



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

WILLIAM ANTONIO SAGASTEGUI GUARNIZ

**MELÃO-DE-SÃO-CAETANO DO NORDESTE DO BRASIL (*Momordica charantia*
L.): ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E MICROBIOLÓGICO INTEGRADO AO
ESTUDO QUÍMICO**

FORTALEZA

2020

WILLIAM ANTONIO SAGASTEGUI GUARNIZ

**MELÃO-DE-SÃO-CAETANO DO NORDESTE DO BRASIL (*Momordica charantia*
L.): ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E MICROBIOLÓGICO INTEGRADO AO
ESTUDO QUÍMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mírian Parente Monteiro

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S1m SAGASTEGUI GUARNIZ, William Antonio.
MELÃO-DE-SÃO-CAETANO DO NORDESTE DO BRASIL (*Momordica charantia* L.) : ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E MICROBIOLÓGICO INTEGRADO AO ESTUDO QUÍMICO / William Antonio SAGASTEGUI GUARNIZ. – 2020.
107 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UFPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira.

Coorientação: Profa. Dra. Mírian Parente Monteiro.

1. *Momordica charantia*. 2. Melão-de-São-Caetano. 3. *Momordicina* II. 4. Antimicrobiano. 5. Antifúngico. I. Título

CDD 615.1

WILLIAM ANTONIO SAGASTEGUI GUARNIZ

MELÃO-DE-SÃO-CAETANO DO NORDESTE DO BRASIL (*Momordica charantia* L.): ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E MICROBIOLÓGICO INTEGRADA AO ESTUDO QUÍMICO

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do GRAU DE DOUTOR em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Aprovada em 05/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira (Presidente)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Nirla Rodrigues Romero
(Externo ao Programa)

Prof. Dra. Lídia Audrey Rocha Valadas Marques – UBA
(Externo à instituição)

Prof. Dra. Regina Cláudia Matos Dourado – UNIFOR
(Externo à instituição)

Prof. Dra. Wellyda Rocha Aguiar Galvão - UNIFOR
(Externo à instituição)

Com muito amor para minha esposa Mary e meus filhos Andy, Gimena e Bruno, que eu adoro e admiro por suas realizações, por entender minha ausência durante esses anos; por serem uma fonte de motivação e fortaleza nos momentos de alegria e tristeza no decorrer dessa jornada de realização profissional.

À memória de minha mãe Margarita, um exemplo inesgotável de bondade, amor e humildade; e meu querido pai Octavio, por seu exemplo de força, perseverança e honestidade.

Aos meus queridos irmãos, por seus exemplos e apoio moral nos tempos difíceis, aos quais temos muitas vezes que enfrentar e superar.

AGRADECIMENTOS

Expresso eterna gratidão às minhas orientadoras Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira e Dra. Mírian Parente Monteiro, por me acolher e me dar todo o seu apoio e valiosas contribuições para a realização e publicação deste trabalho.

Minha gratidão a Profa. Nadia Accioly Pinto Nogueira, a Valeria Dodou e a Gleilton Weyne, do Laboratório de Microbiologia da UFC; aos Drs. Kirley Canuto, Paulo Riceli, Sheila de Queiroz Souza e Débora Pompeu, do Laboratório do EMBRAPA, por suas valiosas contribuições e por tornar possível o presente trabalho.

À minha colega e amiga Karla Magalhães, que também me ajudou a superar muitos obstáculos no decorrer deste curso, e a todos os meus colegas e amigos do doutorado.

Às professoras Marta Fonteles e Romelia Pinheiro em nome de todos os professores do programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Aos meus amigos do Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, Kellen, Amélia, Talita, Patrícia, Magda, Igor, Sales e Dino muito obrigado pela amizade e contribuições; assim como Eliane e Aleksandra do Núcleo de Fitoterápicos/ SESA.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) pela concessão da bolsa de estudos, ao Grupo de Universidades Brasileiras de Coimbra (GCUB), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela assistência financeira, e aos Pesquisadores do Laboratório Multiusuários de Produtos Naturais da EMBRAPA, minha gratidão.

Meu eterno agradecimento a minha Alma Mater, Universidade Nacional de Trujillo-Peru e suas autoridades por me concederem as facilidades para a realização deste estudo.

RESUMO

Momordica charantia L., Curcubitaceae, é uma planta usada como alimento e na medicina tradicional. A planta está incluída na lista oficial de plantas medicinais brasileiras de interesse para o Sistema Único de Saúde. O objetivo do presente trabalho é realizar a avaliação farmacognóstica de *Momordica charantia* das variedades macrocarpa e microcarpa, e estudos microbiológicos e modulador na ação de antimicrobianos, com extratos e frações de *M. charantia* variedade microcarpa “melão-de-são-caetano” do Nordeste do Brasil, incluindo a caracterização química dos extratos ativos por UPLC-QToF-ESI-MS. Para avaliação farmacognóstica, foram utilizadas folhas frescas de *M. charantia* L., das variedades microcarpa e macrocarpa. A atividade antimicrobiana foi avaliada com os extratos hidroalcoólico (FE) e acetona (FA) de folhas, frutos (FrE; FrA) e sementes (SE; SA) de *M. charantia* microcarpa do nordeste do Brasil, utilizando a técnica de microdiluição, nas linhagens bacterianas e fúngicas clínicas selecionadas. Os extratos com atividade antimicrobiana significativa foram submetidos à avaliação de perfil fitoquímico usando UPLC-QToF-ESI-MS. Além, o extrato mais ativo foi particionado com solventes de crescente polaridade, e avaliado novamente o efeito antimicrobiano e sinérgico, associados com antibióticos convencionais pela técnica de *Checkerboard*, frente ao microorganismos que apresentaram maior sensibilidade. Os resultados macromorfológico e micromorfológico, respectivamente, demonstraram que as folhas da variedade macrocarpa são maiores e os tricomas menos frequentes. A abordagem fitoquímica das duas variedades têm em comum alcalóides, esteróides, triterpenóides, flavonóides, saponinas, compostos fenólicos, taninos condensados e flavonóides. Foi isolada e identificada a Momordicina II (C₃₆H₅₈O₉), na variedade microcarpa, por RMN¹H e RMN¹³C e 2D, estrutura semelhante a encontrada na variedade de origem asiática. Os extratos das folhas apresentaram potente efeito antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis* e fraca atividade antifúngica contra *Candida albicans*. Duas frações do extrato acetônico apresentaram efeito sinérgico importante, frente a todos os antimicrobianos testados com exceção da vancomicina. Quatorze compostos foram identificados no extrato hidroalcoólico, enquanto 12 foram encontrados no extrato acetônico, entre eles o kaempferol, quercertina e sete triterpenóides do tipo cucurbitano. Demonstrou-se a potencial atividade antibacteriana, particularmente contra microrganismos de importância clínica e cepas resistentes, além de ter uma atividade sinérgica quando é associado a antibióticos, contra bactérias multirresistentes como as cepas de ORSA e em associações com antifúngicos contra *C. albicans*, reduzindo seu MIC até dezesseis vezes, o que é importante na inibição do desenvolvimento de resistência bacteriana e na diminuição dos efeitos adversos destes antimicrobianos, principalmente dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. O perfil fitoquímico por UPLC-MS mostrou importantes metabólitos farmacologicamente ativos, na variedade brasileira, e é relatado aqui pela primeira vez. São necessários outros estudos biológicos e farmacológicos para apoiar os usos medicinais desta planta importante. A variedade brasileira de *M. Charantia* pode ser um potencial agente terapêutico no tratamento de infecções clinicamente importantes.

Palavras-chave: *Momordica charantia*. Microcarpa. Melão-de-São-Caetano. Momordicina II. Antimicrobiano. Sinergismo. Produtos Naturais. Antibacteriano. Antifúngico.

ABSTRACT

Momordica charantia L., Cucurbitaceae, is a plant used as food and in traditional medicine. The plant is included in the official list of Brazilian medicinal plants of interest to the Unified Health System. The objective of the present work is to carry out the pharmacognostic evaluation of *Momordica charantia* of the macrocarp and microcarp varieties, and microbiological studies and modulator in the action of antimicrobials, with extracts and fractions of *M. charantia* microcarpa variety “melão-de-são-caetano” from Northeastern Brazil, including the chemical characterization of the active extracts by UPLC-QToF-ESI-MS. For pharmacognostic evaluation, fresh leaves of *M. charantia* L., of the microcarpa and macrocarpa varieties were used. Antimicrobial activity was evaluated with hydroalcoholic (EF) and acetone (FA) extracts from leaves, fruits (FrE; FrA) and seeds (SE; SA) of *M. charantia* microcarpa from northeastern Brazil, using the microdilution technique, in selected clinical bacterial and fungal strains. The extracts with significant antimicrobial activity were submitted to phytochemical profile evaluation using UPLC-QToF-ESI-MS. In addition, the most active extract was partitioned with solvents of increasing polarity, and the antimicrobial and synergistic effect, associated with conventional antibiotics by the Checkerboard technique, was evaluated again, against the microorganisms that showed greater sensitivity. The macromorphological and micromorphological results, respectively, demonstrated that the leaves of the macrocarpa variety are larger and the trichomes less frequent. The phytochemical approach of the two varieties has in common alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, phenolic compounds, condensed tannins and flavonoids. Momordicin II (C₃₆H₅₈O₉) was isolated and identified, in the microcarpa variety, by NMR¹H and NMR¹³C and 2D, a structure similar to that found in the variety of Asian origin. Leaf extracts showed a potent antibacterial effect against strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and weak antifungal activity against *Candida albicans*. Two fractions of the acetone extract showed an important synergistic effect, compared to all the antimicrobials tested except for vancomycin. Fourteen compounds were identified in the hydroalcoholic extract, while 12 were found in the acetone extract, among them kaempferol, quercetin and 7 cucurbitan type triterpenoids. Potential antibacterial activity has been demonstrated, particularly against microorganisms of clinical importance and resistant strains, in addition to having a synergistic activity when associated with antibiotics, against multi-resistant bacteria such as ORSA strains and in associations with antifungals against *C. albicans*, reducing their MIC up to sixteen times, which is important in inhibiting the development of bacterial resistance and in decreasing the adverse effects of these antimicrobials, especially aminoglycosides and fluoroquinolones. The phytochemical profile by UPLC-MS, showed important pharmacologically active metabolites, in the Brazilian variety, and is reported here for the first time. Further biological and pharmacological studies are needed to support the medicinal uses of this important plant. The Brazilian variety of *M. Charantia* can be a potential therapeutic agent in the treatment of clinically important infections.

Keywords: *Momordica charantia*. Microcarpa. São Caetano Melon. Momordicina II. Antimicrobial. Synergism. Natural Products. Antibacterial. Antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Momordica charantia</i> L. variedades microcarpa (1-frutos curtos) e variedade macrocarpa (2-frutos longos)	14
Figura 2 - Microextração dos extratos das folhas, sementes e frutos para ensaio antimicrobiano	19
Figura 3 - Obtenção dos extratos e frações de <i>M. charantia</i> úteis	22
Figura 4 - Fluxograma da determinação da CIM	34
Figura 5 - Fluxograma da avaliação de atividade moduladora: ensaio do <i>checkerboard</i>	35
Figura 6 - Esquema de microextração do extrato para análise exploratória em UPLC por partição Líquido-Líquido, utilizando ultrassom	37
Figura 7 - Xeroexsicata das folhas adultas de <i>Momordica charantia</i> L. variedades microcarpa (1) - 8 cm e macrocarpa (2) - 12 cm.	39
Figura 8 - RMN ¹ H, de composto MSC em piridina deuterada, momordicina II, presentes nas folhas de <i>Momordica charantia</i> L. variedades microcarpa (MCMi)	41
Figura 9 - Espectro RMN ¹³ C, de composto MSC em piridina deuterada, momordicina II, em folhas de <i>Momordica charantia</i> L. variedades microcarpa (MCMi)	43
Figura 10 - Cromatogramas dos extratos UPLC-ESI-QT de MS, FA (A) e FE (B), de <i>M. charantia</i> obtidos no modo de ionização positiva, de folhas de <i>M. charantia</i>	46
Figura 11 - Fragmentação dos isômeros Quercetin- <i>O</i> -hexoside	46
Figura 12 - Fragmentação dos isômero Kaempferol- <i>O</i> -hexoside	49
Figura 13 - Fragmentação dos isômeros 3 β -hydroxycucurbita	58
Figura 14 - Fragmentação do 5 β , 19-epoxycucurbita-6, 22 (E), 24-triene-3 β , 19-diol	61
Figura 15 - Fragmentação do ácido 3 -[(5-formil-7 β , 25-di-hidroximetoxicucurbita-5, 23-dien-3-il) oxi]-3-oxopropanóico	62
Figura 16 - Fragmentação dos isômero Kaempferol- <i>O</i> -hexoside.....	63
Figura 17 - Fragmentação do 3 β -hydroxycucurbita-5 (10),6,22(E),24-tetraen-19-al.	64
Figura 18 - Fragmentação do 5 β , 19-epoxycucurbita-6, 22 (E), 24-triene-3 β , 19-diol	64
Figura 19 - Fragmentação do ácido 3 -[(5-formil-7 β , 25-di-hidroximetoxicucurbita-5, 23-dien-3-il) oxi]-3-oxopropanóico.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prospecção dos constituintes químicos presentes nas folhas e talos de <i>Momordica charantia</i> L. variedades macrocarpa (MCMa) e microcarpa (MCMi)	44
Tabela 2 - Dados espectrais de RMN ¹ H e RMN ¹³ C de MSC	47
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM), em mg/mL, das microextrações EtOH/H ₂ O (FE) e acetônico (FA) das Folhas de “Melão-de-são-caetano”	50
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CLM) em mg/mL dos extratos das folhas de <i>M. charantia</i>	51
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CLM) em mg/mL das partições do extrato acetona (B) de folhas de <i>M. charantia</i>	52
Tabela 6 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	53
Tabela 7 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> CCBH 5330	53
Tabela 8 - Efeito modulador da fração FB3 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	54
Tabela 9 - Efeito modulador da fração FB3 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> CCBH 5330	54
Tabela 10 - Efeito modulador da fração FB1 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	55
Tabela 11 - Efeito modulador da fração FB1 na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> CCBH 5330	55
Tabela 12 - Efeito modulador do extrato B na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	56
Tabela 13 - Efeito modulador do extrato B na ação de antimicrobianos sobre <i>S. aureus</i> CCBH 5330 (ORSA)	56
Tabela 14 - Efeito modulador do extrato B na ação de antifúngicos sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231	57
Tabela 15 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antifúngicos sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231	57
Tabela 16 - Identificação dos constituintes químicos dos extratos hidroetanólico (FE) e acetona (FA) das folhas de <i>Momordica charantia</i> por UPLC-QToF-ESI-MS.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	agar Müller-Hinton
[ATB]	CIM dos antibióticos na associação ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
[ATF]	CIM dos antifúngicos na associação ($\mu\text{g/mL}$)
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	concentração bactericida mínima
CIF	concentração inibitória fracionada
CFM	concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM FB2	CIM da fração B2 isolada (mg/mL)
CIM ATB	CIM dos antibióticos isolados ($\mu\text{g/mL}$)
CIF ATB	concentração inibitória fracionada dos antibióticos ($\mu\text{g/mL}$)
CIM ATF	CIM dos antifúngicos isolados ($\mu\text{g/mL}$)
CIF ATF	concentração inibitória fracionada dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$)
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
ESBL	bactérias produtores de beta-lactamase de amplo espectro
ESI	Eletrospray Ionization (Ionização por Eletrospray)
FB1	partição líquido-líquido com hexano
FB2	partição líquido-líquido com diclorometano
FB3	partição líquido-líquido com Clorofórmio
FB4	partição líquido-líquido aquosa
[FB2]	CIM da fração B2 na associação (mg/mL)
HRESIMS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
ICIF	índice de concentração inibitória fracionada
IC ₅₀	meia concentração inibitória máxima
IL-1R	interleucina-1
MRSA	<i>S. aureus CCBH5330</i> resistente a Oxacilina
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
<i>m/z</i> ,	razão massa por carga

NF-kB	fator nuclear kappaB
RAM	Resistencia antimicrobiana
REPLAME-CE	Relação de Plantas Medicinais do Ceará
PBS	tampão fosfato de sódio
pc	peso corporal
PTFE	Filtros de membrana de PTFE (politetrafluoretileno)
Ppm	partes por milhão
Q-TOF	Quadrupole – Time of Flight (Quadrupolo Tempo de Vôo)
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
TNF α	fator de necrose tumoral α
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UHPLC-MS/MS	cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série do inglês <i>ultra high performance liquid chromatograph tandem mass Spectrometry</i>
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Performance)
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
>	Maior que
<	Menor que
°C	Graus Celsius
%	Porcento
\geq	Maior ou igual
\leq	Menor ou igual
*	Asterisco
=	Igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objeto Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: PRINCIPAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E CONSTITUENTES QUÍMICOS DE <i>MOMORDICA CHARANTIA L.</i>	19
3.1 Atividade Antidiabética	20
3.2 Ação anticancerígena	21
3.3 Atividade anti-VIH.....	23
3.4 Atividades antioxidantes e hipolipemiante	23
3.5 Atividade hepatoprotetora	24
3.6 Atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética	25
3.7 Atividade antiparasitária: Antiplasmodium e antileishmaniosis	25
3.8 Efeito neuroprotetor	26
3.9 Atividade antiespermatogênica, androgênica e estrogênica	26
3.10 Atividade imunoestimulante	27
3.11 Atividade anticoagulante	27
3.12 Atividade cicatrizante e antiulcerativa	28
3.13 Atividade antibacteriana.....	28
4 METODOLOGIA	31
4.1 Materiais Botânicos.....	31
ETAPA I - Parâmetros Farmacognósticos Comparativos entre as Folhas de <i>Momordica charantia L.</i> Variedades Macrocarpa e Microcarpa e Isolamento da Momordicina II ..	31
4.2 Análises Macro e Micromorfológicas	31
4.3 Abordagem fitoquímica preliminar.....	32
4.4 Isolamento de composto MSC em <i>Momordica charantia L.</i> , variedade microcarpa ..	32
4.5 Identificação estrutural de Momordicina II (MSC).....	32
ETAPA II - Preparação de Extratos e Frações para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Sinérgica	33
4.6 Procedimento 1. Obtenção dos extratos das folhas, sementes e frutos por microextração líquido-líquido, para avaliação da atividade antimicrobiana	33
4.7 Procedimento 2. Obtenção dos extratos vegetais de folhas por maceração, para ensaios microbiológicos.....	34
4.8 Preparação dos extratos e frações para avaliação antibacteriana.....	35

4.9 Cepas Microbianas e Fúngica	36
4.10 Preparo e padronização do inóculo bacteriano	36
4.11 Ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.12 Determinação da concentração letal mínima (CLM).....	38
4.13 Ensaio de sinergismo ou modulador na ação de antimicrobianos (Método de Checkerboard)	38
ETAPA III - Análise Exploratória em UPLC por Partição Líquido-Líquido dos Extratos Ativos (microextrações)	40
4.14 Preparação dos extratos ativos para análise exploratória em UPLC por partição Líquido-Líquido, utilizando ultrassom	40
4.15 Análise Cromatográfica	41
4.16 Interpretação dos espectros e identificação dos constituintes dos extratos ativos ...	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Parâmetros macro e micromorfológicos.....	43
5.2 Abordagem Fitoquímica comparativa.....	44
5.3 Identificação estrutural de MSC (momordicina II).....	45
5.4 Rendimento dos extratos.....	49
5.4.1 Rendimentos dos extratos de folhas, frutos e sementes obtidos por microextração	49
5.4.2 Rendimentos dos extratos obtidos por maceração das folhas e frações do extrato B..	49
5.5 Atividade antimicrobiana e antifúngica (Método de microdiluição).....	50
5.5.1 Ensaio microbiológicos dos extratos de folhas, frutos e sementes	50
5.5.2 Ensaio microbiológico dos extratos das folhas obtidas por maceração e frações do extrato B.....	50
5.6 Ensaio do sinergismo ou efeito modulador na ação antimicrobiana (Checkerboard)	52
5.7 Identificação dos constituintes químicos dos extratos hidroalcoólico e acetônico (FE e FA) ativos	58
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO.....	73
8 REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE	86

1 INTRODUÇÃO

Momordica charantia L. da família Cucurbitaceae é uma planta escandente encontrada com larga frequência cobrindo cercas e arbustos ao longo dos caminhos de norte a sul do Brasil, especialmente após a estação chuvosa. A planta é facilmente reconhecida por suas folhas multipartidas, pequenas flores amarelas isoladas e pelos frutos fusiformes de 4 a 5 que, quando maduros, se abrem expondo as sementes revestidas de um arilo vermelho luzidio. É uma espécie originária da África que foi introduzida na América do Sul, no período colonial através do tráfico de escravos negros trazidos daquele continente (CARNEY, 2001; DUKE *et al.*, 2002).

No estado do Ceará, nordeste do Brasil, um dos registros mais antigos de *Momordica charantia* L. encontra-se na “Coleção Descritiva das Plantas da Capitania do Ceará do Naturalista Feijó” (João da Silva Feijó) em 1818. Este naturalista escreveu a referida coleção de acordo com os critérios da época, observados por cientistas acadêmicos, cuja preocupação maior consistia em tudo ordenar segundo os sistemas de classificação estabelecidos, principalmente por Linneu. Ainda, no tempo em que o Brasil era colônia portuguesa, esta coleção serviu de base para os trabalhos da Flora Nordestina do Naturalista Freire Allemão, o qual registrou também a referida espécie (NOBRE, 1984).

Podemos observar importantes descrições etnobotânicas de *M. charantia*, melão-de-são-caetano em trabalhos como Botânica Médica Cearense do Professor Dias da Rocha de 1919 (Rocha, 2008), que incentivou o Professor Renato Braga pela *scientia amabilis*, o qual publicou em 1960 Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará (Braga, 1960). O Professor Francisco José de Abreu Matos foi um dos que mais contribui para o conhecimento etnobotânico da nossa flora destacando as publicações Plantas da Medicina Popular do Nordeste (Matos, 1999), e seus trabalhos foram registrados numa importante Etnofarmacopéia de suas expedições no nordeste no período de 1980 à 1990, na qual encontram-se as seguintes indicações de uso popular para a planta (MAGALHÃES, *et al.*; 2019): cicatrizante, antisséptico, blenorragia (gonorreia), doenças de pele, colite, inflamação ginecológica, tumor externo, corrimento vaginal, feridas infectadas e ganhar peso. As partes da planta são utilizadas das seguintes formas: folha (sumo, *in natura*/cataplasma, decocção e maceração em água); fruto (*in natura*/ cataplasma); ramo (chá) e a planta toda (chá). Sua folhagem é muito

estimada na população rural devido à eficácia das preparações caseiras usadas contra ectoparasitas do homem e animais, sob a forma de banhos e compressas.

Desta espécie se conhecem doze variedades, duas das quais se destacam principalmente pelo tamanho dos frutos. A de frutos curtos, com 3–7 cm de comprimento, designada como variedade *microcarpa* cuja ocorrência é mais comum na América do Sul, conhecida popularmente como melão-de-são-caetano e a de frutos longos, com 14-15 cm de comprimento, designada como *macrocarpa* que ocorre mais comumente na Ásia onde é designada pelos nomes de Balsam pear, Bitter cucumber, Bitter gourd, Foo gwa, Karela, Lakwa, e utilizada como comestível e medicinal (WEEBACH; MURRAY, 1994; GROVER; YADAV, 2004), (Figura 1).

Figura 1- Fotos F.A. Matos: *Momordica charantia* L. variedades *microcarpa*

(1-frutos curtos) e variedade *macrocarpa* (2-frutos longos).



