2,101	No	ns	-0.04331 to 0.1120
U+M vs T+M	0,2580	15,79	Yes	***	0.1804 to 0.3356
U+T vs T+M	0,2237	13,69	Yes	***	0.1460 to 0.3013

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 3 – Dados estatísticos relacionados aos compostos fenólicos de extratos obtidos com diclorometano.

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	6				
F	199,9				
R squared	0,9881				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2,654	5	0,5308		
Residual (within columns)	0,03186	12	0,002655		
Total	2,686	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
U vs M	0,3007	10,11	Yes	***	0.1593 to 0.4420
U vs T	-0,8340	28,03	Yes	***	-0.9753 to -0.6927
U vs U+M	0,2030	6,824	Yes	**	0.06166 to 0.3443
U vs U+T	0,1613	5,423	Yes	*	0.01999 to 0.3027
U vs T+M	-0,2450	8,235	Yes	***	-0.3863 to -0.1037
M vs T	-1,135	38,14	Yes	***	-1.276 to -0.9933
M vs U+M	-0,09767	3,283	No	ns	-0.2390 to 0.04367
M vs U+T	-0,1393	4,684	No	ns	-0.2807 to 0.002007
M vs T+M	-0,5457	18,34	Yes	***	-0.6870 to -0.4043
T vs U+M	1,037	34,86	Yes	***	0.8957 to 1.178
T vs U+T	0,9953	33,46	Yes	***	0.8540 to 1.137
T vs T+M	0,5890	19,80	Yes	***	0.4477 to 0.7303
U+M vs U+T	-0,04167	1,401	No	ns	-0.1830 to 0.09967
U+M vs T+M	-0,4480	15,06	Yes	***	-0.5893 to -0.3067
U+T vs T+M	-0,4063	13,66	Yes	***	-0.5477 to -0.2650

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 4 – Dados estatísticos relacionados aos compostos fenólicos de extratos obtidos com acetato de etila.

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	6				
F	507,8				
R squared	0,9953				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	9,431	5	1,886		
Residual (within columns)	0,04457	12	0,003714		
Total	9,476	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
U vs M	-0,2573	7,313	Yes	**	-0.4245 to -0.09016
U vs T	-1,240	35,25	Yes	***	-1.408 to -1.073
U vs U+M	-0,6790	19,30	Yes	***	-0.8462 to -0.5118
U vs U+T	-1,743	49,53	Yes	***	-1.910 to -1.575
U vs T+M	0,3720	10,57	Yes	***	0.2048 to 0.5392
M vs T	-0,9830	27,94	Yes	***	-1.150 to -0.8158
M vs U+M	-0,4217	11,98	Yes	***	-0.5888 to -0.2545
M vs U+T	-1,485	42,21	Yes	***	-1.653 to -1.318
M vs T+M	0,6293	17,89	Yes	***	0.4622 to 0.7965
T vs U+M	0,5613	15,95	Yes	***	0.3942 to 0.7285
T vs U+T	-0,5023	14,28	Yes	***	-0.6695 to -0.3352
T vs T+M	1,612	45,82	Yes	***	1.445 to 1.780
U+M vs U+T	-1,064	30,23	Yes	***	-1.231 to -0.8965
U+M vs T+M	1,051	29,87	Yes	***	0.8838 to 1.218
U+T vs T+M	2,115	60,10	Yes	***	1.947 to 2.282

Fonte: Prisma 5.0

ANEXO 5 – Dados estatísticos relacionados aos compostos fenólicos de extratos obtidos com etanol + água (70:30).

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	6				
F	68,34				
R squared	0,9661				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2,766	5	0,5532		
Residual (within columns)	0,09714	12	0,008095		
Total	2,863	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
U vs M	-1,098	21,13	Yes	***	-1.344 to -0.8509
U vs T	-0,04633	0,8920	No	ns	-0.2931 to 0.2005
U vs U+M	-0,1333	2,567	No	ns	-0.3801 to 0.1135
U vs U+T	-0,1920	3,696	No	ns	-0.4388 to -0.05479
U vs T+M	-0,6263	12,06	Yes	***	-0.8731 to -0.3795
M vs T	1,051	20,24	Yes	***	0.8045 to 1.298
M vs U+M	0,9643	18,56	Yes	***	0.7175 to 1.211
M vs U+T	0,9057	17,44	Yes	***	0.6589 to 1.152
M vs T+M	0,4713	9,074	Yes	***	0.2245 to 0.7181
T vs U+M	-0,08700	1,675	No	ns	-0.3338 to 0.1598
T vs U+T	-0,1457	2,804	No	ns	-0.3925 to 0.1011
T vs T+M	-0,5800	11,17	Yes	***	-0.8268 to -0.3332
U+M vs U+T	-0,05867	1,129	No	ns	-0.3055 to 0.1881
U+M vs T+M	-0,4930	9,491	Yes	***	-0.7398 to -0.2462
U+T vs T+M	-0,4343	8,361	Yes	***	-0.6811 to -0.1875

Fonte: Prisma 5.0