Fonte: Fotos F.A. Matos (2002)

O crescente número de pesquisas divulgadas ano a ano sobre a espécie demonstra o grande interesse despertado por seus estudos farmacológicos e químicos entre os pesquisadores, destacando-se estudos que avaliam efeitos antidiabéticos tipo 1 e 2 (OOI C *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2011; SEHAM; EL-GENGAIHI; SHABRAWYA, 2006; HSIEN-YI *et al.*, 2014), de glicósidos cucurbitano com propriedades de inibição de α -glucosidase (NGUYEN *et al.*, 2010), atividade antigluconeogenica (CHEN J-C *et al.*, 2015), ações anti-HIV (LEE-HUANG *et al.*, 1995), triterpenoides que modulam a progressão de câncer de

próstata (PITCHAKARN *et al.*, 2011), atenuação do estresse oxidativo (HYUN *et al.*, 2013), propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (ULLAH *et al.*, 2012), ações antiinflamatória e anticâncer (DANDAWATE *et al.*, 2016), antileishmania (GUPTA *et al.*, 2010), efeito neuroprotetivo na isquemia cerebral (ZAFAR *et al.*, 2011), além das ações antibacterianas (MAHOMOODALLY; GURIB-FAKIM; SUBRATTY, 2010; COUTINHO *et al.*, 2010; YEH-LIN *et al.*, 2011; SAENGSAN *et al.*, 2015; SVOBODOVA *et al.*, 2017), entre outros, sendo esta última atividade biológica o foco de nosso trabalho na planta de *M. charantia L.* coletada no Nordeste do Brasil.

Nesses trabalhos a origem da planta estudada não é informada, embora possa ser deduzida, com certo grau de segurança, pelos nomes dos autores, títulos dos periódicos e países onde foram realizadas as pesquisas; verificou-se assim que a grande maioria dos estudos foi desenvolvida com plantas coletadas na Ásia, isto é, com grande probabilidade de ser da variedade macrocarpa. Poucos são os trabalhos sobre os constituintes e as propriedades farmacológicas da variedade microcarpa da América do Sul. A variedade microcarpa está inserida no programa de assistência social farmacêutica “Farmácias Vivas” baseado no emprego científico de plantas medicinais e fitoterápicas, idealizado pelo professor Francisco José de Abreu Matos (MATOS, 2002).

A introdução da variedade macrocarpa asiática no Horto de Plantas Medicinais Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará deu-se pelo referido professor quando do recebimento de um exemplar do fruto de Altamira-Pará-Brasil, com a informação de que índios da região estavam usando os frutos como alimento, a partir de cultivo oriundo de sementes fornecidas por visitante japonês, o que serviu como estímulo para o estudo mais detalhado da variedade microcarpa, bem como determinar parâmetros farmacognósticos entre essas duas variedades, comparando-os com os dados registrados na literatura.

A medicina alternativa através da utilização de plantas medicinais é uma opção importante disponível para as populações de todo mundo para o tratamento de suas doenças. Em países em desenvolvimento 80% da população continua usando a medicina tradicional na solução de problemas básicos de saúde. Conseqüentemente, nos últimos anos, várias pesquisas enfocaram-se na avaliação científica de plantas medicinais, sendo a *Momordica charantia L.* uma das plantas frequentemente utilizadas e estudadas para avaliar sua utilidade em diversas doenças (GROVER; YADAV, 2004), entre elas sua atividade antibacteriana e

seu efeito na resistência antibacteriana aos antibióticos aminoglicosídeos (COUTINHO *et al.* 2010).

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema crítico de saúde hoje em dia. Durante várias décadas e em diferentes níveis, as bactérias responsáveis pelas infecções comuns desenvolveram resistência a cada novo antibiótico criado, e a RAM evoluiu, tornando-se uma ameaça à saúde mundial. O surgimento de cepas de microrganismo resistente a diversos antimicrobianos, nas últimas décadas, vem criando desafios na escolha da terapêutica; essa preocupação fez com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 27 de fevereiro de 2017, publicasse a lista de "patógenos prioritários" resistentes a antibióticos, entre os que considera *Staphylococcus aureus*, resistente a meticilina, *Pseudomonas aeruginosa*, resistente aos carbapenêmicos, *Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina, *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina, Enterobacteriaceae, resistentes aos carbapenêmicos, produtoras de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) entre outras (OMS, 2017). Com a escassez de novos antibióticos no mercado, a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2016), adotou um plano global de ação sobre resistência antimicrobiana, que estabelece dentre seus objetivos, fortalecer o conhecimento e a base científica por meio de vigilância e pesquisa em estudos básicos que apoiam o desenvolvimento de novos tratamentos, meios diagnósticos, vacinas e outras intervenções.

No Nordeste do Brasil a *Momordica charantia L*, variedade microcarpa, cresce silvestre em regiões quentes e úmidas. Popularmente é conhecida como "melão-de-São-Caetano", "melão amargo" ou "cabaço-amargo" (COSTA, *et al.*, 2011), sendo utilizados tanto os frutos, como as sementes e folhas para várias finalidades na medicina popular.

Destacando, estudos etnofarmacológicos demonstram que as folhas da espécie nordestina são administradas tipicamente em compressas, emplastos e lavagens para o tratamento de aftas, torções e diversas afecções da pele (abscessos, furúnculos, pediculosis, prurido e queimaduras) (FRANCA, *et al.*, 2010; MAGALHÃES, *et al.*, 2019), validando esses usos com estudos científicos por meio de atividades antimicrobianas comprovadas (JORGE; SAKUMA; INOMATA, 1992; LIMA, 2008). Motivo pelo qual foi selecionada para compor a Relação de Plantas Medicinais do Ceará (REPLAME-CE), Portaria SESA Nº 275 de 20/03/2012, ressaltando que no Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO) da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, prepara sabão líquido antisséptico a 5% a partir das folhas da variedade microcarpa.

O surgimento de cepas de microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos, nas últimas décadas, gera desafios na escolha da terapêutica adequada; essa preocupação fez com que a OMS, em 27 de fevereiro de 2017, publicasse a lista de "patógenos prioritários" resistentes a antibióticos, entre os que consideram *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, *Pseudomonas* e várias *enterobactérias*, como *Klebsiella*. Esta lista foi desenvolvida para tentar orientar e promover a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos, para combater o crescente problema global da resistência antimicrobiana (OMS, 2017).

Considerando que os extratos de *M. charantia* apresentaram atividade antimicrobiana, o presente trabalho visa abordar a problemática de resistência crescente aos antimicrobianos e a necessidade de desenvolver novas substâncias antimicrobianas eficazes e seguras para o tratamento de doenças infecciosas, sobretudo produzidas por bactérias multirresistentes a fármacos convencionais, além de avaliar a capacidade de modular sinergicamente a ação de fármacos antimicrobianos convencionais, e assim oferecer a base científica para apoiar o uso tradicional desta planta, e identificar moléculas úteis na terapêutica, que se tornou um dos principais objetivos deste trabalho, usando uma variedade nordestina de *M. charantia*. Assim, *M. charantia* poderá ser utilizado como uma fonte importante de produtos naturais para tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos convencionais.

Na literatura consultada não existem relatos de identificação de estruturas químicas obtidas desta espécie responsável pela atividade antibacteriana, bem como parâmetros farmacognósticos diferenciais entre as duas variedades: microcarpa (nordestina) e macrocarpa (asiática).

2 OBJETIVOS

2.1 Objeto Geral

Realizar estudos farmacognósticos e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações de melão-de-são-caetano do (*Momordica charantia* L.) do Nordeste do Brasil, com integração dos estudos químicos.

2.2 Objetivos Específicos

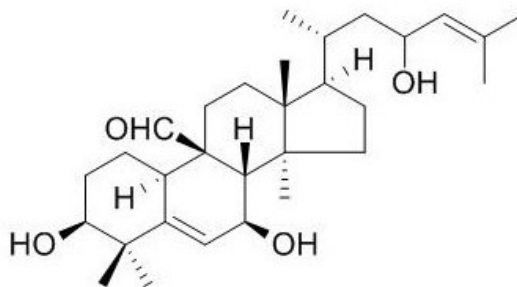
- Descrever os parâmetros farmacognósticos diferenciais entre as variedades macrocarpa e microcarpa de *Momordica charantia* L;
- Realizar a prospecção química preliminar das variedades macrocarpa e microcarpa de *Momordica charantia* L;
- Isolar e identificar o marcador químico das folhas da variedade microcarpa de *Momordica charantia* L;
- Avaliar a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição, com a determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações de *Momordica charantia* L., frente a microorganismo gram-positivos e gram-negativos, e a atividade antifúngica frente a *Candida albicans*;
- Avaliar a ocorrência de sinergismo na combinação entre extratos e frações das amostras vegetais com potencial atividade antimicrobiana frente a cinco classes de antimicrobianos utilizados comercialmente, pelo ensaio de *Chequerboard*;
- Realizar a análise exploratória em UPLC-QToF-ESI-MS por partição Líquido-Líquido dos constituintes dos extratos e frações antimicrobianas ativas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: PRINCIPAIS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *MOMORDICA CHARANTIA* L.

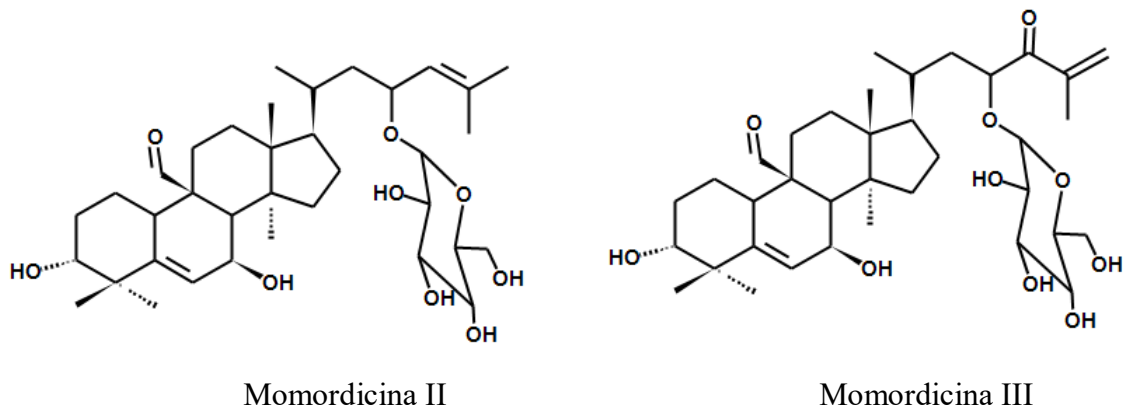
Os dados bibliográficos demonstrados a seguir pela origem dos artigos e os autores, na sua maioria, pode tratar-se da variedade macrocarpa, asiática, conforme justificativa introdutória, destacando-se poucos trabalhos realizados no Brasil, com a variedade microcarpa Nordestina. Estes estudos confirmam que *M. charantia* L. “melão amargo”, contém muitos constituintes biologicamente ativos, entre eles, triterpenos (PEREZ; JAYAPRAKASHA; BHIMANAGOUDA; 2015), alcaloides, saponinas, óleos fixos, proteínas e esteroides (RAMAN; LAU, 1996); os quais descreveram suas propriedades medicinais incluindo ações antimicrobiana, anticancerígenas, anti-mutagênicas, anti-inflamatória, antileucêmica, antitumoral, anti-HIV, antiúlceras, anti-infertilidade, antidiabéticas e antirreumática (GROVER; YADAV, 2004).

Entre os vários constituintes identificados nas folhas de *Momordica charantia* variedade asiática, podemos destacar como características da espécie *M. charantia*, os triterpenos tetracíclicos com esqueleto Cucurbitano, como as momordicinas I, II e III. As estruturas das momordicinas I e II foram elucidadas como 3 β ,7 β ,23-trihidroxi-cucurbita-5,24-dien-19-al e seu 23-O- β -glicopiranosídeo, respectivamente. A momordicina III foi isolada como acetato de 23-O- β -glicopiranosídeo de 3 β ,7 β ,23-trihidroxi-24-oxo-cucurbita-5,25-dien-19-al. A mistura desses três componentes recebe a denominação de cucurbitacinas (YASUDA *et al.* 1984; PITCHAKARN *et al.* 2012; ZHANG *et al.* 2012).

Figura 2 - Estruturas químicas das Momordicinas I, II e III



Momordicina I



Estes antecedentes fornecem a base científica para apoiar o uso tradicional desta planta nestas doenças, as mesmas que se relatam mais detalhadas na continuação:

3.1 Atividade Antidiabética

Muitos trabalhos indicam que alguns extratos e compostos obtidos de *M. charantia* diminuíam os níveis de glicose no sangue. Anila e Vijayalakshmi (2000), isolaram uma variedade de compostos potencialmente bioativos tais como momordicinas, vitamina C, carotenoides, flavonoides, polifenóis e triterpenoides de tipo cucurbitanos. Os flavonoides isolados exerceram potente ação hipolipemiante e hipoglicemiante, e foram eficazes em elevar os níveis de hemoglobina em ratos. O extrato aquoso e etanólico do fruto produziu uma redução da glicose no sangue de ratos com diabetes tipo 2 e com hiperinsulinemia, e também reduziu significativamente a insulina plasmática (MIURA *et al.*, 2004). Também produz uma diminuição significativa nos níveis séricos de ureia, creatinina, nos testes de função hepática, transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, e nos níveis de colesterol e de triglicérides (SEHAM; EL-GENGAIHI; SHABRAWYA, 2006).

Os componentes dos extratos aquosos de frutos e sementes aumentam a captação de glicose em concentrações sub-ótimas de insulina, em adipócitos 3T3-L1, que é acompanhado por um aumento da secreção de adiponectina (ROFFEY *et al.*, 2007). Também o extrato aquoso de fruto de *M. charantia L.* foi eficaz na melhoria de camundongos com hiperglicemia induzida com dieta, e diminuiu os níveis sanguíneos de hemoglobina glicada (HbA1c) e ácidos graxos livres (CHUN-CHING; CHENG-HSIU; WEI-LI, 2008), produzindo a diminuição do ácido siálico no soro (um fator de risco) em pacientes diabéticos tipo 2 em

comparação ao valor basal. Os efeitos benéficos sobre a glicose no plasma em jejum e hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) também foram melhorados (INAYAT *et al.*, 2011). Nguyen *et al.* (2010), isolaram 14 glicosídeos de triterpeno do tipo cucurbitano a partir de um extrato metanólico dos frutos de *M. charantia*; dois deles apresentaram atividade inibitória moderada contra α -glicosidase.

Xiaoqing; Xiaohong; Jian, (2008), purificaram um peptídeo solúvel MC2-1-5, de extrato aquoso do fruto fresco de *M. charantia* L., que também apresentou efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por aloxano em 61,7% e 69,18% às 2 e 4 horas respectivamente, da administração oral de uma dose de 2 mg/kg.

O extrato etanólico de *M. charantia* é rico em saponina, triterpenoides cucurbitanos, 3 β ,7 β , 25-trihydroxycucurbita-5,23(E)-dien-19-al, momordicina I, momordicina II, 3-hydroxycucurbita-5,24-dien-19-al-7,23-di-O- β -glucopiranosíde e kuguaglycoside G, que demonstraram atividade antidiabética. Além disso, a fracção rica em saponinas e os compostos momordicina II e kuguaglycoside G nas concentrações de 10 e 25 μ g/ ml, estimularam secreção de insulina significativamente; foi observado também que o extrato aquoso de fruto de *M. charantia* rico em charantina causou redução significativa de glicose no sangue dos ratos com diabetes tipo 1 e tipo 2 em jejum, e intolerância a glicose; além (KELLER *et al.* 2011; HSIEN-YI *et al.*, 2014).

3.2 Ação anticancerígena

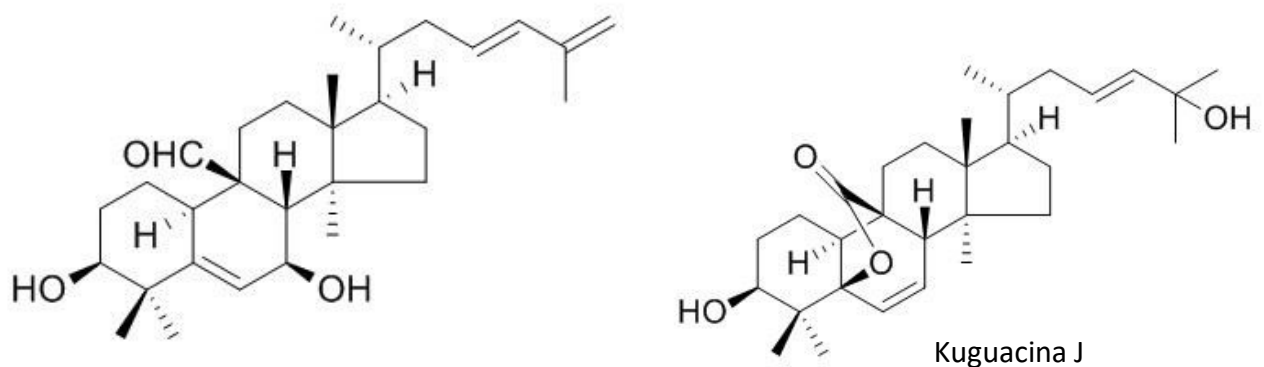
A proteína obtida do melão amargo, como MAP30, é um potencial agente anticancerígeno eficaz contra o câncer de fígado, porque pode inibir o crescimento celular em cultura de células Hep G2 com carcinoma hepatocelular em humanos e camundongos portadores de G2. A atividade antitumoral de MAP30 em células Hep G2 é atribuída a duas vias (a) ativação tanto de vias extrínsecas de caspase-8 e intrínsecas de a caspase-9, e (b) fosforilação de ambos e alguns membros MAPK (FEI *et al.*, 2012).

Os momordicosídeos A e B inibem o crescimento tumoral (WANG *et al.*, 2001). Pitchakarn *et al.* (2011) e Pitchakarn *et al.* (2012), demonstraram que o componente Kuguacina J((3S,7S,8S,9R,10R,13R,14S,17R)-3,7-dihidroxi-4,4,13,14-tetrametil-17-[(2R,4E)-6-etilhepta-4,6-dien-2-il]-2,3,7,8,10,11,12,15,16,17-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-9-arbaldeido), **Figura 2**, obtido das folhas, inibe crescimento de células cancerosas humanas da próstata

andrógeno-dependente por meio de parada em G1 e a indução de apoptose. O extrato e Kuguacina J também reduziu a expressão do receptor de andrógeno (AR), e do antígeno prostático específico (PSA). Além disso, Kuguacina J exerceu efeitos anti-invasivos em células PC3, ao inibir significativamente a migração e a invasão; e o extrato de folhas a 1% e 5% na dieta resultou na inibição do crescimento na carcinogênese da próstata, sem efeito adverso no corpo do hospedeiro.

Kuguacina J aumentou a sensibilidade aos anticancerígenos vimblastina e paclitaxel, devido à inibição a função de transporte de P-glicoproteína (P-gp), diminuindo o efluxo de vimblastina (PORNISIRI *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura Química da Kuguacina J e da karavilagenina D



Os compostos obtidos das folhas de *M. charantia* japonesa: karavilagenina D, (23E)-3 β , 25-dihidroxi-7 β -methoxicucurbita-5,23-dien-19-al, (23E)-3 β ,7 β -di-hidroxi-25-metoxicucurbita-5,23-dien-19-al e 25-O-metil-karavilagenina D, mostraram potentes efeitos inibidores sobre o vírus Epstein-Barr antigénico precoce (EBV-EA); e karavilagenina D, A Figura 2 apresentou também efeito inibitório sobre a promoção da tumor de pele em ratos (ZHANG *et al.*, 2012).

O extrato metanólico das folhas de *M charantia* exibiu atividade anticâncerígena em células de adenocarcinoma do pulmão humano CL1 com capacidade metastática, por indução de apoptose em várias células cancerosas humanas, por meio de caspase e dependente de vias das mitocôndrias (HSUE-YIN *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos também estão associados a muitas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes, antimutagénica, antitumoral, anti-inflamatória, e também efeitos anticancerígenos (THIRUVENGADAM *et al.*, 2014). A momordicine VIII, um triterpenoide tipo cucurbitano extraído com metanol dos caules e folhas, mostrou citotoxicidade fraca contra cinco linhas de células cancerosas humanas com valores de IC₅₀ de 14,3-20,5 mmol / L (GAO-TING *et al.* 2014).

3.3 Atividade anti-VIH

As proteínas como MAP30, α -momorcharina e β -momorcharina, podem tratar o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (BOURINBAIAR; LEE-HUANG, 1996).

3.4 Atividades antioxidantes e hipolipemiante

O suco de fruto de *M. charantia* também exibe atividades hipolipídicas e hipoglicêmicas em ratos com diabetes Tipo 1 induzida por estreptozotocina (STZ), porque diminui os teores no plasma de colesterol não-esterificados, triglicérides e fosfolipídeos, acompanhada por uma diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) -colesterol e um aumento moderado de peroxidação lipídica (LPO), malondialdeído (MDA), e aumento de cerca de duas vezes em LPO nos rins, (AHMED *et al.*, 2001).

Ratos alimentados com dietas contendo fração metanol (MF) de *M. charantia L.*, a 1%, em comparação com aqueles sem MF, diminuem a síntese de triglicérides hepáticos (TAG), reforçando simultaneamente a oxidação de ácidos graxos, reduzindo assim a concentração de TAG hepático (GAMARALLAGE *et al.*, 2012).

Os diferentes extratos aquosos das folhas, caules e frações dos frutos, têm diferentes níveis de atividade antioxidante nos sistemas testados *in vitro*. Os resultados demonstraram que os extratos com maiores teores de polifenóis totais forneceram maior poder antioxidante, sendo os compostos fenólicos predominantes encontrados: ácido gálico, ácido cafeico, (+) – catequina, ácido tânico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácidos quínico, ácido protocatequico, ácido clorogênico, ácido siringico, rutina e miricetina (JITTAWAN; SIRITHON, 2008; RAMADHAR *et al.*, 2010; KENNY *et al.* 2013).

A fração butanólica dos frutos de *M. charantia* em concentrações de 250 e 500 µg/mL, também eliminou em 63,4% e 87,1%, os radicais de 1,1-difenil-2-picrilhidrazol (DPPH), e os radicais hidroxila (\cdot OH) respectivamente, em células epiteliais renais, e foi mais potente do que a do ácido ascórbico no controlo positivo (HYUN *et al.*, 2013).

Shu-Jing e Lean-Teik (2008) encontraram no extrato aquoso maior concentração de flavonoides (62,0 mg/g) do que no extrato etanólico (44,0 mg/g), que tinham uma potente atividade de eliminação de radicais livres DPPH, ($IC_{50} = 129,94$ mg/ml e $IC_{50} = 156,78$ mg/ml respectivamente), o qual demonstrou ser mais potente que a vitamina C ($IC_{50} = 172,21$ mg/mL) na atividade antioxidante.

As novas estruturas identificadas com atividade antioxidante foram: 3β-hidroxi-multiflora-8-en-17-óico, cucurbita-1(10),5,22,24-tetraen-3α-ol e a estrutura elucidada como 5β,19β-epoxicucurbita-6,22,24-trien-3α-ol, um triterpenoide multiflorane 3β-hidroxi-multiflora-8-en-17-óico, e um triterpenoide cucurbitano, estrutura elucidada como 5β,19β-epoxicucurbita-6,22,24-trien-3α-ol, isolados de caules (CHIUNG-HUI *et al.*, 2010). Também a partir do extrato metanólico dos caules e frutos de *M. charantia* isolaram compostos com atividade antioxidante: um triterpeno tipo cucurbitano glicosídeo taiwacina A; um glicosídeo cucurbitane momordicoside K; um 23,24,25,26,27- pentanorcucurbitane, taiwacina B, e um glicosídeo esteroide conhecido 3-O-(β-D-glucopiranosil) -24β-etil-5α-cholesta-7,22,25(27) -trien-3β-ol (KAI-WEI; SHYH-CHYUN; CHUN-NAN, 2011).

Bin *et al.* (2012), demonstraram uma abordagem adequada para a extração seletiva de flavonoides de *M. charantia* L. pelo método de extração por etanol modificado com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), os quais tiveram maior atividade antioxidante do que os flavonoides extraídos pelo método convencionais utilizando solventes.

3.5 Atividade hepatoprotetora

Os triterpenoides octanorcucurbitane A-D isolados a partir do extrato metanólico dos caules de *M. charantia*, demonstraram efeito protetor sobre a citotoxicidade induzida por hidroperóxido de terc-butilo (t-BHP) em células de hepatoma humano HepG2 (CHI-I *et al.* 2010). Outros triterpenos elucidados como pentanorcucurbitane, 3,7-dioxo-23,24,25,26,27-pentanocucurbit-5-en-22-óico, e um trinorcucurbitane, 25,26,27-trinorcucurbit-5-eno-3,7,23-triona, mostraram uma potente atividade citoprotetora em hepatotoxicidade induzida no

mesmo sistema (CHIY-RONG *et al.*, 2010). Também alguns extratos mostraram uma diminuição significativa nos níveis séricos de creatinina, transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, nos testes de função hepática (SEHAM; EL-GENGAIHI; SHABRAWYA, 2006).

3.6 Atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética

Wen-Huey *et al.*, (2009), identificaram triglicerídeos constituídos por ácidos gordos de cadeia curta e média, em uma fração de extrato MeOH/H₂O (90/10), de *M. charantia*, encontrando ácidos gordos comuns de 3–20 átomos de carbono, e três ácidos dicarboxílicos, octanodioico, nonadióico e decanodioico, que tiveram atividade inibidora da síntese de Prostaglandina E₂, entre eles o ácido cáprico exibiu o efeito mais elevado (máximo de inibição = 99%, CI₅₀ = 6.5 µM).

Também a fração butanólica do extrato etanólico dos frutos maduros, dissolvidos em dimetilsulfóxido, suprime fortemente a expressão de vários mediadores induzidos por lipopolisacarídeos (LPS) inflamatórios, tais como o TNF α , IL1R, IL1, G1p2, e CCL5, em células macrófagos-like RAW 264.7. Os componentes da fração ativa foram identificados como 1- α -linolenil-lisofosfatidilcolina (LPC), 2- α -linoleoil-LPC, 1-linoleoil-LPC, e 2-linoleoil-LPC (KOBORI *et al.*, 2008).

A administração oral do extrato etanólico de fruto de *M. charantia* na dose de 250 e 500 mg/kg em ratos, mostrou efeito analgésico significativo em dor induzida na cauda por imersão no ácido acético, efeito anti-inflamatório (em inflamação induzida por carragenano na pata), e antipirético (a pirexia foi induzida por levedura) em ratos, e administração de 2 g/Kg do extrato, apresentou-se segura (ULLAH *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2010).

3.7 Atividade antiparasitária: Antiplasmodium e antileishmaniosis

Mariko *et al.* (1996) avaliaram o efeito de extratos aquoso e etanólico de *M. charantia* L. em camundongos infectados com *Plasmodium berghei*, na dose de 1000 mg/kg p.c., ministrado por via oral, por cinco dias consecutivos da infecção. Observou-se que os extratos, apresentaram débil atividade antiparasitária. No entanto, o extrato aquoso do fruto verde e seu componente momordicatina foi ativado contra promastigotas de *Leishmania donovani* (causador de calazar), *in vitro*, sendo a concentração mínima inibitória (IC₅₀) de 0,6 mg/L e

0,02 mg/L, respectivamente. Também apresentou 100% de ação contra o parasita em hamster com leishmaniose visceral a uma dose de 300 mg/kg p.c. de extrato bruto e de 10 mg/ kg p.c. de momordicatina. O modo de ação desses novos agentes leishmanicidas é mediado através da inibição da superóxido dismutasa (SOD) do parasita, que é uma das principais enzimas na reação oxidativa. (GUPTA *et al.*, 2010). Além, o extrato hidroalcoólico de *M. charantia* apresentou atividade moluscicida significativa contra *Schistosoma mansoni*, agente causador de esquistossomose, (a segunda doença parasitaria de maior prevalência no mundo com 85% de mortalidade), na concentração de 100 ppm; as avaliações fitoquímicas revelaram a presença de alcaloides, fenóis, catequinas, esteroides e saponinas. Os glicosídeos cianogênicos, antraquinonas, cumarinas, resinas e triterpenos deram resultados negativos (FRANCA *et al.*, 2010).

3.8 Efeito neuroprotetor

O suco do fruto liofilizado de *M. charantia* em doses de 200-800 mg/kg, tem atividade neuroprotetora potente contra isquemia cerebral global induzida por lesão neuronal e déficits neurológicos em ratos diabéticos (ZAFAR; MANJEET; SHARMA, 2011). Uma dieta com *M. Charantia* pode oferecer uma estratégia neuroprotetora e terapêutica para melhorar a inflamação e neuroinflamação periférica associada à obesidade, porque melhora a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) em camundongos com dieta rica em gordura, sendo evidente pela redução das fugas de corante azul de Evans. Também foram normalizados nos cérebros de ratos a ativação de células glia e expressão de marcadores neuroinflamatórios, tais como NF- κ B1, IL-16, IL-22, e a IL-17R. Da mesma forma, o estresse oxidativo cerebral também foi reduzido significativamente pela suplementação com *M. Charantia*. Além disso, as enzimas antioxidantes do plasma e citocinas pró-inflamatórias também foram normalizadas (NERURKAR *et al.*, 2011).

3.9 Atividade antiespermatogênica, androgênica e estrogênica

O extrato alcoólico das sementes de *M. charantia*, administrada a ratos na dose de 25 mg/100 g de p.c. por 35 dias apresentou atividade antiespermatogênica, com decréscimo do número de espermátócitos, espermátides e espermatozoos, com aumento do nível de

colesterol e acúmulo de lipídios sudanofílicos o que indica inibição na esteroidogênese. Ao mesmo tempo, produziu o aumento de peso do epidídimo, próstata, vesícula seminal e músculo elevador do ânus, o que mostra sua propriedade androgênica (MULLA *et al.*, 1998).

Os seguintes compostos foram isolados do fruto (extratos de acetato de etilo e de etanol): 5 β , 19-epoxicucurbita-6, 24-dieno-3 β , 23 ξ -diol, Cucurbita 6,22 (E), 24-trien-3 β -ol-19, 5 β -olide, 5 β , 19-epoxicucurbita-6,22(E), 24-trieno-3 β , 19-diol, 3 β -hidroxicucurbita-5 (10), 6,22(E), 24-tetraen-19-al, 19-dimetoxicucurbita-5(10), 6,22(E), 24-tetraen-3 β -ol, e 19-*nor*-cucurbita- 5 (10), 6,8,22 (E), 24-pentaen-3 β -ol, estes compostos mostraram atividade agonista e antagonista parcial do receptor de estrogênio (CHIN *et al.*, 2011).

3.10 Atividade imunoestimulante

Uma lectina obtida das sementes de *M. charantia*, injetada intramuscularmente em 2 doses em intervalo de duas semanas, em ratos BALB/c, usando β -galactosidase (β -gal) como antígeno, incrementa significativamente o título de IgG-específico para β -gal; o que sugere que pode ajudar a aumentar os anticorpos e ser um adjuvante potente nas vacinas (HUANG, *et al.*, 2008). Além disso, um polissacarídeo peptídeo solúvel em água que contém D-galactose e D-galacturonato de metila numa razão molar de 1:4, obtido do extrato aquoso do fruto verde de *M. charantia*, mostrou atividade imunoestimulante, porque ativou os macrófagos, os esplenócitos e tímócitos; e também mostrou potente atividade antioxidante (BIBHASH *et al.*, 2015).

3.11 Atividade anticoagulante

A injeção intravenosa de uma proteína obtida do extrato aquoso das sementes de *M. charantia* (MCSE), em camundongos, prolongou significativamente o tempo de hemorragia, de uma maneira dose-dependente de 150 a mais do que 800s, sendo que prolongou especificamente o tempo de coagulação apenas de tromboplastina, mas não o tempo de protrombina, e revelaram a participação na via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea. Além disso, MCSE hidrolisou completamente ambas as cadeias A α e B β do fibrinogénio humano e parcialmente a cadeia γ (BHAGYALAKSHMI *et al.*, 2015).

3.12 Atividade cicatrizante e antiulcerativa

A aplicação tópica de extratos dos frutos de *M. charantia* (homogeneizado oleoso), melhorou significativamente a cicatrização de feridas de pele em coelhos (SATAR *et al.*, 2013). O extrato metanólico do fruto, administrado oralmente nas doses de 100 mg e 500 mg/kg em ratos com úlceras gástricas e duodenais induzidas por ácido acético, ligadura do piloro, etanol, estresse, indometacina e cisteamina, provocou a diminuição significativa e cicatrização das úlceras gástricas e duodenais. Verificou-se além, que o extrato mostrou diminuição significativa de acidez total, acidez livre e conteúdo de pepsina e um aumento no conteúdo da mucosa gástrica (SAMSUL *et al.*, 2009).

3.13 Atividade antibacteriana

Braca *et al.*, (2008), identificaram 25 componentes a partir óleo essencial de sementes de *M. charantia*, representados como sesquiterpenos (71,7%), fenilpropanoides (11,0%), e monoterpenos (7,6%), sendo os principais constituintes: trans-neridol, apiol, cis-dihidrocarveol e germacreno D, os que demonstraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 com a concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/ml.

Extratos de casca e polpa de fruto de *M. charantia* na dose de 100 µg/mL, apresentaram boa atividade antibacteriana contra 11 espécies diferentes de bacilos Gram-negativos isolados a partir de amostras clínicas de fezes, urina, sangue e pus de feridas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae* e *Yersinia enterocolitica*, dando uma zona média de inibição de $16,16 \pm 2,17$ mm e $15,88 \text{ mm} \pm 2,24$, respectivamente (SABAHAT; PERWEEN, 2005).

Em outro estudo, o extrato aquoso da planta (na dose de 100 µg/mL) apresentou a maior atividade contra *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* e *S. paratyphi A* (22-25 mm de halo de inibição), e o extrato metanólico apresentou atividade antibacteriana semelhante contra as três cepas patogênicas de *Salmonella* (20 mm halo de inibição) (PASHA *et al.*, 2009). Semelhantes resultados foram obtidos por Abalaka *et al.* (2010), contra quatro patógenos,

Escherichia coli, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*; as CIM variaram entre 40 e 80 µg/ml. O extrato de fruto verde demonstrou semelhante atividade antimicrobiana, contra *Escherichia coli* (CIM: 0.5 mg /mL) e *Staphylococcus aureus* resistente (CIM: 9 mg/mL). O estudo fitoquímico mostrou a presença de fenóis, flavonoides, e alcaloides, os quais são conhecidos compostos fitoquímicos antimicrobianos. A fração aquosa e metanólica das folhas e sementes da planta *M. charantia* tiveram baixa atividade antimicrobiana (MAHOMOODALLY *et al.*, 2010).

O extrato aquoso das folhas também atuou contra *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus*, sendo que a presença de alcaloides, flavonoides e taninos poderiam estar causando a atividade antibacteriana observada (GBOGBO K *et al.*, 2013).

Curiosamente Yeh-Lin *et al.* (2011), demonstraram que nenhum dos extratos aquoso (H) e metanol (M) dos frutos de cabaço amargo Selvagem (*M. charantia* L. var. *Abbreviata* Seringa, MCA) e cabaço amargo cultivada (*M. charantia* L., MC), de dezesseis cultivares de Taiwan indígena, mostrou atividade inibidora contra *Staphylococcus aureus* metilina-resistente subsp aureus ou *Pseudomonas aeruginosa*, a dose de 10 mg/mL. Entretanto, vários extratos H e M mostraram atividade inibidora contra o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*.

Resultados semelhantes de atividade antibacteriana foram observados em pesquisas com *M. charantia* coletadas em algumas regiões do Brasil. O extrato etanólico bruto de folhas frescas da planta coletadas no município de Crato, Ceará, Brasil, exibiu atividade contra *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que as concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL foram as que tiveram maiores halos de inibição do crescimento bacteriano (10 a 20 mm). Na avaliação de toxicidade usando *Artemia salina* apresentou um valor de CL₅₀ de 602,5 mg/mL. Foi confirmada a presença de flavonoides nas frações que tem ação antibacteriana (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Lima (2008) encontrou por meio da técnica de difusão em discos de papel de filtro, que o extrato aquoso das folhas inibiu as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e o extrato hidroalcoólico, inibiu a *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *Salmonella choleraesuis*. O extrato etanólico além de inibir os microrganismos citados, também inibiu a *K. pneumoniae*. Enquanto o extrato hexânico inibiu todos os microrganismos utilizados, sendo os diâmetros de inibição de 9 a 14.5 mm.

Lucena-Filho (2012) obteve resultados semelhantes contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e nas bactérias multirresistentes *Proteus mirabilis* (PNCQ), *Providência rettgeri* (PNCQ) e *Escherichia coli* (PNCQ), com extrato etanólico dos frutos de *M. charantia L.* (coletados no Sertão Paraibano), sendo as CIM na faixa de 0.003 a 0,062 mg/mL e a concentração bactericida mínima (CBM) na faixa de 0,007 a 0,125 mg/mL.

Coutinho *et al.* (2010) demonstraram um efeito potenciador do extrato etanólico das folhas da planta (coletadas no município de Crato, Ceará, Brasil) para os aminoglicosídeos: gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina e neomicina, frente cepas de *Stafilococcus aureus* (SA358) resistente a aos mesmos. A CIM do extrato foi 32 µg/mL. O mesmo efeito foi demonstrado com clorpromazina (inibidor de bomba de efluxo) em Kanamicina, neomicina e gentamicina, indicando o envolvimento de um sistema de efluxo na resistência a estes aminoglicosídeos.

Na prospecção fitoquímica dos extratos etanólico e acetato de etila das folhas frescas e secas de “melão-de-são-caetano, “melão amargo” do Ceará, Brasil, encontrou-se a presença de diferentes classes de metabólitos secundários, como flavonoides, alcaloides e taninos, que demonstraram ação antimicrobiana significativa contra *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (COSTA *et al.*, 2011).

4 METODOLOGIA

Para uma melhor organização e compreensão dos resultados obtidos neste trabalho, a metodologia foi dividida em três etapas, a saber: **I-** Parâmetros Farmacognósticos comparativos entre as folhas de *Momordica charantia* L. variedades macrocarpa e microcarpa e isolamento da momordicina II; **II** – Preparação de extratos e frações para avaliação da atividade antimicrobiana e sinérgica; **III** - Análise exploratória em UPLC por partição Líquido-Líquido dos extratos ativos.

4.1 Materiais Botânicos

Os materiais botânicos utilizados para determinação dos Parâmetros Farmacognósticos comparativos constaram de folhas de *Momordica charantia* L., variedades microcarpa e macrocarpa coletados de espécimes do Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará no período de floração e frutificação. Para a coleta das folhas foi utilizada tesoura de poda e para herborização foram seguidos os procedimentos usuais do Instituto de Botânica (1984). As exsiccatas das variedades microcarpa e macrocarpa coletadas encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob os números EAC31608, EAC31609, EAC16698 e EAC12887. Os estudos de avaliação de atividade antimicrobiana e análise exploratória em UPLC foram realizadas com *M. charantia* L. da variedade microcarpa, usando as folhas, frutos e sementes frescos que foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar a 45°C até peso constante, em seguida moídas.

ETAPA I - Parâmetros Farmacognósticos Comparativos entre as Folhas de *Momordica charantia* L. Variedades Macrocarpa e Microcarpa e Isolamento da Momordicina II

4.2 Análises Macro e Micromorfológicas

As análises macromorfológicas foram realizadas com as folhas frescas a olho nu, procedendo-se às descrições gerais de cada parte, concomitantemente, comparando-se às características das folhas das variedades de *M. charantia* macrocarpa e microcarpa. Para as análises micromorfológicas foram realizados cortes transversais das folhas, os quais foram

fixados em formaldeído/ácido acético (FAA) 70% por 48 horas e posteriormente, armazenados em álcool 70%. Foram confeccionadas lâminas semipermanentes com secções de cortes de 5µm, obtidas em micrótomo Leica 2065, clarificadas em hipoclorito de sódio 20%, após, lavadas em água destilada, banhadas em água acidulada e novamente em água destilada segundo Oliveira e Akisse (1993). Os cortes foram corados com azul de toluidina e analisados utilizando-se microscópio óptico Leica DM 4000B Led e comparados com os dados da literatura, Zocoler *et al.* (2006).

4.3 Abordagem fitoquímica preliminar

Para a realização das análises fitoquímicas preliminares comparativas entre as duas variedades de *M. charantia*, microcarpa e macrocarpa, foram realizados por reações de coloração e precipitação para determinação dos grupos de substâncias químicas comumente presentes em plantas, segundo a metodologia descrita por Matos, (2009). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Isolamento de composto MSC em *Momordica charantia* L, variedade microcarpa

As folhas frescas (500g) de *Momordica charantia* L, variedade microcarpa foram submetidas a extração por maceração em 1L de etanol (96,5° GL) por 48 horas. O extrato etanólico a 50% obtido foi submetido a evaporação com auxílio de rotaevaporador rotativo. Durante este processo de evaporação, observou-se a precipitação de sólido esbranquiçado, foi purificado por cromatografia em coluna, até obter o sólido precipitado, que foi lavado sucessivamente com solventes de polaridades crescentes como hexano, diclorometano e acetona, até obtenção de um sólido branco codificado como (MSC).

4.5 Identificação estrutural de Momordicina II (MSC)

O sólido amorfo branco obtido (MSC), adotou-se como procedimento a análise comparativa dos dados espectrais com os da momordicina I (Mo-1) e momordicina II (Mo-2), usando dados da literatura (YASUDA *et al.*, 1984; PUSPAWATI 2008), **Tabela 2.**

O procedimento analítico adotado, então, envolveu a comparação dos dados de RMN¹H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) e RMN¹³C (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono) de MSC, momordicina I (Mo-1) e momordicina II (Mo-2), interpretados com a contribuição dos espectros bidimensionais (2D) de correlação heteronuclear [¹H-¹³C-COSY-ⁿJ_{CH} [n=1, HMQC (H-detected heteronuclear Multiple Quantum Coherence); n=2 e 3, HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)] e homonuclear [¹H-¹H-COSY (CORrelation SpectroscopY de hidrogênio e hidrogênio, interação escalar spin-spin) e ¹H-¹H-NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange SpcetroscopY de hidrogênio e hidrogênio, interação dipolar promovida pela proximidade espacial), usando-se piridina (C₅D₅N) deuterada para obtenção dos espectros.

ETAPA II - Preparação de Extratos e Frações para Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Sinérgica

Foi realizado usando dois procedimentos:

4.6 Procedimento 1. Obtenção dos extratos das folhas, sementes e frutos por microextração líquido-líquido, para avaliação da atividade antimicrobiana

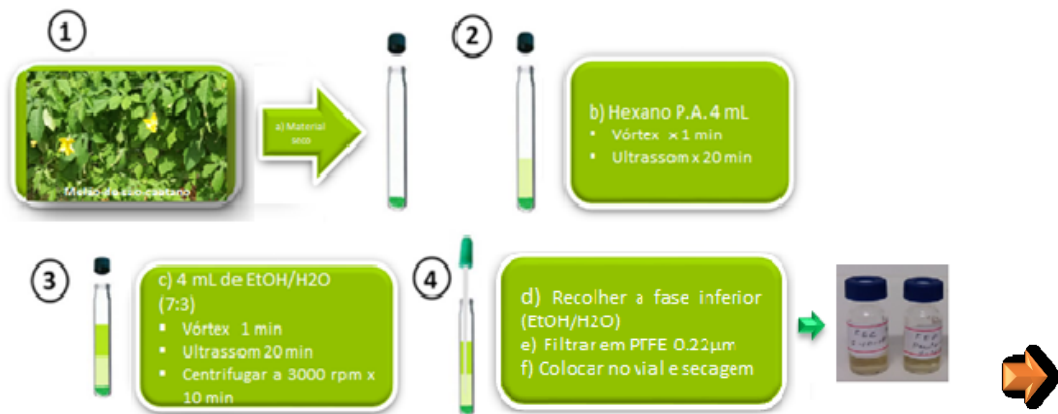
Para a preparação dos extratos, as folhas, frutos e sementes foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar a 45°C até peso constante, em seguida moídos. Duas extrações foram realizadas para cada parte da planta, com etanol/H₂O (7:3) e com acetona. Pesou-se, separadamente, 1.0 g do pó de folhas, polpa de fruto e semente, e colocou-se em um tubo de ensaio, com 4 mL de hexano para desengorduramento. Posteriormente, foi adicionado 4 mL de solução Etanol/H₂O (7:3), homogeneizado e realizado a extração dos compostos polares em banho ultrassom por mais 20 min com potência fixa (135 W). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10 minutos) para decantar a fase hexânica e descartá-la. A fase hidroalcolica (Etanol/H₂O) foi filtrada em filtro de PTFE (politetrafluoretileno) de 0,22 µm, e logo após, o filtrado foi recolhido em frascos pequenos, com posterior secagem e pesagem.

Para a extração com acetona, o mesmo procedimento anterior foi realizado, só que, antes de adicionar acetona, a fase de hexânica foi removida. Dessa forma, foram obtidos seis

extratos, conforme descrito na **figura 4**, assim codificados: Folhas - extrato hidroalcolico/ etanol/H₂O (FE) e extrato acetônico (FA); Frutos - extrato etanol/H₂O (FrE) e extrato acetônico (FrA); Sementes - extrato etanol/H₂O (SE) e extrato acetônico (SA). Todas estas amostras foram secas e pesadas para cálculo dos seus rendimentos.

Para avaliação da ação antimicrobiana, os extratos foram solubilizados em solução de Dimetil sulfóxido 1% (DMSO, Merck).

Figura 4 - Microextração dos extratos das folhas, sementes e frutos para ensaio antimicrobiano.



Fonte: EMBRAPA, adaptada pelo autor

O extrato da parte da planta que deu atividade antimicrobiana potente (folhas), foi usado novamente para obtenção de extratos com solventes diferentes de acordo com o procedimento 2, e usado para ensaio antimicrobiano e de sinergismo associados com antimicrobianos de uso comercial.

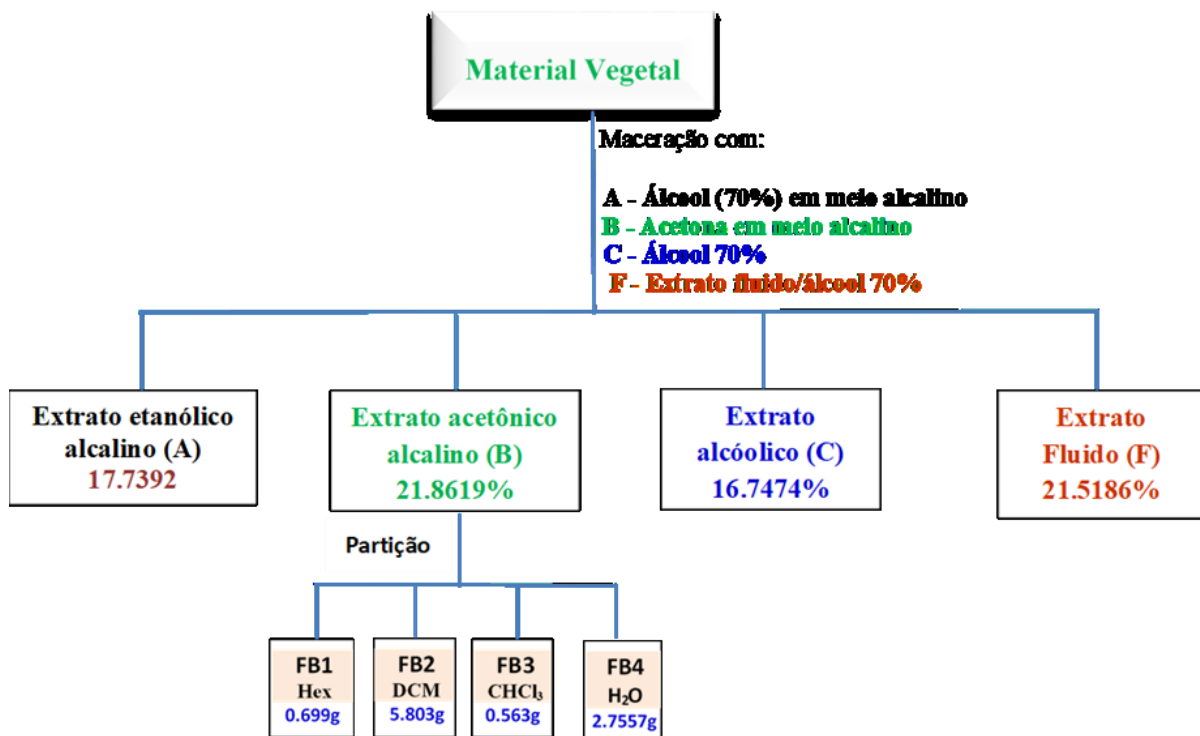
4.7 Procedimento 2. Obtenção dos extratos vegetais de folhas por maceração, para ensaios microbiológicos

Os extratos foram obtidos pelo método de maceração por 7 dias com solventes adequados para obter extrato etanólico 70% /alcalino, pH 10 (A), extrato acetônico alcalino (B), extrato etanólico 70% (C) e extrato fluido (F), conforme descrito na **figura 5**. Cada

extrato obtido foi seco com auxílio de estufa com circulação de ar à 40°C e calculado o seu rendimento, e expresso em porcentagem.

Parte do extrato (B) que deu boa atividade antimicrobiana foi submetido a partição líquido-líquido com hexano (B1), diclorometano (B2) e clorofórmio (B3), com 30 mL de cada solvente para cada extrato, para obter 4 frações diferentes: FB1, FB2, FB3 e aquosa FB4. Logo depois, foram secas, pesadas e conservadas a 4°C até seu uso posterior na avaliação da atividade antibacteriana.

Figura 5 - Obtenção dos extratos e frações de *M. charantia* úteis



4.8 Preparação dos extratos e frações para avaliação antibacteriana

Os extratos e frações da planta *Momordica charantia* L., foram solubilizados em solução de Dimetil sulfoxido 1% (DMSO, Merck) a uma concentração de 2000 µg/mL, dos quais aplicou-se 20µL a cada poço da microplaca em concentrações seriadas variando de 2000,0 até 31,2µg/mL.

4.9 Cepas Microbianas e Fúngica

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas as bactérias Gram-positivas - *S. aureus ATCC 6538P* (sensível á oxacilina) e *S. aureus CCBH5330* (resistente a Oxacilina, MRSA) e as bactérias Gram-negativas - *E. coli ATCC 10536*, *P. aeruginosa ATCC 9027*, *K. pneumoniae ATCC10031*. As cepas utilizadas, mantidas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro), foram obtidas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro). Para a determinação da atividade antifúngica foi utilizada a levedura *C. albicans ATCC 10231*.

4.10 Preparo e padronização do inóculo bacteriano

As cepas microbianas, mantidas em cultura estoque no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) da UFC, foram repicadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) ou caldo *Sabouraud*, para bactérias e leveduras, respectivamente. Os repiques foram incubados por 24 horas a 37°C. Para a padronização dos inóculos microbianos, alíquotas retiradas do tubo com repique foram transferidas para solução salina 0,85% estéril, até obter turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland (cerca de 10^8 UFC/mL ou 10^6 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente). Essa suspensão foi diluída 100 vezes para obtenção do inóculo microbiano final (com cerca de 10^6 UFC/mL ou 10^4 UFC/mL para bactérias e leveduras, respectivamente), que foi utilizado em todos os ensaios microbiológicos (CLSI, 2008; CLSI, 2015).

4.11 Ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio foi realizado conforme metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratorial Standard Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2015). Aos poços de microplacas de 96 poços, estéreis, foi adicionado 100µL de meio de cultura caldo BHI ou Sabouraud (para bactérias e leveduras, respectivamente), 20µL da substância teste (extratos e frações), em concentrações variando de 2000 até 31,2µg/mL, e 80 µL das suspensões microbianas (10^6 e

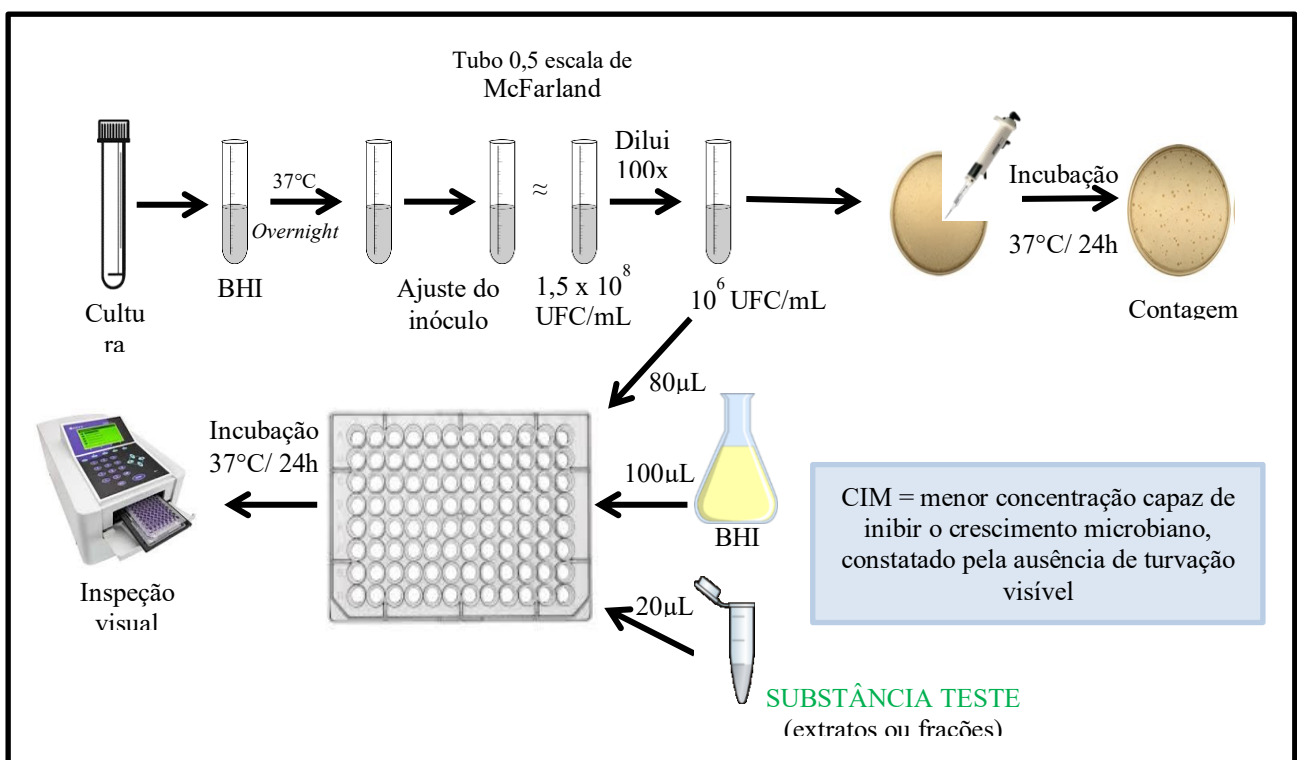
10^4 UFC/mL, para bactérias e leveduras, respectivamente), exceto nos poços que correspondem aos controles das substâncias.

Foi realizado controle de turvação (meio + substância nas diferentes concentrações), controle de esterilidade do meio (apenas meio), controle de crescimento microbiano (meio + suspensão microbiana), controle de esterilidade do diluente (meio + diluente) e controle de não inibição do diluente (meio + diluente + suspensão microbiana). Foram usados os fármacos oxacilina e fluconazol, para bactérias e leveduras, respectivamente, nas concentrações de 100 a 0,0488 $\mu\text{g/mL}$, como **controle positivo**.

As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C e, após esse período, foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano. A CIM foi determinada como a menor concentração da substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano a olho nu, constatado pela ausência de turvação (CLSI, 2008; CLSI, 2015).

Para os extratos e suas frações que apresentaram intensa turvação foi adicionado 10 μL de resazurina (0,01%) e incubado a 37°C por 2 horas. A manutenção da cor azul nos poços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano, e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da substância teste em que não houve mudança de coloração (PALOMINO *et al.*, 2002). Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes, **figura 6**.

Figura 6 – Fluxograma da determinação da CIM



Fonte: Valeria Dodou (2017)

4.12 Determinação da concentração letal mínima (CLM)

Alíquotas de 5µL dos poços das microplacas usadas na determinação da CIM, que não apresentaram crescimento bacteriano, foram semeadas em placas de Petri contendo ágar *Plate Count*, e incubadas durante 24 horas a 37°C. Após esse período, foi realizada a contagem de colônias. A CLM foi considerada como a menor concentração capaz de determinar a morte microbiana de valores $\geq 99,9\%$ do inoculo inicial (BARON; FINEGOLD, 1994; YAMAGUCHI *et al.*, 2009). Nos casos em que todas as concentrações testadas apresentaram crescimento microbiano e fúngico acima do permitido na determinação da CLM, determinou-se que o efeito das amostras foi bacteriostático e fungistático para bactérias e leveduras testadas, respectivamente.

4.13 Ensaio de sinergismo ou modulador na ação de antimicrobianos (Método de Checkerboard)

Este ensaio foi realizado para avaliar a ocorrência de sinergismo dos extratos e frações das amostras vegetais que apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* nos ensaios descritos no item 2.11, (extrato acetona – FB - e suas frações hexano - FB1 -, diclorometano - FB2 -, e clorofórmio - FB3), em combinações com sete classes de antimicrobianos utilizados comercialmente (oxacilina, amikacina, meropenem, vancomicina, cefalotina, ceftriaxona e ciprofloxacina). Para avaliar o efeito modulador na ação de antifúngicos, usou-se o extrato acetona (FB) e sua fração diclorometano (FB2), que apresentaram efeito antifúngico sobre *C. albicans*, frente a três antifúngicos comerciais (ciclopirox, nistatina e miconazol) (PILLAI; MOELLERING, 2005).

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de meio de cultura BHI para bactérias e Sabouraud para fungos, 20µL da substância teste (extratos e frações), 20µL do antimicrobiano, e 80 µL das suspensões microbianas, padronizadas conforme já descrito anteriormente. As concentrações das substâncias testes e dos antimicrobianos foram iguais a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 da CIM, determinada previamente. As

microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, após esse período, foi realizada a leitura visual do crescimento microbiano (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Os experimentos foram realizados em triplicata e em dois momentos diferentes. Foram realizados controles de esterilidade do meio (apenas meio) e de controle de crescimento microbiano (meio + suspensão microbiana), **figura 7**. Para avaliar a interação (sinergismo ou efeito modulador) entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula (SHIN; LIN, 2004):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{(\text{sust. teste})} + \text{CIF}_{(\text{ATB})} \quad (1)$$

Sendo,

$$\text{CIF}_{(\text{sust. teste})} = [\text{CIM}_{(\text{sust. teste na associação})} / \text{CIM}_{(\text{sust. teste isolada})}] \quad (2)$$

$$\text{CIF}_{(\text{ATB})} = [\text{CIM}_{(\text{ATB na associação})}] / \text{CIM}_{(\text{ATB isolado})} \quad (3)$$

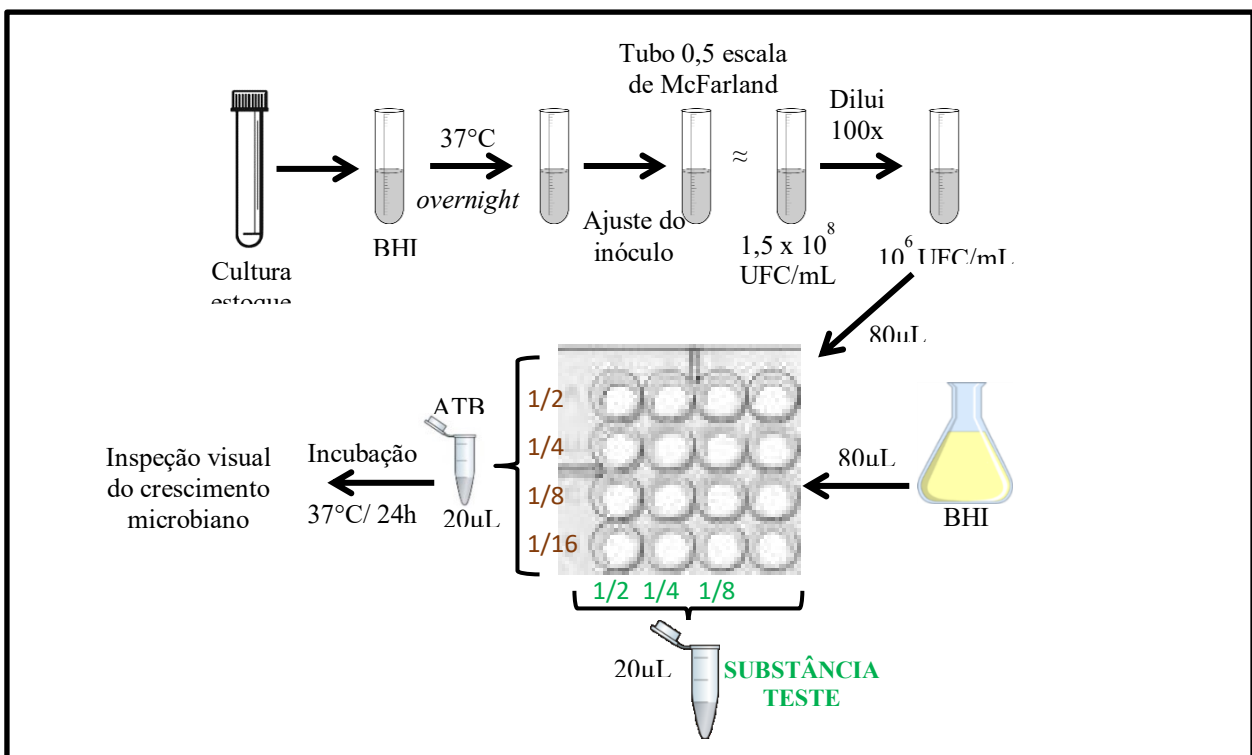
A partir do cálculo do ICIF, de cada extrato e frações, foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por (EUCAST, 2003; KUMAR *et al.* 2012):

ICIF	≤	0,5	: sinergismo
ICIF	>	0,5 e < 1,0	: aditivo ou indiferente
ICIF	≥	1,0	: antagonismo

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada;

CIF: concentração inibitória fracionada.

Figura 7 - Fluxograma da avaliação de atividade moduladora – ensaio do *checkerboard*



Fonte: Valeria Dodou (2017)

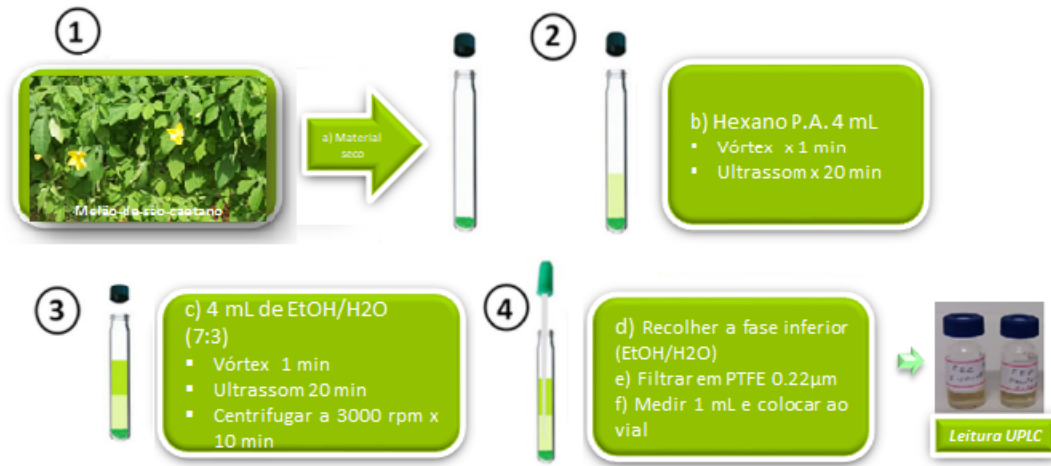
ETAPA III - Análise Exploratória em UPLC por Partição Líquido-Líquido dos Extratos Ativos (microextrações)

4.14 Preparação dos extratos ativos para análise exploratória em UPLC por partição Líquido-Líquido, utilizando ultrassom

Procedimento experimental

1. Colocou-se 50 mg de cada extrato seco ativo em um tubo de ensaio, em seguida, adicionou-se 4 mL de Hexano PA.
2. Foi homogeneizado a mistura em Vórtex por 1 min e realizou-se a extração de compostos apolares em banho ultrassom por 20 min com potência fixa (135 W).
3. Posteriormente, adicionou-se a mistura 4 mL de solução Etanol/H₂O (7:3). Homogeneizou-se novamente a mistura em Vórtex por 1 min e realizou-se a extração dos compostos polares em banho ultrassom por mais 20 min. Em seguida, realizou-se a centrifugação para decantar o extrato não dissolvido a 3000 rpm por 10 min.
4. Retirou-se uma alíquota (2 mL) da fase inferior moderadamente polar (Etanol/água), realizou-se a filtração em filtro de PTFE de 0,22 µm e recolher o filtrado em tubo de penicilina vials e encaminhá-lo para análise em UPLC.
5. Mediu-se com pipeta automática, diretamente no vial de 2 mL, um volume de 900 µL do extrato que foi preparado do item 4 e adicionou-se ao mesmo 100 µL da solução padrão interno (anthracene-9-carboxylic acid) a uma concentração de 10 µg/mL (10 ppm), resultando em uma solução final do padrão de 1 µg/mL (1 ppm), **figura 8**.

Figura 8 - Esquema de microextração do extrato para análise exploratória em UPLC por partição Líquido-Líquido, utilizando ultrassom.



Fonte: EMBRAPA, adaptada pelo autor

4.15 Análise Cromatográfica

1. A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µL.
2. * Condições do Massas de Alta resolução - XEVO-QToF
3. O modo ESI- foi adquirido na faixa de 110-1180 Da; temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da; temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MSE. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

4.16 Interpretação dos espectros e identificação dos constituintes dos extratos ativos

O software usado para o tratamento de dados foi o Masslynx (Waters Corporation) onde foram calculadas as fórmulas moleculares com suas respectivas massas. A identificação dos compostos foi feita baseada na comparação de padrões espectrométricos já abordados na literatura referente à espécie *Momordica charantia*. Também foram utilizados bancos de dados onde poderiam ser encontrados metabólitos já caracterizados disponíveis online, como Scifinder, Knapsack, Pubchem e Chemspider.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros macro e micromorfológicos

As folhas de *Momordica charantia* L. das variedades macrocarpa e microcarpa apresentam as seguintes características macroscópicas comuns: são alternas, membranáceas, pecioladas, de limbo orbicular, margem levemente denteada, ápice obtuso e base truncada. Medem de 6 a 12 cm de comprimento e 8 a 12 cm de diâmetro, são palmatinérveas, com 5 a 7 lobos angulosos, separados por sulcos profundos. Nas duas variedades a face superior é levemente pubescente e a inferior mais densamente pilosa ao longo das nervuras. Observou-se que o principal parâmetro macroscópico diferencial entre as folhas das duas variedades é que, as folhas da variedade macrocarpa apresentam-se com tamanho maior que as da variedade microcarpa, conforme pode-se observar nas xeroexsicatas (Figura 9).

Figura 9 - Xeroexsicata das folhas adultas de *Momordica charantia* L. variedades microcarpa (1) - 8 cm e macrocarpa (2) - 12 cm.



As análises micromorfológicas das folhas de *Momordica charantia* L. variedades macrocarpa e microcarpa apresentam as seguintes características anatômicas comuns: as epidermes superior e inferior são constituídas por uma camada de células poligonais. O

mesofilo é estreito e compacto, com poucos espaços intercelulares. Sua estrutura é dorsiventral, apresentando parênquima paliçádico constituído por uma camada de células alongadas, de paredes delgadas compactamente dispostas. O parênquima lacunoso é formado por várias camadas de células de formato arredondado a ligeiramente alongado e de disposição mais frouxa. Na região da nervura central observa-se um único e pequeno feixe biclateral, imerso em tecido parenquimático. Abaixo da epiderme ocorrem duas camadas de colênquima, mais estreito na face adaxial, conforme observado por Zocoler et al. (2006). Raros pêlos glandulares pediculados curtos. Apresentam tricomas em ambas as epidermes, sendo que o principal parâmetro diferencial entre as variedades, é que a variedade macrocarpa os tricomas apresentam-se menos frequentes e são do tipo pluricelular curto com 3 a 5 células, enquanto os da variedade microcarpa são do tipo pluricelular longo com 7 a 11 células, apresentando-se raramente estrelados.

Os caracteres organolépticos das folhas analisadas, o sabor amargo, a cor verde escura e o odor foram semelhantes em ambas as variedades de *Momordica charantia* L.

5.2 Abordagem Fitoquímica comparativa

Conforme os resultados demonstrados na **Tabela 1**, a abordagem fitoquímica demonstrou que as duas variedades possuem em comum alcalóides, esteroides, triterpenóides, saponinas, compostos fenólicos, taninos condensados e flavonoides. As clases químicas comuns entre folhas e talos, demonstra que os extratos preparados no presente trabalho para verificação da atividade antimicrobiana e estudos químicos de *M. charantia* variedade microcarpa podem conter a mistura destas partes, com vista também a um maior rendimento da massa verde.

Tabela 1 - Prospecção dos constituintes químicos presentes nas folhas e talos de *Momordica charantia* L. variedades macrocarpa (MCMa) e microcarpa (MCMi).

TESTES	(MCMa) Folhas	MCMa) talos	(MCMi) Folhas	(MCMi) talos
Alcalóides	+	+	+	+
Antocianidinas/antocianinas	0	0	0	0
Antranóis	0	0	0	0
Auronas	0	0	0	0
Bases quaternárias	0	0	0	0
Catequinas	0	0	0	0

Chalconas	0	0	0	0
Cumarinas	0	0	0	0
Esteróides	+	+	+	+
Fenóis livres	+	+	+	+
Flavonóides	+	+	+	+
Heterosídeos cianogenéticos	0	0	0	0
Leucoantocianidinas	0	0	0	0
Resinas	0	0	0	0
Saponinas	+	+	+	+
Taninos condensados	+	+	+	+
Taninos pirogálicos	0		0	
Triterpenóides	+	+	+	+
Xantonas	0	0	0	0

Legenda: positivo (+); negativo (0).

5.3 Identificação estrutural de MSC (momordicina II)

O espectro de RMN¹H de MSC mostrou sinais para hidrogênios de cinco grupos metílicos ligados à carbonos quaternários (δ 0,94 (s), 1,22 (d, 7,8), 1,51 (s), 1,21 (s), 0,91 (s)); e mais dois desses grupos metílicos estão ligados a um carbono olefínico (δ 1,79 (s), 1,71(s)); três hidrogênios ligados a carbonos com hidroxilas (δ 3,84 (sl) e 4,38), onde um dos quais encontra-se adjacente ao hidrogênio olefínico. Observa-se um hidrogênio de um grupo formila (δ 10,63) ligado a carbono quaternário, **Figura 10**. O espectro de RMN¹³C mostrou sinais para seis carbonos quaternários (δ 43,21, 147,14, 52,03, 47,35, 49,72, 133,66), dez carbonos metínicos (δ 77,07, 125,75, 67,17, 52,10, 38,29, 52,71, 34,12, 77,07, 130,58), onde entre eles encontra-se o carbono aldeídico em δ 209,27; sete carbonos metilênicos (δ 23,20, 29,26, 24,14, 31,07, 36,38, 31,34, 45,2). Observou-se a presença de carbonos relacionados ao grupo β -glicopiranosil (δ 105,62, 76,65, 80,37, 73,31, 79,70), **Figura 11**, (**tabela 2**).

Figura 10 - RMN¹H, de composto MSC em piridina deuterada, momordicina II, presentes nas folhas de *M. charantia* L. variedades microcarpa (MCMi)

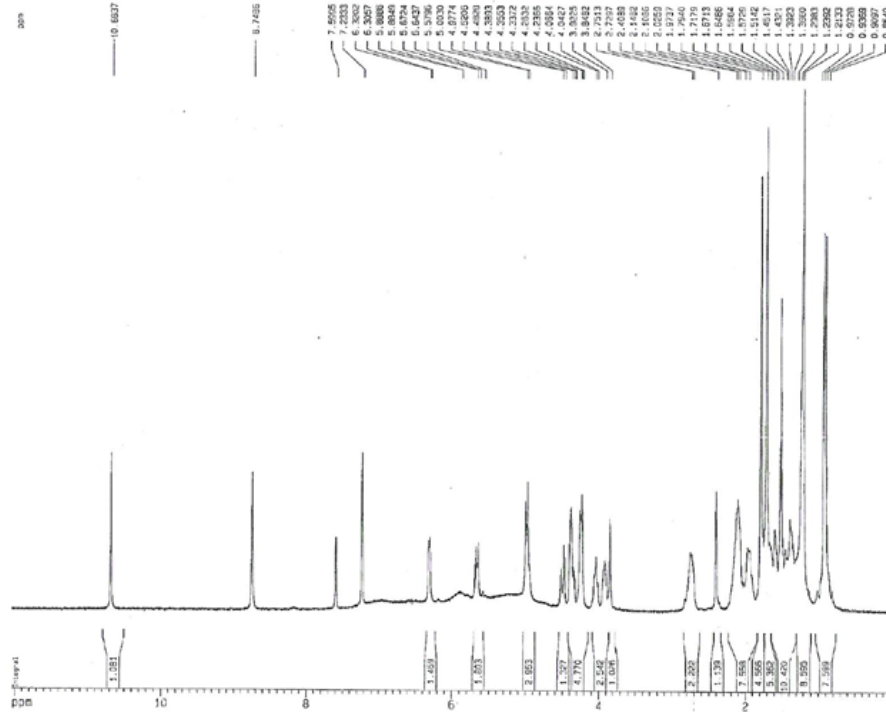


Figura 11 - Espectro RMN¹³C, de composto MSC em piridina deuterada, momordicina II, das folhas de *M. charantia* L. variedades microcarpa (MCMi)

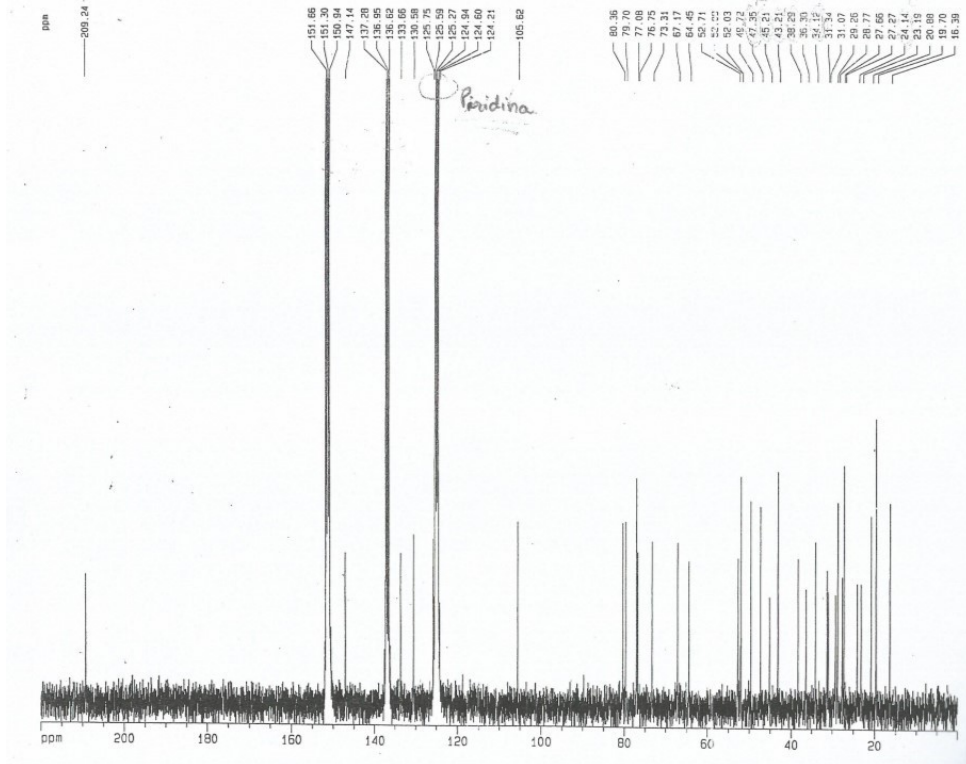
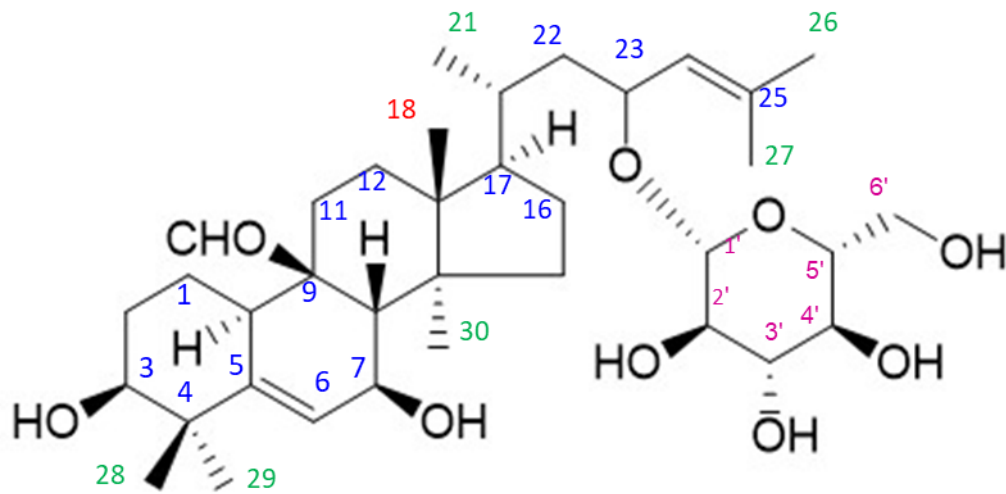


Tabela 2 - Dados espectrais de RMN¹H e RMN¹³C de MSC.

	MSC, em C ₅ D ₅ N				Em C ₅ D ₅ N	
	¹ H- ¹³ C-COSY- ¹ J _{CH}		¹ H- ¹³ C-COSY- ⁿ J _{CH}		Mo-1	Mo-2
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C	δ _C
C						
4	43.21	-	3H-28; 3H-29		41.79	41.95
5	147.14	-		H-7; 3H-28; 3H-29	145.73	148.30
9	52.03	-	H-8		50.61	34.41
13	47.35	-	3H-18	3H-30	45.76	46.43
14	49.72	-	H-8; 3H-30	3H-18	48.28	48.46
25	133.66	-	3H-26; 3H-27		69.72	130.84
CH						
3	77.07	3.84(sl)		3H-28; 3H-29	75.68	76.05
6	125.75	6.31(d, 4.3)	H-7	H-8	124.29	121.03
7	67.17	4.38	H-8		65.73	72.55
8	52.10	2.41		H-19; 3H-30	50.66	48.14
10	38.29	2.73(s)		H-8	36.90	39.29
17	52.71	1.60		3H-18; 3H-21	50.15	51.34
19	209.27	10.63(s)			207.81	-
20	34.12	2.20	3H-21		36.58	32.99
23	77.07	4.98		H-1'	124.23	65.31
24	130.58	5.66 (d, 8.6)		3H-26; 3H-27	141.73	131.83
CH₂						
1	23.20	2.10; 1.75			21.76	21.72
2	29.26	1.50			29.94	30.12
11	24.14	1.68; 1.60			22.71	28.23
12	31.07	1.97		3H-18	29.44	32.89
15	36.38	1.40		3H-30	34.96	34.82
16	31.34	2.10; 1.70			27.75	30.65

22	45.21	2.10; 1.25		3H-21	39.56	45.51
CH₃						
18	16.39	0.94(s)			15.05	15.64
19	-	-	-	-	-	29.33
21	20.87	1.22(d, 7.8)			18.96	19.31
26	19.70	1.79(s)		3H-27	30.85	25.79
27	27.26	1.71(s)		3H-26	30.85	18.10b
28	27.66	1.51(s)		3H-29	26.24	26.34
29	28.77	1.21(s)		3H-28	27.39	28.38
30	19.70	0.91(s)		H-8	18.20	18.07b
Açucar						
1'	105.62	4.99 (d, 7.7)			-	101.20
2'	76.65	4.05	H-3'		-	75.12
3'	80.37	4.24			-	78.77
4'	73.31	4.24			-	71.93
5'	79.70	3.92			-	78.50
6'	64.44	4.50 (d, 11.3), 4.34			-	62.82

Figura 12: Estrutura da Momordicina II

5.4 Rendimento dos extratos

5.4.1 Rendimentos dos extratos de folhas, frutos e sementes obtidos por microextração

Os rendimentos dos seis extratos de folhas, frutos e sementes, obtidos por microextração e codificados anteriormente, foram: FE - 9,8% e FA 4,2%; FrE 17% e FrA 5,2%; SE- 13% e SA 5,4%. Os maiores rendimentos foram verificados para os extratos hidroalcolicos FE, FrE e SE.

5.4.2 Rendimentos dos extratos obtidos por maceração das folhas e frações do extrato B

Os rendimentos dos diferentes extratos das folhas expressados em porcentagem de extrato seco foram: extrato etanol 70% alcalino "A" (17.7392%), extrato acetona "B" (21.8619%), extrato etanol 70% "C" (16.7474%) e o extrato fluido "F" (21.5186%). Os rendimentos da partição líquido-líquido de 10 g de extrato acetona (B) para as quatro frações foi: fração hexano FB1 (0.6999g), diclorometano FB2 (5.8036), clorofórmio FB3 (0.5630) e fração aquosa FB4 (2.7575g).

5.5 Atividade antimicrobiana e antifúngica (Método de microdiluição)

5.5.1 Ensaios microbiológicos dos extratos de folhas, frutos e sementes

Comprovou-se que entre os extratos testados, apenas os preparados a partir das folhas como o hidroalcolico (FE) e acetônico (FA) apresentaram atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas. Como os extratos FrE, FrA, SE e SA não apresentaram atividade antimicrobiana, os mesmos não constam na **Tabela 03**.

Tabela 03 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM), em mg/mL, das microextrações EtOH/H₂O (FE) e acetônico (FA) das Folhas de “Melão-de-são-caetano”.

Microrganismo	Extratos das Folhas		
	FE	FA	
	CIM	CIM	CLM
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	0,5	0,25	-
<i>S. aureus</i> CCBH 5330	-	0,125	2,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	2,0	1,0	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	2,0	2,0

FE: extrato hidroalcolico/etanol/H₂O (7:3); FA: extrato acetônico; das folhas.

5.5.2 Ensaio microbiológico dos extratos das folhas obtidas por maceração e frações do extrato B

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e frações das folhas foi expressa em valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal mínima (CLM) frente a cada micro-organismo. Os CIM mais baixos foram para extrato acetona frente bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* CCBH5330 (ORSA), não houve atividade para as bactérias Gram-negativas *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumoniae* ATCC100031. O extrato fluído deu um CIM de 2.000 mg/mL só para *S. aureus* ATCC 6538P. Os extratos etanol não possui atividade antibacteriana ou antifúngica.

Além disso, o extrato acetona apresentou atividade antifúngica frente a *C. albicans* ATCC 10231 (CIM = 2.000 mg/mL), **Tabela 04**. Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem o inóculo foram adequados.

Tabela 04 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CLM) em mg/mL dos extratos das folhas de *M. charantia*.

Microrganismo/fungo	Extrato A (Extrato EtOH alcali)		Extrato B (Extrato Acetona)		Extrato C (Extrato EtOH)		Extrato F (Extrato fluido)	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
St. aureus ATCC6538P	-	-	0,250	-	-	-	2,000	-
St. aureus CCBH5330 (ORSA)	-	-	0,125	2,000	-	-	-	-
E. coli ATCC 10536	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps. aeruginosa ATCC 9027	-	-	-	-	-	-	-	-
K. pneumoniae ATCC 10031	-	-	-	-	-	-	-	-
C. albicans ATCC 10231	-	-	2,000	2,000	-	-	-	-

A

ativi
dade
anti
micr
obia
na e
antif
úngi

ca para as partições líquido-líquido do extrato acetona, foram mais baixas para a fração FB2 com a CIM e CLM (0,500 mg/mL) frente bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* CCBH5330 (MRSA) e *C. albicans*, as outras bactérias foram resistentes as frações. A fração FB4 não apresentou atividade inibitória para os micro-organismos testados, **Tabela 05**.

Tabela 05 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração letal mínima (CLM) em mg/mL das partições do extrato acetona (B) de folhas de *M. charantia*.

Microrganismo/fungo	FB1		FB2		FB3		FB4		FB1 : fraç ão hexa no, FB2 : fraç ão
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	
St. aureus ATCC6538P	2.000	2.000	0.500	0.500	1.000	1.000	-	-	
St. aureus CCBH5330 (ORSA)	2.000	2.000	0.500	0.500	1.000	1.000	-	-	
E. coli ATCC 10536	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ps. aeruginosa ATCC 9027	-	-	-	-	-	-	-	-	
K. pneumoniae ATCC 10031	-	-	-	-	-	-	-	-	
C. albicans ATCC 10231	-	-	0.500	0.500	-	-	-	-	

diclorometano, FB3: fração clorofórmio, FB4: fração aquosa

5.6 Ensaio do sinergismo ou efeito modulador na ação antimicrobiana (Checkerboard)

A partir do ensaio de *Checkerboard*, observou-se que a fração FB2 apresentou efeito sinérgico ($ICIP \leq 0,5$) quando associado a todos os antimicrobianos testados, com exceção da vancomicina, no qual apresentou efeito aditivo ($ICIP > 0,5$ e < 1.0) em *S. aureus ATCC 6538P* e *S. aureus CCBH5330 (ORSA)*. A fração FB3 também apresentou sinergismo quando associada a todos os fármacos, exceto, com ceftriaxona em *S. aureus ATCC 6538P* e com vancomicina em *S. aureus CCBH5330 (ORSA)*, nas quais ocorreu efeito aditivo. O extrato FB só apresenta efeito de sinergismo com ciprofloxacina em *S. aureus ATCC 6538P* e aditivo com os demais antimicrobianos, mas a ação sobre *S. aureus CCBH 5330 (ORSA)* foi sinérgica com as duas cefalosporinas, que mostram um $ICIF > 0,5$, **Tabelas 06 ao 13**.

Tabela 06 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* ATCC 6538P.

Antibiótico	[FB2]	CIM FB2	CIF FB2	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	0,128	0,512	0,25	0,0488	0,1953	0,25	0,5	SINÉRGICO
Amicacina	0,128	0,512	0,25	0,1953	3,125	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Meropenem	0,128	0,512	0,25	0,0030	0,0488	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Vancomicina	0,256	0,512	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	0,128	0,512	0,25	0,0030	0,0488	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,128	0,512	0,25	0,3906	3,125	0,125	0,375	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,064	0,512	0,125	0,0488	0,3906	0,125	0,25	SINÉRGICO

[FB2]: CIM da fração B2 na associação (mg/mL); CIM FB2: CIM da fração B2 isolada (mg/mL);

CIF FB2 = [FB2] /CIM FB2;

[ATB]: CIM dos antibióticos na associação (µg/mL); CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados (µg/mL);

CIF ATB = [ATB]/CIM ATB;

ICIF = CIF FB2 + CIF ATB;

ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

Tabela 07 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* CCBH 5330.

Antibiótico	[FB2]	CIM FB2	CIF FB2	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	0,064	0,512	0,125	3,125	25	0,125	0,25	SINÉRGICO
Amicacina	0,128	0,512	0,25	0,0488	0,7812	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Meropenem	0,064	0,512	0,125	0,3906	3,125	0,125	0,25	SINÉRGICO
Vancomicina	0,256	0,512	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	0,128	0,512	0,25	0,3906	6,25	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,064	0,512	0,125	12,5	50	0,25	0,375	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,064	0,512	0,125	6,25	25	0,25	0,375	SINÉRGICO

Tabela 08 - Efeito modulador da fração FB3 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* ATCC 6538P

Antibiótico	[FB3]	CIM FB3	CIF FB3	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	0,128	1,024	0,125	3,125	25	0,125	0,25	SINÉRGICO
Amicacina	0,512	1,024	0,5	0,0488	0,7812	0,0625	0,5625	ADITIVO
Meropenem	0,256	1,024	0,25	0,1953	3,125	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Vancomicina	0,512	1,024	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	0,128	1,024	0,125	0,3906	6,25	0,0625	0,1875	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,256	1,024	0,25	6,25	50	0,125	0,375	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,064	1,024	0,0625	6,25	25	0,25	0,3125	SINÉRGICO

Tabela 09 - Efeito modulador da fração FB3 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* CCBH 5330.

Antibiótico	[FB3]	CIM FB3	CIF FB3	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	0,128	1,024	0,125	3,125	25	0,125	0,25	SINÉRGICO
Amicacina	0,512	1,024	0,5	0,0488	0,7812	0,0625	0,5625	ADITIVO
Meropenem	0,256	1,024	0,25	0,1953	3,125	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Vancomicina	0,512	1,024	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	0,128	1,024	0,125	0,3906	6,25	0,0625	0,1875	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,256	1,024	0,25	6,25	50	0,125	0,375	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,064	1,024	0,0625	6,25	25	0,25	0,3125	SINÉRGICO

Tabela 10 - Efeito modulador da fração FB1 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* ATCC 6538P.

Antibiótico	[FB1]	CIM	CIF	[ATB]	CIM	CIF	ICIF	EFEITO
		FB1	FB1		ATB	ATB		
Oxacilina	1,024	2,048	0,5	0,0122	0,1953	0,0625	0,5625	ADITIVO
Amicacina	1,024	2,048	0,5	0,1953	3,125	0,0625	0,5625	ADITIVO
Meropenem	-	2,048	-	-	0,0488	-	-	-
Vancomicina	1,024	2,048	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	-	2,048	-	-	0,0488	-	-	-
Ceftriaxona	1,024	2,048	0,5	0,7812	3,125	0,25	0,75	ADITIVO
Ciprofloxacina	0,512	2,048	0,25	0,0976	0,3906	0,25	0,5	SINÉRGICO

Tabela 11 - Efeito modulador da fração FB1 na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).

Antibiótico	[FB1]	CIM	CIF	[ATB]	CIM	CIF	ICIF	EFEITO
		FB1	FB1		ATB	ATB		
Oxacilina	0,512	2,048	0,25	6,25	25	0,25	0,5	SINÉRGICO
Amicacina	1,024	2,048	0,5	0,0976	0,7812	0,125	0,625	ADITIVO
Meropenem	1,024	2,048	0,5	0,1953	3,125	0,0625	0,5625	ADITIVO
Vancomicina	1,024	2,048	0,5	0,0976	1,5625	0,0625	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	0,512	2,048	0,25	0,3906	6,25	0,0625	0,3125	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,512	2,048	0,25	12,5	50	0,25	0,5	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,256	2,048	0,125	6,25	25	0,25	0,375	SINÉRGICO

Tabela 12 - Efeito modulador do extrato FB na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* ATCC 6538P.

Antibiótico	[B]	CIM B	CIF B	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	0,064	0,256	0,25	0,0976	0,1953	0,5	0,75	ADITIVO
Amicacina	0,016	0,256	0,0625	1,5625	3,125	0,5	0,5625	ADITIVO
Meropenem	0,128	0,256	0,5	0,0122	0,0488	0,25	0,75	ADITIVO
Vancomicina	0,016	0,256	0,0625	0,7812	1,5625	0,5	0,5625	ADITIVO
Cefalotina	-	0,256	-	-	0,0488	-	-	-
Ceftriaxona	0,128	0,256	0,5	0,7812	3,125	0,25	0,75	ADITIVO
Ciprofloxacina	0,064	0,256	0,25	0,0488	0,3906	0,125	0,375	SINÉRGICO

Tabela 13 - Efeito modulador do extrato B na ação de antimicrobianos sobre *S. aureus* CCBH 5330 (ORSA).

Antibiótico	[B]	CIM B	CIF B	[ATB]	CIM ATB	CIF ATB	ICIF	EFEITO
Oxacilina	-	0,128	-	-	25	-	-	-
Amicacina	-	0,128	-	-	0,7812	-	-	-
Meropenem	-	0,128	-	-	3,125	-	-	-
Vancomicina	0,064	0,128	0,5	0,1953	1,5625	0,125	0,625	ADITIVO
Cefalotina	0,016	0,128	0,125	1,5625	6,25	0,25	0,375	SINÉRGICO
Ceftriaxona	0,032	0,128	0,25	12,5	50	0,25	0,5	SINÉRGICO
Ciprofloxacina	0,064	0,128	0,5	1,5625	25	0,0625	0,5625	ADITIVO

O efeito modulador do extrato B, na ação de antifúngicos só apresentou efeito sinérgico com miconazol e aditivo com ciclopirox e nistatina em *C. albicans* ATCC 10231, **Tabelas 14 e 15**.

Tabela 14 - Efeito modulador do extrato B na ação de antifúngicos sobre *C. albicans* ATCC 10231.

Antifúngico	[B]	CIM B	CIF B	[ATF]	CIM ATF	CIF ATF	ICIF	EFEITO
Ciclopirox	1,024	2,048	0,5	0,0048	0,078	0,0625	0,5625	ADITIVO
Nistatina	1,024	2,048	0,5	0,3125	5	0,0625	0,5625	ADITIVO
Miconazol	0,256	2,048	0,125	0,3906	6,25	0,0625	0,1875	SINÉRGICO

Tabela 15 - Efeito modulador da fração FB2 na ação de antifúngicos sobre *C. albicans* ATCC 10231.

Antifúngico	[FB2]	CIM FB2	CIF FB2	[ATF]	CIM ATF	CIF ATF	ICIF	EFEITO
Ciclopirox	-	0,512	-	-	0,078	-	-	-
Nistatina	-	0,512	-	-	5	-	-	-
Miconazol	0,064	0,512	0,125	0,3906	6,25	0,0625	0,1875	SINÉRGICO

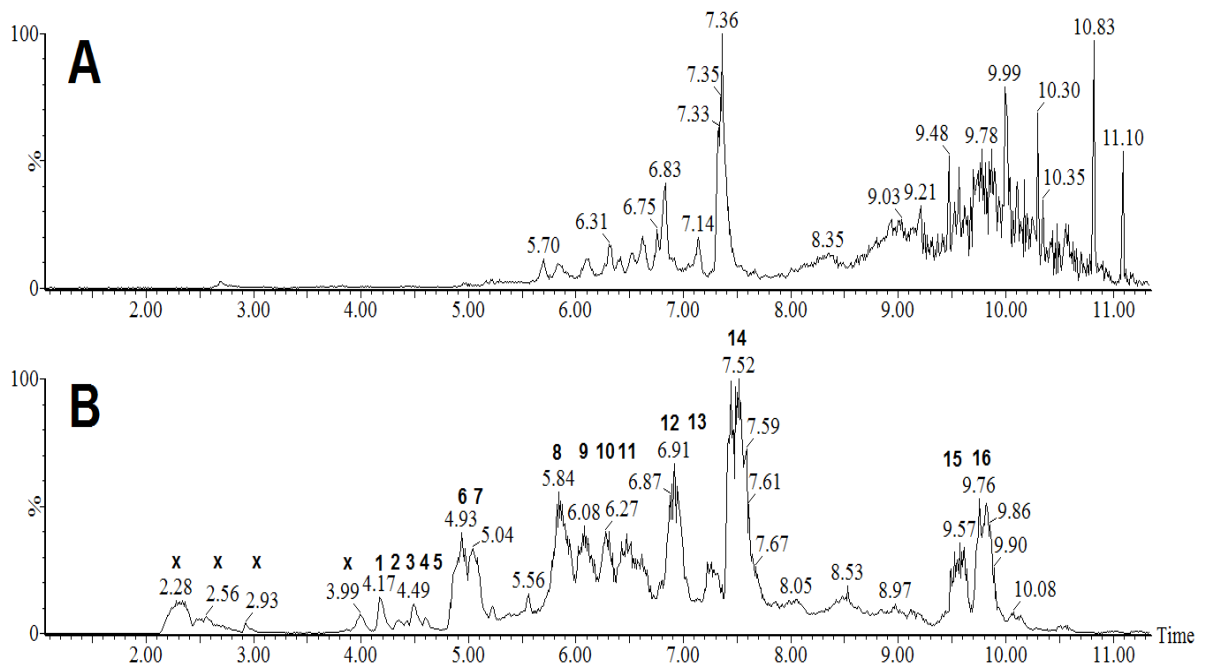
ETAPA III - ANÁLISE EXPLORATÓRIA EM UPLC POR PARTIÇÃO LIQUIDO-LIQUIDO DOS EXTRATOS ATIVOS (em microextrações)

5.7 Identificação dos constituintes químicos dos extratos hidroalcoólico e acetônico (FE e FA) ativos

Os cromatogramas de UPLC-QToF-ESI-MS realizados a os dos extratos FA e FE (Figura 13) que resultaram ativos na ação antimicrobiana, obtidos no modo de ionização positivo (+) são mostrados na Figura 13, A e B, respectivamente. Os compostos caracterizados estão resumidos na Tabela 16 com os dados relevantes, incluindo tempo de retenção, massa experimental e m/z calculado, fórmula molecular, erro em ppm fornecido pelo software e os fragmentos iônicos de MS/MS. O perfil químico dos extratos proporcionou a identificação experimental de 14 compostos. Estes são um aminoácido, quatro flavonóides e nove derivados de triterpenóides, todos eles descritos por autores principalmente da Ásia na espécie *Momordica charantia* L

Figura 13 - Cromatogramas em UPLC-ESI-QT de MS, FA (A) e FE (B), dos extratos das folhas de *Momordica charantia* obtidos no modo de ionização positiva.

Picos com "X" são impurezas.



FA: Extrato acetona, FE: Extrato etanólico

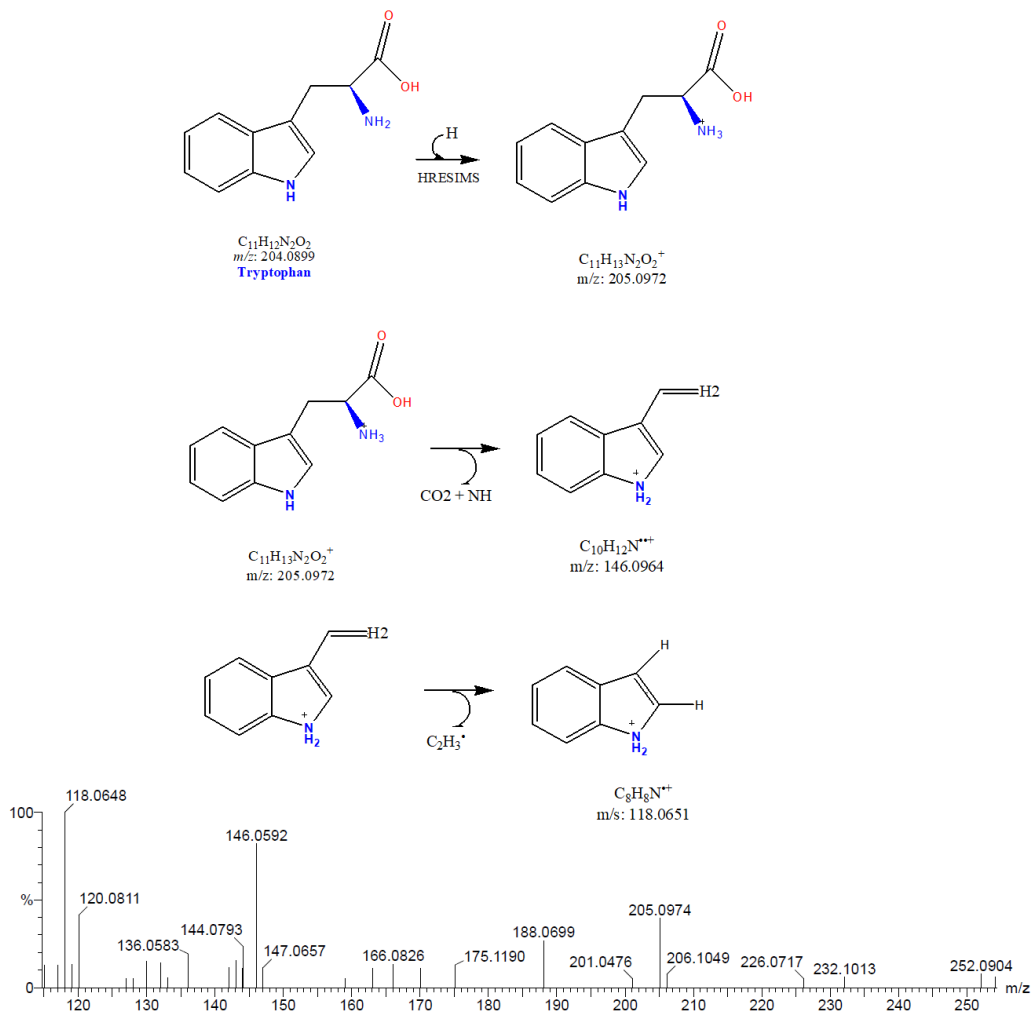
Tabela 16 - Identificação dos constituintes químicos das microextrações hidroetanólica (FE) e acetonónica (FA) das folhas de *Momordica charantia* por UPLC-QToF-ESI-MS.

Peak	Rt min	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ Observed	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	FE	FA	Ref
1	4.17	205.0974	205.0977	146.0581, 130.0630	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	-1.5	Tryptophan	x	-	THIELE <i>et al.</i> , 2008
2	4.35	465.1028	465.1033	303.0482	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	3.0	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	x	-	SVOBODOVA <i>et al.</i> , 2017. 58
3	4.49	465.1031	465.1033	303.0475	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-0.4	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	x	x	SVOBODOVA <i>et al.</i> , 2017
4	4.52	449.1071	449.1084	303.0463	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.9	Quercetin- <i>O</i> -rhamnoside	x	x	SVOBODOVA <i>et al.</i> , 2017
5	4.60	449.1101	449.1084	287.0553	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	3.8	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside	x	x	SVOBODOVA <i>et al.</i> , 2017
6	4.93	805.5035	805.5043	787.4910, 614.4079, 175.1103	C ₅₂ H ₆₉ O ₇	-1.0	Unknown	x	-	-
7	5.03	769.4990	769.4985	333.1419, 175.1169	C ₅₆ H ₆₅ O ₂	0.6	Unknown	x	-	-
8	5.84	437.3416	437.3420	419.3296, 409.3452, 391.3345, 109.1014	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	-0.9	Hydroxycucurbitatetraen al isomer	x	x	HSU <i>et al.</i> , 2011. 59
9	6.08	437.3431	437.3420	419.3287, 409.3463, 391.3387, 109.1014	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	2.5	Hydroxycucurbitatetraen al isomer	x	x	HSU <i>et al.</i> , 2011
10	6.27	437.3434	437.3420	419.3312, 409.3437, 391.3375, 109.1018	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	3.2	Hydroxycucurbitatetraen al isomer	x	x	HSU <i>et al.</i> , 2011
11	6.47	629.3694	629.3690	437.3415, 419.3294, 409.3463, 391.3355, 109.1007	C ₃₆ H ₅₃ O ₉	0.6	Oleanane- triterpenoid saponin	x	x	FAN <i>et al.</i> , 2019. 60

12	6.91	455.3530	455.3525	437.3390, 419.3274, 409.3472, 391.3347, 109.1015	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	1.1	Epoxycurcubitatrienediol isomer	x	x	PITCHAKARN <i>et al.</i> , 2012; ²² CHEN J-C <i>et al.</i> , 2009 ⁶¹
13	7.26	581.3458	581.3454	541.3593, 523.3411, 495.3528, 437.3424, 409.3545, 391.3351, 109.1007	C ₃₃ H ₅₀ O ₇ Na	0.7	3-[(5-formyl-7β,25- dihydroxymethoxycucur bita-5,23-dien-3-yl)oxy]- 3-oxopropanoic acid isomer	x	x	TUAN <i>et al.</i> , 2017 ⁶²
14	7.52	455.3524	455.3525	437.3441, 419.3340, 409.3443, 391.3333, 109.0996	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	-0.2	Epoxycurcubitatrienediol isomer	x	x	HSU <i>et al.</i> , 2011 ⁵⁹ , WANG <i>et al.</i> , 2012 ⁶³
15	9.57	477.3376	477.3376	437.3398, 419.3287, 391.3346, 109.0984	C ₃₂ H ₄₅ O ₃	1.5	Unknown	x	x	-
16	9.76	525.3571	525.3580	493.3336, 437.3434, 419.3293, 391.3380, 109.1009	C ₃₃ H ₄₉ O ₅	-1.7	Unknown	x	x	-

O triptofano foi identificado pelo íon precursor em m/z 205 ($C_{11}H_{13}N_2O_2$) e pelo fragmento característico em m/z 118 (núcleo indol), **figura 14** (THIELE *et al.*, 2008).

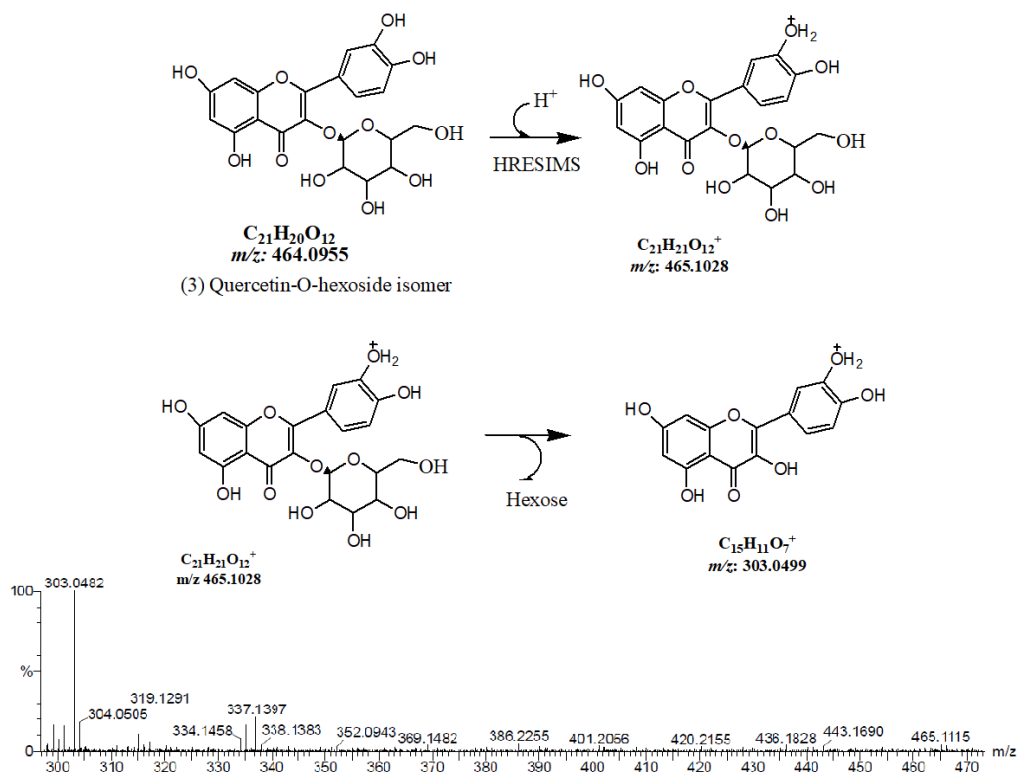
Figura 14 - Proposta de Fragmentação do Triptofano no MS/MS



Os isômeros de quercetina-O-hexosídeo mostraram um íon precursor em m/z 465 ($C_{21}H_{21}O_{12}$) e um os íons característicos do produto em m/z 303, fragmento chave da quercetina aglicona, resultado da perda da unidade de glicose, **figura 15**. Além disso, a quercetina-O-ramnósido mostra um íon precursor típico m/z 449 ($C_{21}H_{21}O_{11}$) e o fragmento

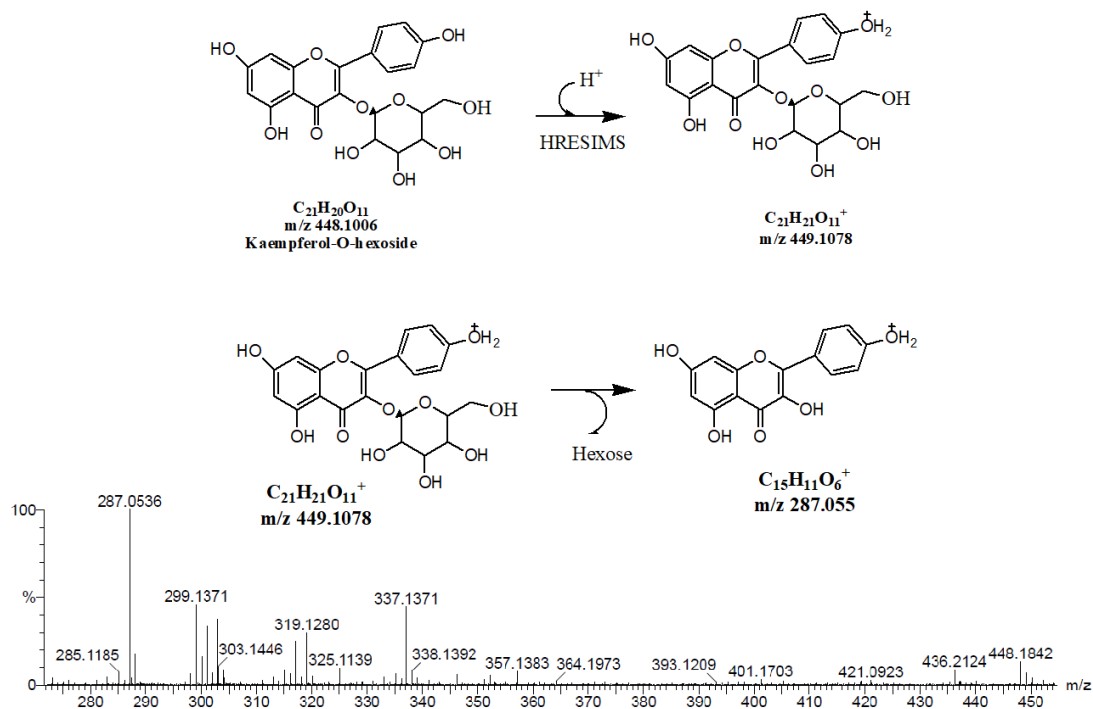
característico em m/z 303, perda de ramnose, compostos também identificados em *M. charantia*, (SILVEIRA; MENDEZ, 2014; SVOBODOVA *et al.*, 2017; YASIR *et al.*, 2016).

Figura 15 - Fragmentação dos isômeros Quercetin-*O*-hexoside



O Kaempferol-*O*-hexosido mostrou um fragmento iônico precursor em m/z a 449 ($C_{21}H_{21}O_{11}$), com um fragmento chave do núcleo do kaempferol a m/z 287 indicado pela perda de uma hexose, **figura 16**. Estudos anteriores identificaram esses compostos em *M. charantia* (SVOBODOVA *et al.*, 2017; MADALA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2015; CHEN Y *et al.*, 2015); e em frutos de *Rhus coriaria L.* (Sumac) (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

Figura 16 - Fragmentação dos isômero Kaempferol-*O*-hexoside



Os triterpenos do tipo curburbitano foram identificados devido às perdas de H_2O (18 Da), CO (28 Da) e também devido a um fragmento de íon diagnóstico em m/z 109, resultante da quebra da ligação C17-20. Assim, os isômeros hidroxycurbitatetraenais foram identificados pelo íon precursor em m/z 437 ($C_{30}H_{45}O_2$) e seus produtos iônicos em m/z 419, 409, 391, 109. Um exemplo desse padrão de fragmentação ocorre com a 3β -hidroxycurbita-5(10),6,22(E),24-tetraen-19-ol, **figura 17**, relatado anteriormente em *M. charantia*, HSU *et al.*, 2011, WANG *et al.*, 2012; YASIR *et al.*, 2016; MADALA *et al.*, 2016; CHANG *et al.*, 2006).

Os isômeros epóxi apresentaram oxigênio adicional (16 Da) e o mesmo padrão de fragmentação. A **figura 18** representa a fragmentação do MS para 5β , 19-epoxicurbita-6,22(E),24-trieno-3 β , 19-diol (HSU *et al.*, 2011; CHEN J-C *et al.*, 2009) e 3-[(5-formil-7 β ,25-di-hidroximetoxicurbita-5,23-dien-3-il)oxi]-3-oxopropanóico ácido (TUAN *et al.*, 2017), **figura 19**.

Figura 17 - Fragmentação do 3 β -hydroxycucurbita-5 (10),6,22(E),24-tetraen-19-al.

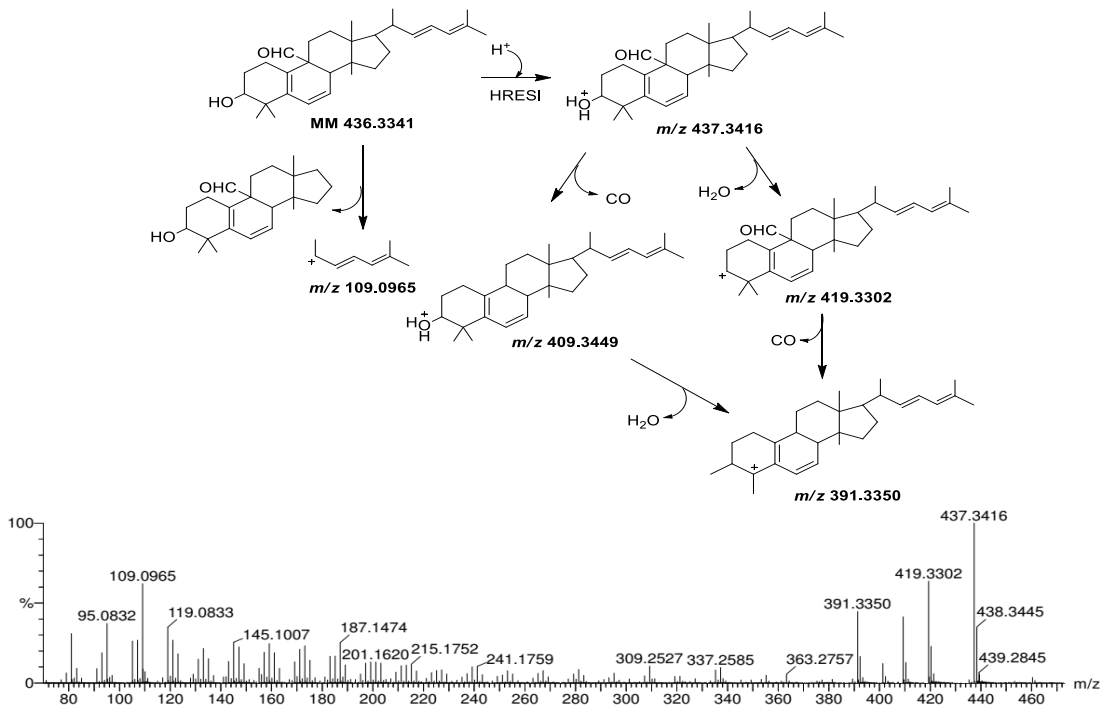


Figura 18 - Fragmentação do 5 β , 19-epoxycucurbita-6, 22 (E), 24-triene-3 β , 19-diol

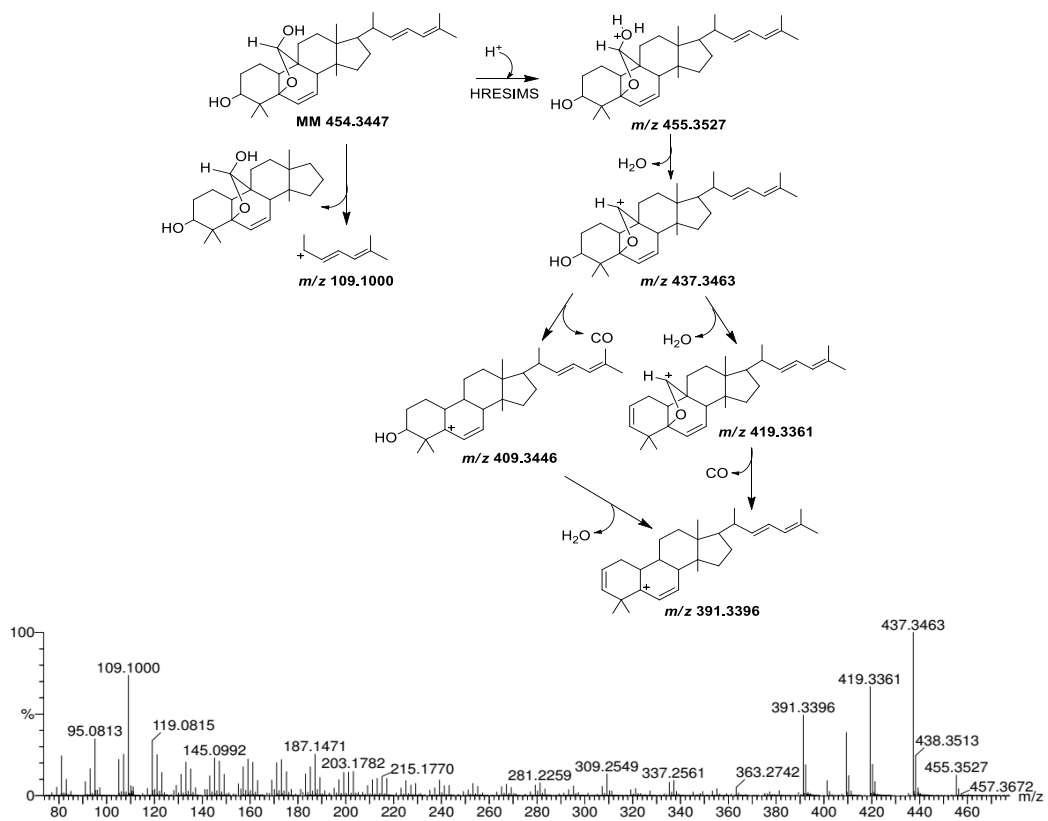
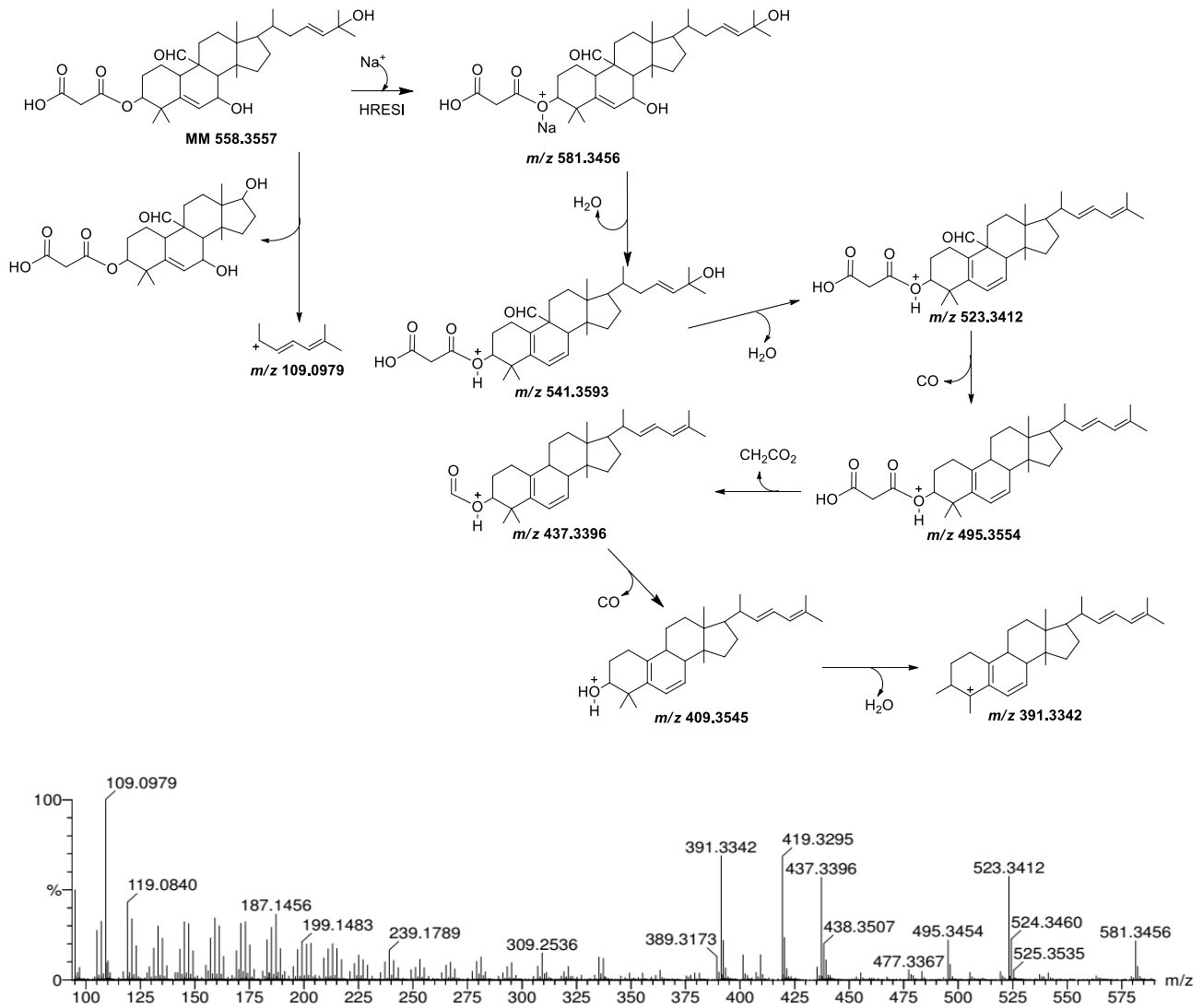


Figura 19 - Fragmentação do ácido 3 -[(5-formil-7 β , 25-di-hidroximetoxicucurbita-5, 23-dien-3-il) oxil]-3-oxopropanóico.



6 DISCUSSÃO

Percebe-se que as folhas de *Momordica charantia L.* das variedades macrocarpa e microcarpa apresentam características macroscópicas e microscópicas comuns, diferindo apenas no tamanho das folhas, como mostrado no “xeroexsicate” da figura 9, sendo estas características semelhantes às descritas por Bai e Beey (2002) em *Momordica charantia L.* das variedades charantia e muricata; e Zocoler et al (2006), em folhas de Melão-de-São Caetano. Quanto às características micromorfológicas, de ambas as variedades, os tricomas são multicelulares, mas são menos freqüentes e mais curtos na variedade macrocarpa, sendo mais longos na variedade microcarpa.

Na abordagem fitoquímica das folhas de *Momordica charantia L.* da variedade microcarpa, Zocoler et al, (2006), relataram não ter detectado a presença de alcalóides. Cabe ressaltar que os alcalóides detectados no presente estudo foram revelados com os reagentes de Dragendorff, Hager e Mayer, destacando o odor característico do fumo nos extratos indicando a presença desta classe química, Tabela 1. Os mesmos metabólitos secundários foram encontrados nas frações da planta de *M. charantia* coletada no nordeste do Brasil, por Costa et al, (2011). Abalaka et al, (2010), também encontraram alcalóides, taninos, esteróides e glicosídeos cardíacos em 3 diferentes frações de *M. Charantia L.* coletada na África.

A determinação estrutural da momordicina II, substância isolada como MSC, como um sólido branco amorfo, utilizando para a análise comparativa dos dados espectrais de momordicina I (Mo-1) é momordicina II (Mo-2), Tabela 2, que nos leva a concluir que a substância codificada como MSC $C_{36}H_{58}O_9$ é o triterpeno tetracíclico glicosilado ($3\alpha, 7\beta, 23\beta$ -tri-hidroxi-cucurbita-5,24-dien-19 α)-23-O- β -glucopiranosídeo), cujo nome vernacular é momordicina II, estrutura semelhante àquela encontrada em plantas de *M. Charantia L.* de origem asiática, por outros autores (YASUDA, *et al.*, 1984, PUSPAWATI, 2008; LING *et al*, 2008; MEKURIA *et al.*, 2006).

Dos seis extratos obtidos das folhas, frutos e sementes por processo de microextração, os únicos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana significativa foram os das folhas, que são FE e FA, e, portanto, os dados para extratos sem atividade não foram mostrados na Tabela 3. A atividade antimicrobiana de FE e FA foi detectada contra quatro dos cinco isolados bacterianos e fúngicos clinicamente importantes usados neste estudo. O maior efeito foi observado para o extrato de acetona (FA). De acordo com Aligiannis et al.

(2001), valores de CIM <0,5 mg/mL são considerados inibidores potentes; CIMs entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; e CIM > 1,6 mg / mL são inibidores fracos. Assim, o extrato de FA é um potente inibidor em cepas de *S. aureus*, moderado em *S. epidermidis* e fraco em leveduras (*C. albicans*).

As atividades antibacterianas de extratos e frações preparadas a partir de diferentes partes de *M. charantia* foram relatadas em várias partes do mundo (ABALAKA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011; MAIA *et al.*, 2008; ARRUDA *et al.*, 2010; MAHOMOODALLY *et al.*, 2010). As partes com relatos de atividades antimicrobianas incluem frutas, sementes, folhas e caules. No entanto, é interessante notar que a comparação baseada em relatos da literatura é difícil com base em vários motivos. Às vezes, as concentrações mínimas empregadas são superiores a 10 vezes a concentração máxima que empregamos ou até mesmo difíceis de deduzir (ARRUDA *et al.*, 2011); MAHOMOODALLY *et al.*, 2010; em outros). As concentrações não foram declaradas, mas a atividade declarada (YALDIZ *et al.*, 2015) e parece não haver um critério claro para relatar extratos de plantas em atividades antimicrobianas em muitos casos, e além disso, os solventes ou os métodos empregados são completamente diferentes (MAHOMOODALLY *et al.*, 2010; YALDIZ *et al.*, 2015; MWAMBETE 2009).

Nesta base, a verdadeira comparação das atividades relatadas em *M. charantia* de diferentes partes do mundo parece ser uma tarefa assustadora e muito difícil. No caso de divergências nas atividades relatadas para as plantas com métodos similares utilizados, as diferenças nas atividades relatadas podem ser devido a um ou à combinação dos seguintes motivos: variações nas estações das coletas, temperatura, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes, poluição atmosférica, danos mecânicos e ataques de patógenos (MEHTA *et al.*, 2013). Essas diferenças externas influenciam invariavelmente a composição e os níveis de metabólitos secundários importantes dos materiais vegetais empregados nesses diferentes estudos, além das variações relacionadas às abordagens metodológicas nos ensaios antimicrobianos (LLORACH *et al.*, 2008).

O extrato de FE, por outro lado, é um potente inibidor de cepas de *S. aureus*, mas moderado em *S. epidermidis*. As diferenças observadas no potencial antimicrobiano entre os extratos de FA e FE nas cepas de *Staphylococcus* podem ser devido às diferenças na composição dos metabólitos de ambos os extratos. Algumas cucurbitacinas demonstraram ter atividades antibacterianas *in vitro* (SRIVASTAVA *et al.*, 2013; MEHTA *et al.*, 2013; AERI

et al., 2015; RECIO, *et al.*, 2012). Uma excelente revisão sobre cucurbitacinas e seus derivados foi feita por Jian *et al.* 2005; o leitor interessado acharia a resenha interessante.

No ensaio microbiológico dos 04 diferentes extratos das folhas obtidas por maceração frente a microrganismos gram-positivas, gram-negativas, e fungo *C. albicans*, só os extratos B e F resultaram em ativos frente a *S. aureus ATCC 6538P* com a CIM de 0.250 mg/mL e 2.0 mg/mL, respetivamente, além o extrato B, deu um CIM mais baixo (0.125 mg/mL) e um CLM de 2.0 mg/mL frente a *S. aureus CCBH5330 (ORSA)*. Não houve atividade contra as bactérias Gram-negativas *E. coli ATCC 10536*, *P. aeruginosa ATCC 9027*, *K. pneumoniae ATCC100031*. Os extratos etanolicos não apresentaram atividade antibacteriana ou antifúngica. Só o extrato acetona apresentou atividade antifúngica frente a *C. albicans ATCC 10231*, com um CIM e CLM = 2.0 mg/mL, **Tabela 4**.

Esta atividade diferenciada do extrato B estimulou para avaliar atividade antimicrobiana de suas respetivas partições: hexano FB1, diclorometano FB2, clorofórmio FB3 e da fração aquosa FB4, sendo a fração FB2 a que deu o CIM e CLM mais baixo (0.5 mg/mL) frente as cepas de *S. aureus ATCC 6538P* e *S. aureus CCBH5330 (ORSA)* e *C. albicans*, seguida das frações FB3 y FB1 que deram um CIM e CLM de 1,0 e 2,0 mg/mL respetivamente para as mesmas bactérias Gram-positivas. As outras bactérias foram resistentes a estas frações. A fração aquosa FB4 não apresentou atividade inibitória para os micro-organismos testados, **Tabela 5**.

De acordo com os resultados obtidos o extrato B e a sua fração FB2 das folhas de *M. charantia* são inibidores potentes (CIM \leq 0.5 mg/mL), a fração FB3 e inibidor moderado e a fração FB1 e um inibidor fraco frente *S. aureus ATCC 6538P* e *S. aureus CCBH5330 (ORSA)*. Também o extrato B pode-se considerar um inibidor fraco (CIM=2,0mg/mL) para *C. albicans ATCC 10231*, mas a fração FB2 um inibidor potente (CIM=0.500), possivelmente devido à maior concentração dos constituintes antifúngicos ativos no processo extrativo de partição. Resultados semelhantes obtiveram (Costa *et al.*, 2011), em linhagem de *S. aureus* (CIM \leq 0.512 mg/mL), mas diferentes em quanto a bactéria *E. coli*, que obtiveram atividade potente (MIC \leq 0.512 mg/mL). Porém, Mahomoodally *et al.*, (2010), não obtiveram efeito inibidor frente aos *S. aureus*, mas sim efeito contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* com CIM $>$ a 2 mg/mL e também contra *C. albicans* com CIM = 3 mg/mL.

As diferenças na atividade antibacteriana do extrato B (CIM= 0,125 mg/mL) e suas respetivas frações FB2 (CIM=0,50 mg/mL), FB3 (CIM=1,0 mg/mL) e FB1 (CIM= 2.0

mg/mL) frente ao *S. aureus*, permitem afirmar que houve uma diminuição gradativa da bioatividade entre elas, sendo mais ativa o extrato B. Alguns fatores relacionados com a perda de atividade poderiam se relacionar no processo de partição com a separação de substâncias bioativas que poderiam cumprir um efeito sinérgico influenciando na atividade antimicrobiana (PAULETTI *et al.*, 2003). No entanto, na ação antifúngica, ocorreu o efeito oposto, menor (CIM=0,50 mg/mL) na fração FB2 em relação ao extrato bruto B (CIM= 2,0 mg/mL), este efeito pode ser devido à maior concentração de substâncias bioativas na amostra fracionada (FB2), uma vez que as outras frações FB3 e FB4 da mesma amostra não apresentam atividade.

O método de microdiluição é uma técnica potencialmente útil para determinar CIMs de um grande número de amostras de teste. Suas vantagens sobre as técnicas de difusão incluem maior sensibilidade, usa pequenas quantidades de extrato, o que é importante se o antimicrobiano for escasso, como é o caso de muitos produtos naturais; permite utilizar mais de uma amostra e diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio, capacidade de distinguir entre efeitos bacteriostáticos e bactericidas; e determinação quantitativa do CIM (LANGFIELD *et al.*, 2004; NCUBE *et al.*, 2008).

Nos últimos anos o uso indiscriminado e constante dos antibióticos em pequenos intervalos de tempo condicionou os organismos infecciosos a se adaptarem aos medicamentos, tornando-os cada vez menos eficazes no tratamento de infecções bacterianas e levou ao surgimento e disseminação de cepas resistentes em humanos e animais. Combinações antibióticas têm sido usadas há muito tempo para fornecer atividade antibacteriana contra múltiplos patógenos potenciais para tratamento empírico inicial de pacientes criticamente enfermos (KUMAR, 2012). As bactérias clinicamente importantes são caracterizadas não apenas pela resistência única a medicamentos, mas também por múltiplas resistências aos antibióticos que é o legado do uso indevido de antimicrobianos (OMS, 2015).

A terapia combinada pode ser usada para expandir o espectro antimicrobiano, prevenir o surgimento de organismos resistentes, minimizar a toxicidade e obter atividade antimicrobiana sinérgica, é por isso que se considerou importante realizar o seguinte ensaio de Checkerboard com as amostras que deram atividade antimicrobiana importante neste ensaio, em associação aos antibióticos importantes.

O método Checkerboard é um ensaio *in vitro* o qual analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano

(JACKSON *et al.*, 2009). Usando este método se avaliou o sinergismo ou efeito modulador na ação de antimicrobianos, do extrato acetona (B) e suas frações FB1, FB2 e FB3, as quais deram efeito antimicrobiano potente e moderado contra *S. aureus ATCC 6538P* e *S. aureus CCBH5330* (ORSA), usando suas concentrações de CIM, em combinação com as CIM dos antimicrobianos oxacilina, amikacina, meropenem, vancomicina, cefalotina, ceftriaxona e ciprofloxacina, em proporções sereadas que diminuem desde 1/2 até 1/16 do seu valor do CIM. Os resultados obtidos são importantes uma vez que quando testados em combinação (extratos e/ou frações com antimicrobianos) observou-se um melhoramento das ações de ambos. Com os valores obtidos determinou-se o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) e a concentração inibitória fracionada (CIF), para avaliar o tipo de interação seguindo a classificação descrita por EUCAST, (2003), de sinergismo, aditivo ou antagonismo.

A adição de FB2 a metade do sua CIM (0,5 mg / mL) no meio produz uma redução drástica na CIM dos antibióticos oxacilina (0.0488 µg/mL), amicacina ((0.1953 µg/mL), meropenem (0.0030 µg/mL), cefalotina (0.0030 µg/mL), ceftriaxona (0.3906 µg/mL) e ciprofloxacina (0.0488 µg/mL) até 1/16 do seu valor, demonstrando um efeito sinérgico entre eles contra *S. aureus* e *S. aureus* ORSA, por dar um ICIF ≤ 0.5 . No entanto, na combinação com vancomicina foi observado como apenas um efeito aditivo (**Tabelas 6 e 7**).

A adição de FB3 à CIM (1,0 mg / mL) no meio também produz uma redução drástica na CIM dos antibióticos oxacilina, amicacina, meropenem, cefalotina, ceftriaxona e ciprofloxacina até 1/16 do seu valor, demonstrando um efeito sinérgico entre eles contra *S. aureus* e *S. aureus* ORSA, por dar um ICIF ≤ 0.5 . No entanto, na combinação com amicacina e vancomicina frente ao *S. aureus* ORSA, foi observado como apenas um efeito aditivo ICIF ≥ 0.5 , (**Tabelas 8 e 9**). As frações FB1 e o extrato B, tiveram maiormente efeitos aditivos, mas efeitos sinérgicos com oxacilina, cefalotina, ceftriaxona e ciprofloxacina frente a *S. aureus* ORSA, (**Tabelas 10 a 13**).

O efeito modulador do extrato B e a fração FB2 frente aos antifúngicos foi sinérgica para miconazol em ambos, com uma diminuição do CIM ao valor de 1/16 em *C. albicans* ATCC 10231, mas a combinação do extrato B com ciclopirox e nistatina só deu um efeito aditivo, mas os CIM dos antifúngicos diminuí também ao 1/16, (**Tabelas 14 e 15**).

Estudos de interação sinérgica de produtos naturais de *M. charantia* foram relatados para drogas antidiabéticas metformina e glibenclamida (TONGIA *et al.*, 2004), anti-VIH (BOURINBAIAR, 1996), anticâncer por interação com Glicoproteína P (P-gp)

(PITCHAKARN *et al.*, 2012) e com aminoglicosídeos (COUTINHO *et al.*, 2010), e em fungos na associação de óleos essenciais com ketoconazol (SHIN *et al.*, 2004), mas na literatura revisada, nenhum estudo de produtos naturais de *M. charantia* foi relatado tendo efeito sinérgico com derivados da penicilina (oxacilina), carbapenames (meropenem), cefalosporinas (cefalotina e ceftriaxona) e Fluoroquinolonas (ciprofloxacina), nem com antifúngicos miconazol, ciclopirox ou nistatina, sendo este estudo um relato inédito para este espécime.

O levantamento bibliográfico dos usos etnomédicos na região nordeste do Brasil de *M. charantia* e seus metabólitos identificados revelou alguns achados interessantes. Apesar dos usos generalizados desses importantes alimentos e plantas medicinais, ainda faltam estudos pré-clínicos e clínicos rigorosos, particularmente para muitas de suas reivindicações etnomedicinais. De fato, não há usos medicinais sem suporte clínico (WHO, 2005). Também é surpreendente que algumas das atividades biológicas relatadas sejam anedóticas devido a fracos desenhos experimentais, entre outros. Por exemplo, alguns estudos relacionaram suas atividades biológicas usando soluções feitas a partir das partes das plantas sem declarar as concentrações ou doses utilizadas, o uso de solventes além dos utilizados nos usos etnomédicos, as partes utilizadas nos estudos e, algumas vezes, a via de administração dos extratos. As atividades mais pré-clinicamente comprovadas de *M. charantia* são suas atividades antidiabéticas e antineoplásicas (MAY M, 2016; DANDAWATE *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2017, GROVER, 2004; SANTOS *et al.*, 2010).

No presente estudo, demonstramos as atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos de folhas de *M. charantia* contra cepas bacterianas e fúngicas clinicamente importantes. Relatos semelhantes foram observados na literatura (ABALAKA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011; ARRUDA *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2010).

Para dar uma explicação plausível sobre a atividade observada e padronizar os extratos, realizamos estudos fitoquímicos nos dois extratos estudados no presente trabalho. Entre as estruturas identificadas por UPLC nos extratos de *M. charantia* de FE e FA, vários compostos derivados de flavonóides e muitos dos quais demonstraram possuir atividades antimicrobianas foram identificados na FE. No entanto, alguns desses constituintes não aparecem no extrato de FA, que apresentou melhor atividade antimicrobiana e antifúngica, sugerindo a existência de outros metabólitos que não foram identificados no presente trabalho

e que podem contribuir, pelo menos em parte, para o efeito antibacteriano e atividades antifúngicas observadas.

Nos resultados avaliação do sinergismo a modulação da ação dos antibióticos, a diminuição nas CIMs dos extratos e frações de *M. charantia* combinada com os antibióticos testados, gera um importante efeito sinérgico, e sugere que alguns componentes de *M. charantia* poderiam atuar como inibidores putativos na bomba de efluxo ao nível da bactéria ou fungo, ou modificando a permeabilidade da membrana o que poderia aumentar a atividade dos antibióticos que atuam dentro da célula (MAIA, *et al.*, 2008); como o Kuguacin J, um composto triterpenico relacionado e identificado como inibidor da P-gp, em ensaios de tratamento de cancros resistentes a múltiplos fármacos (JIAN-CHAO C *et al.*, 2009; PITCHAKARN *et al.*, 2012). No entanto, estudos são necessários para confirmar esse possível mecanismo. Isso também é importante porque significa que a dose terapêutica dos antimicrobianos, poderia ser muito menor e mais efetiva, quando combinados com extratos ou frações da *M. charantia*, no tratamento de infeções causadas por *S. aureus* clinicamente importantes, especialmente no ORSA, retardando assim o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos, melhorando o resultado da terapia, além de diminuir os efeitos adversos destes antimicrobianos, principalmente dos aminoglicosídeos e Fluoroquinolonas.

Até onde sabemos, não existem estudos químicos e biológicos suficientes para indicar as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana ou antifúngica de *M. charantia*.

Esses resultados demonstram ainda o potencial terapêutico dos extratos de *M. charantia* e exigem uma prospecção biológica e farmacológica adicional desta planta importante. Há necessidade de ensaios antimicrobianos *in vivo* para confirmar a atividade antimicrobiana potencial da planta e de seus constituintes fitoquímicos que ainda estão para ser submetidos a estudos biológicos/farmacológicos. De fato, a maioria de seus importantes compostos fitoquímicos não possui estudos biológicos ou farmacológicos. A maioria dos estudos sobre seus isolados concentra-se em atividades antidiabéticas e anticâncer. Além disso, faltam estudos sobre muitos de seus usos etnomédicos. Ademais, é necessário realizar estudos mecanísticos para determinar como *M. charantia* e/ou seus constituintes proporcionam a ação antimicrobiana observada aqui, como em muitos estudos.

7 CONCLUSÃO

Os parâmetros farmacognósticos e a identificação da momordicina II na variedade microcarpa, demonstra uma relação quimotaxonômica com a variedade macrocarpa, destacando as momordicinas como marcadores químicos da espécie.

O extrato hidroetanólico (FE) e acetônico (FA) de *M. charantia L.* do nordeste do Brasil, apresentaram diferentes padrões de ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e leveduras (*C. albicans*), que se acredita deve-se às diferenças na composição dos extratos, conforme demonstrado pela análise UPLC dos constituintes, demonstrando uma potencial atividade antibacteriana, particularmente contra microrganismos de importância clínica e cepas resistentes, além de ter uma atividade sinérgica quando é associado a antibióticos, contra bactérias multirresistentes como as cepas ORSA e em associações com antifúngicos contra *C. albicans*, reduzindo seu CIM até 1/16 vezes, o que é importante no retardo ao desenvolvimento de resistência bacteriana e na diminuição dos efeitos adversos destes antimicrobianos, principalmente dos aminoglicosídeos e Fluoroquinolonas.

O estudo é pioneiro na associação entre a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de cabaço amargo brasileiro (melão-de-são-caetano) e seus constituintes químicos. Além dos efeitos sinérgicos dos extratos desta variedade com antimicrobianos, penicilinas, carbapenames, cefalosporinas, fluoroquinolonas e antifúngico miconazol, são relatados pela primeira vez neste estudo. A variedade brasileira de *M. Charantia* pode ser um potencial agente terapêutico no tratamento de infecções clinicamente importantes.

São necessários estudos que avaliem os compostos isoladamente e em associação, bem como aqueles que investigam seus mecanismos de ação para elucidar esse efeito farmacológico.

8 REFERÊNCIAS

ABALAKA, M., ONAOLAPO, J., INABO, H., OLONITOLA, O. Antibacterial activity of chromatographically separated pure fractions of whole plant of *Momordica charantia* L (Cucurbitaceae). **Advances in environmental biology**, 4(3): 509-514. 2010.

ABU-REIDAH I.M., ALI-SHTAYEH, M.S., JAMOUS R.M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA C.A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive componentes from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry** 166. 2015. 179–191.

AERI V, KAUSHIK U, MIR S. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. **Pharmacogn Rev.** 2015; 9(17):12.

ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S, AND CHINOU B. **Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species.** J. Agric. Food Chem. 49, 2001. 4168–4170.

AHMED I, LAKHANI M, GILLET M, JOHN A, RAZA H. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice** 51: 155-161. 2001.

ANILA L, VIJAYALAKSHMI, N. Beneficial effects of flavonoids from *Sesamum indicum*, *Emblica officinalis* and *Momordica charantia*. **Phytother. Res.** 14: 592-595. 2000.

ARRUDA E, PONZI C, THOMPSON I, et al. Antimicrobial activity of the *Momordica charantia* L. extract. **Rev Cir e Traumatol Buco Maxilo Facial.** 2010;10(1):89-94.

BAI H, and BEEVY S. Characterization of Intraspecific F1 Hybrids of *Momordica charantia* L. Based on Morphology, Cytology and Palynology. **The Japan Mendel Society Cytologia** 77(3): 2012. 301–310.

BARON, E.J., FINEGOLD, S.M. **Diagnostic Microbiology.** 9th. ed. St Louis: Mosby. 1994.

BHAGYALAKSHMI M, SOWMYASHREE G, KESTURU G, KEMPAIAH K, SATHISH J. G, ROHIT S, MANOHAR S AND DEVARAJA S. *Momordica charantia* seed extract exhibits Strong anticoagulant effect by specifically interfering in intrinsic pathway of blood coagulation and dissolves fibrin clot. **Blood Coagulation and Fibrinolysis.** 5, 26:191–199. 2015.

BIBHASH P, SOUMITRA M, SANJANA P, TAPAS M, SOMANJANA K, KRISHNENDU A, SYED I. Pectic polysaccharide from the green fruits of *Momordica charantia* (Karela): structural characterization and study of immunoenhancing and antioxidant properties. **Carbohydrate Research** 401: 24–31. 2015.

BIN SHANA, JIAN-HUA X, JIAN-HUA Z, YUN P. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. **Food and bioproducts processing**. 90: 579–587. 2012.

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

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**, especialmente do Ceará. Edição especial para o acervo Oswaldo Lamartine de Faria. 593, [http:// www.colecaomossoroense.org.br](http://www.colecaomossoroense.org.br). 1960.

BOURINBAIAR A., LEE-HUANG S. The activity of plant derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**. 219. 923-929. 1996

CARNEY, J. Navegando contra a corrente: o papel dos escravos e da flora Africana na botânica do período colonial. **Revista do centro de estudos africanos**. USP. 22-23:25-28. 2001.

CEARÁ - **Secretaria da Saúde do Estado**. Portaria nº 275/2012. Brazil: Secretário da Saúde do Estado do Ceará, Gestor Estadual do Sistema Único de Saúde no Ceará-SUS/CE; 2012:75.

CHANG C-I, CHEN C-R, LIAO Y-W, CHENG H-L, CHEN Y-C, CHOU C-H. **Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia***. J Nat Prod. 2006;69(8):1168-1171.

CHEN Y, YU H, WU H, PAN Y, WANG K, JIN Y, AND ZHANG CH. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the Chemical Components of the Heating Products of the Flavonoids Extract in Pollen Typhae for Transformation Rule Exploration. **Molecules**. 2015; 20, 18352-18366.

CHEN J-C, LIU W-Q, LU L, et al. Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. **Phytochemistry**. 2009;70(1):133-140

CHEN J-C., LAU B-S., CHAN Y-W., FUNG K-P., LEUNG P-C., LIU J-Q., ZHOU L., XIE M-J., QIU M-H. The Antigliconeogenic Activity of Cucurbitacins from *Momordica charantia*. **Planta Med**. 81: 2015; 327–332.

CHIN H., CHIN-LIN, H., YUEH-HSIUNG, K., AND CHING-JANG, H. Isolation and Identification of Cucurbitane-Type Triterpenoids with Partial Agonist/Antagonist Potential for Estrogen Receptors from *Momordica charantia*. J. Agric. **Food Chem**. 59, 4553–4561. 2011.

CHI-I CH, CHIIY-RONG CH, YUN-WEN L, WEN-LING S, HSUEH-LING CH, CHIH-YING T, JIA-WEI L, AND MING-TING K. Octanorcucurbitane Triterpenoids Protect against *tert*-Butyl Hydroperoxide-Induced Hepatotoxicity from the Stems of *Momordica charantia*. **Chem. Pharm. Bull**. 58(2):225-229. 2010.

CHIUNG-HUI L., MING-HONG Y., SHIH-FANG T., KIM-HONG G., HSUE-YIN H., CHUN-NAN L. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. **Food Chemistry** 118: 751–756. 2010.

CHIY-RONG CH, YUN-WEN L, LAI W, YUEH-HSIUNG K, HUNG-JEN L, WEN-LING S, HSUEH-LING CH, AND CHI-I CH. Cucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia* and Their Cytoprotective Activity in tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Hepatotoxicity of HepG2 Cells. **Chem. Pharm. Bull.** 58(12): 1639-1642. 2010.

CHUN-CHING S., CHENG-HSIU L., WEI-LI L. Effects of *Momordica charantia* on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet. **Diabetes Research and Clinical Practice** 81: 134 -143. 2008.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiot Lab Med**, v. 3, 1991. p. 739-787.

CLSI, 2008. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, Pennsylvania USA. 2008.

CLSI, 2015. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, Pennsylvania USA. 2015.

COSTA, G., NASCIMENTO, E., CAMPOS, A., RODRIGUES F. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) extracts and fractions. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**. Vol-002 Issue-001:45 – 51. 2011.

COUTINHO, H., COSTA, J., SILVA, V., SIQUEIRA-JUNIOR, J., LIMA, E., Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comp. Immun, Microbiol Infect Dis** 33: 467–471. 2010.

DANDAWATE, P.; SUBRAMANIAM, D.; PADHYE S.; ANANT, S. Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 14(2): 81-100. 2016.

DUKE, J.A., BOGENSCHUTZ-GODWIN, M., DUCCELLIER, J., DUKE, P.A. **CRC Handbook of Medical Herbs**, second ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 78-80. 2002.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clin Microbiol J**, v. 9, n. 8m p. 1-7. 2003.

EUCAST, 2013. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. Versão 1.0 dez. 2013.

FAN R, CHENG R-R, ZHU H-T, et al. Two New Oleanane-type Triterpenoids from Methanolized Saponins of *Momordica cochinchinensis*. **Nat Prod Commun.** 2019;11(6):1934578X1601100.

FEI E, ZHI Y, WONGA J, SHEN J, HAO LI, BUN T. The MAP30 protein from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters** 324: 66–74. 2012.

FRANCA, R., NOLETO, D., CATUNDA, F., MACHADO, V., SANTOS, G., COUTINHO-MORAES, D. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 2: 69-77. 2010.

GAMARALLAGE S, NOBUHIRO F, SHOKO N, YU-MING W, KOJI N, TERUYOSHI Y, MASAKO I, HIDEAKI O. **Mechanisms Underlying Decreased Hepatic Triacylglycerol and Cholesterol by Dietary Bitter Melon Extract in the Rat.** *Lipids.* 47:495–503. 2012.

GAO-TING Z, JIE-QING L, YUAN-YUAN D, HAI-ZHOU L, JIAN-CHAO CH, ZHI-RUN Z, LIN ZHOU, MING-HUA Q. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems and leaves of *Momordica charantia*. **Fitoterapia** 95: 75–82. 2014.

GBOGBO K, AGBAN A, WOEGAN Y, KPHEISSI E, YAO P, BATAWILA K, KOUMAGLO K. AND AKPAGANA K. Evaluation de l'activite antimicrobienne de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae), *Psidium guajava* (Myrtaceae) et *Pteleopsis suberosa* (Cobretaceae). **European Scientific Journal.** Edition vol.9 No 36. ISSN: 1857 – 7881: 411-421. 2013.

GROVER J.; YADAV, S. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J. Ethnopharmacol.** 93: 123- 132. 2004.

GUPTA, S., RAYCHAUDHURI, B., BANERJEE, S., DAS, B., MUKHOPADHAYA, S., DATTA, S. Momordicin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent anti Leishmania agent. **Parasitology International**, 59: 192–197. 2010.

HSIEN-YI W, WEI-CHIN K, TAIN-JUNN C, SUNG-HSUN Y, LIANG-HAO C, JIUNN-JYE CH. Differential anti-diabetic effect and mechanism of action of charantin-rich extract of Taiwanese *Momordica Charantia* between type 1 and type 2 diabetic mice. **Food and chemical toxicology** 69: 347-356. 2014.

HSU, C., HSIEH C-L, KUO Y-H, HUANG C. Isolation and Identification of Cucurbitane-Type Triterpenoids with Partial Agonist/Antagonist Potential for Estrogen Receptors from *Momordica charantia*. **J. Agric. Food Chem.** 59, 4553–4561. 2011.

HSUE-YIN H, JUNG-HSUAN L, CHIA-JUNG L, SHIH-FANG T, CHUN-HAO T, JONG-HO CH, SHU-JUN CH, AND SHUANG-EM CH. Antimigratory Effects of the Methanol Extract from *Momordica charantia* on Human Lung Adenocarcinoma CL1 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** .Volume, Article ID 819632, 12 pages. 2012.

- HUANG L, IKEJIRI A, SHIMIZU Y, ADACHI T, GOTO Y, TOYAMA J, TANAKA H, AKASHI R, UCHIDA K, MIYATA H, AND HAGA T. Immunoadjuvant Activity of Crude Lectin Extracted from *Momordica Charantia* Seed. **J. Vet. Med. Sci.** 70(5): 533–535. 2008.
- HYUN, Y., SEUNG, M., SANGHYUN, L., KYE, M. AND EUN, J. The butanol fraction of Bitter Melon (*Momordica charantia*) scavenges free radicals and attenuates oxidative stress. **Prev. Nutr. Food Sci.** 18(1):18-22. 2013.
- INAYAT R, MOHAMMAD B, MOHAMMAD S, MOHAMMAD I, MOHAMMAD K. Bitter Melon (*Momordica Charantia*) Reduces Serum Sialic Acid in Type2 Diabetics: Evidence to Delay the Process of Atherosclerosis. **Chinese medicine**, 2, 125-129. 2011.
- INSTITUTO DE BOTÂNICA (São Paulo). **Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico.** (Manual Nº 4). 1984. 61p.
- JACKSON CL, AGBOKE A, NWOKE V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **J. of Medicinal Plants Research** Vol. 3(9), 2009; pp. 666-669.
- JIA S, SHEN M, ZHANG F, XIE J. Recent advances in *momordica charantia*: Functional components and biological activities. **Int J Mol Sci.** 2017;18(12)
- JIAN CC, MING HC, RUI LN, CORDEL GA, QIUZ SX. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: Structures and biological activities. **Nat Prod Rep.** 2005;22(3):386-399.
- JIAN-CHAO, CH., WU-QING, L., LU L, MING-HUA, Q., YONG-TANG, Z., LIU-MENG, Y., XIAN-MIN, Z., LIN, Z., ZHONG-RONG, L. Kuguacins F-S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. **Phytochemistry.** 70. 2009; 133–140
- JITTAWAN K, SIRITHON S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. **Food Chemistry** 110: 881–890. 2008.
- JORGE, L., SAKUMA, A., INOMATA., E. **Análise histológica e bioquímica de *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano).** R. Inst Adolfo Lutz, v. 52, n.1:23-26. 1992.
- KAI-WEI L, SHYH-CHYUN Y, CHUN-NAN L., Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. **Food Chemistry** 127: 609–614. 2011.
- KELLER, A., MAB J., KAVALIERA A., HEC K., BRILLANTES A., KENNELLYA E. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. **Phytomedicine** 19: 32– 37. 2011.
- KENNY O., SMYTH T., HEWAGE C., BRUNTON N. 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** 141: 4295-4302. 2013.

KOBORI K, et al. Bitter Gourd Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses. **J. Agric. Food Chem. Japan**. Vol. 56, No. 11: 4004 – 4011. 2008.

KUMAR, S., SIJI, J., NAMBISAN, B., MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World J Microbiol Biotechnol**. 28:3, 2012.143–3150.

LANGFIELD R., et. al. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology** 94; 2004; 279–281.

LEE-HUANG, S., HUANGI, P., HUANG, P., BOURINBAIAR, A., HAO-CHIA, CH. AND HSIANG-FU, K. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** Vol. 92, pp. 8818-8822. 1995.

LIMA, P. **Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma oncocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus***. Tese de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA. Mossoró-RN. 2008.

LING B., WANG G-C., YA J., ZHANG M-X., LIANG G-W. Antifeedant Activity and Active Ingredients Against *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* Leaves. **Agricultural Sciences in China**. 7(12): 2008. 1466-1473.

LLORACH R, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ A, TOMÁS-BARBERÁN FA, GIL MI, FERRERES F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chem**. 2008;108(3):1028-1038.

LUCENA FILHO, J. **Extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. apresenta atividade antimicrobiana in vitro sobre espécies padrão e isolados multirresistentes**. Tese. Graduação. Universidade Estadual da Paraíba. 2012.

MADALA, N.E., PIATER, L., DUBERYA, I., STEENKAMP, P. Distribution patterns of flavonoids from three *Momordica species* by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry: a metabolomic profiling approach. **Rev Bras de Farmacogn**. 2016. 26(4). 507–513.

MAGALHÃES, M. N. et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980 – 1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal Ethnopharmacology** 237, 329. 2019.

MAHOMOODALLY, M., GURIB-FAKIM, A., SUBRATTY, A. Screening for Alternative Antibiotics: An Investigation into the Antimicrobial Activities of Medicinal Food Plants of Mauritius. **Journal of Food Science**. 75, N.3: 173-177. 2010.

MAIA RR, PEREIRA M DO SV, HIGINO JS, et al. [Antimicrobial Effect Of Extract *Momordica charantia* Linn Isolated And In Combination With Antibiotics On Resistant *Staphylococcus aureus*] Efeito Antimicrobiano do Extrato de *Momordica charantia* Linn Isolado e em Associação Com Antibióticos Sobre Staphylo. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**. 2008; 4:12-17.

MARIKO H, DOYATNA J, PADOVANI C E SALATA S. Efeito de *Momordica charantia* L. em camundongos infectados por *Plasmodium berghei*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 29(5): 455-460. 1996.

MATOS, F.J.A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, 26. 1999.

_____. **Farmácias Vivas**, Quarta ed. Editora UFC, Fortaleza. 267p. 2002.

_____. **Introdução a fitoquímica experimental**. Editora UFC. 3º edição. 2009.

MAY M, SCHINDLER C. Clinically and pharmacologically relevant interactions of antidiabetic drugs. **Ther Adv Endocrinol Metab**. 2016;7(2):69-83

MEKURIA, D.B., KASHIWAGI, T., SHIN-ICHI, T., AND CHUL-SA K. Cucurbitane Glucosides from *Momordica charantia* Leaves as Oviposition Deterrents to the Leafminer, *Liriomyza trifolii*. **Z. Naturforsch**. 2006. 61c, 81-86.

MEHTA A, SRIVASTVA G, KACHHWAHA S, SHARMA M, KOTHARI SL. Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. **J Ethnopharmacol**. 2013;149(1):195-200.

MIURA T, ITOH Y., IWAMOTO N., KATO M. AND ISHIDA T. Suppressive Activity of the Fruit of *Momordica charantia* with exercise on blood glucose in Type 2 Diabetic Mice. **Biol. Pharm. Bull**. 27(2): 248-250. 2004.

MULLA Z, SRINIVAS R, SOMNATH R, RAVINDRA, SARASWATI P. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology** 61: 9–16. 1998.

MWAMBETE KD. The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a Tanzania medicinal plant. **Afr Health Sci**. 2009;9(1):34-39.

NCUBE S., AFOLAYAN A., OKOH A. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology** Vol. 7 (12), 2008; pp. 1797-1806.

NERURKAR P, et al. *Momordica charantia* (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**. 8:64:1-19. 2011.

NGUYEN, N., et al. α -Glucosidase Inhibition Properties of Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides from the Fruits of *Momordica charantia*. **Chem. Pharm. Bull.** 58(5): 720—724. 2010.

NOBRE, G. **Estudo sobre a coleção das Plantas da Capitania do Ceará** (com o original inédito do Naturalista Feijó), Gráfica Editorial Cearense LTDA, Fortaleza, 62 e 228. 1984.

OLIVEIRA, F., AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. Ed. Atheneu, São Paulo. 1993. 216p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Resistencia antimicrobiana**. 68.a Asamblea Mundial de la salud. Punto 15.1. A68/20. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos**. ISBN 978 92 4 350976 1. OMS, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. OMS, 27 fev. 2017.

OOI C, YASSIN Z, HAMID T. *Momordica charantia* for type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 17: Art. 2CD007845. 2010.

PALOMINO, J., MARTIN, A., CAMACHO, M., GUERRA, H., SWINGS, J., PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, 2002. p. 2720 – 2722.

PATEL R, MAHOBIA N, UPWAR N, WASEEM N, TALAVIYA H, PATEL Z. Analgesic and antipyretic activities of *Momordica charantia* Linn. Fruits. **J. Adv. Pharm. Tech. Res.** Vol 1, Issue 4: 415 – 418. 2010.

PATEL S, et al. Isolation, characterization and antimicrobial activity of charantin from *Momordica Charantia* Linn. fruit. **Int J Drug Dev Res.** 2010.

PAULETTI P, E BOLZANI V. **Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae)**. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 5, 2003; 641-643.

PASHA CH, SAYEED S, ALI S, KHAN Z. **Antisalmonella Activity of Selected Medicinal Plants**. **Turk J Biol** 33: 59-64. 2009.

PEREZ, J., JAYAPRAKASHA, G., and BHIMANAGOUDA, S. Separation and Identification of Cucurbitane-Type Triterpenoids from “Bitter Melon”. ACS Symposium Series; **American Chemical Society**: Washington, DC. 2015.

PILLAI, S. AND MOELLERING, R. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in laboratory medicine**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 365–400.

PITCHAKARN, P., SUZUKI, S., OGAWA, K., POMPIMON, W., TAKAHASHI, S., ASAMOTO, M., LIMTRAKUL, P., SHIRAI, T. Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. **Cancer Letters** 306: 142–150. 2011.

PITCHAKARN P, et al. Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf, modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line, PC3. **Food and Chem Toxicol.** 2012. 50: 840–847.

PORNSIRI P, et al. Kuguacin J isolated from *Momordica charantia* leaves inhibits P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. **Journal of Nutritional Biochemistry** 23: 76–84. 2012.

PUSPAWATI N. Isolation and identification momordicin I from leaves extract of *Momordica charantia* L. **Jurnal Kimia** 2 (1): 2008, 53-56.

RAMADHAR K., BALAJI S, SRIPRIYA R, NITHYA N, UMA T, AND SEHGAL P. In Vitro Evaluation of Antioxidants of Fruit Extract of *Momordica charantia* L. on Fibroblasts and Keratinocytes. **J. Agric. Food Chem.** 58: 1518-1522. 2010.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*, v. 2: 349-362. 1996.

RECIO MC, ANDUJAR I, RIOS JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. **Curr Med Chem.** 2012;19(14):2088-2103.

ROCHA, F. D. **Botânica Médica Cearense**. Biblioteca Básica Cearense, Fundação Waldemar de Alcântara, Fortaleza, 88. (Fac. Símile edição de 1919).

RODRIGUES, F., et al, J. Avaliação das atividades antimicrobiana e toxicidade de *Momordica charantia* L. Cucurbitaceae. **Cadernos de Cultura e Ciência** Vol. 1- Nº 1. 63-67. 2006.

ROFFEY B., ATWAL A., JOHNS T., KUBOWA S. Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. **Journal of Ethnopharmacology** 112: 77–84. 2007

SABAHAT S, and PERWEEN T. Antibacterial Activities Of *Mentha Piperita*, *Pisum Sativum* and *Momordica Charantia*. **Pak. J. Bot.**, 37(4): 997-1001. 2005.

SAENGSAI, J., KONGTUNJANPHUK, S., YOSWATTHANA, N., KUMMALUE, T., JIRATCHARIYAKUL, W. Antibacterial and Antiproliferative Activities of Plumericin, an Iridoid Isolated from *Momordica charantia* Vine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 823178. 2015.

SAMSUL A, MOHAMMED A, MOHAMMED B, SATYA P. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 123: 464–469. 2009.

SANTOS HM DOS, OLIVEIRA DF, CARVALHO DA, et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **J Nat Med.** 2010; 64(2):231-238.

SATAR G, TOPAL A, YANIK K, OKTAY A, BATMAZ E, INAN K. Comparison of the Effects of Bitter Melon (*Momordica charantia*) and Gotu Kola (*Centella asiatica*) Extracts on Healing of Open Wounds in Rabbits. Makale Kodu (Article Code): **journal home-page:** <http://vetdergi.kafkas.edu.tr>. 161 – 163. 2013.

SEHAM B., EL-GENGAIHI S., SHABRAWYA O. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**; 108: 236–242. 2006.

SHIN, S., LIN, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **J Appl Microbiol**, v.97, n. 6, 2004. p. 1289-96.

SINGH, J., CUMMING, E., MANOHARAN G., KALASZ, H. AND ADEGHATE, E. Medicinal Chemistry of the Anti-Diabetic Effects of *Momordica Charantia*: Active Constituents and Modes of Actions. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, 5, (Supple 2-M2) 70-77. 2011.

SHU-JING W, LEAN-TEIK N. **Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon** (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. **LWT** 41: 323-330. 2008.

SILVEIRA, F. AND MENDEZ, A. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata subsp. Pruinosa*. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, 2014. 483-486.

SRIVASTAVA G, JAIN R, VYAS N, MEHTA A, KACHHWAHA S, KOTHARI SL. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and isolated compounds from *citrullus colocynthis* (l.) schrad. **Int J Pharma Bio Sci.** 2013;4(3):825-833.

SVOBODOVA, B., et al. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. **Industrial Crops and Products** 95, 365–373. 2017.

THIELE, B., et al. Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS. **Anal Bioanal Chem.** 391:2663–2672. 2008.

THIRUVENGADAM M, PRAVEEN N, JOHN M, YE-SUL Y, SEUNG-HYUN K, ILL-MIN CH. Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 118:545–557. 2014

TONGIA A., TONGIA S., DAVE M. Phytochemical determination and extraction of *Momordica charantia* fruit and its hypoglycemic potentiation of oral hypoglycemic drugs in diabetes mellitus (NIDDM). **Indian J Physiol Pharmacol.** 48(2):241-4. 2004.

TUAN NQ, LEE DH, OH J, et al. **Inhibition of Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells by Cucurbitanes from *Momordica charantia***. *J Nat Prod*. 2017

ULLAH, M., SHOWKAT, M., UDDIN, N., SAIFUL, I. AND NURUL, A. Evaluation of *Momordica charantia* L. fruit extract for analgesic and anti-inflammatory activities using in vivo assay. **Research Journal Medicinal Plant**. 6 (3): 236-244. 2012.

WANG S, TANG L, GUO Y, YAN F, CHEN F. Determination of momordicoside A in bitter melon by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. **Chromatographia**. 53: 372–374. 2001.

WANG X, SUN W, CAO J, QU H, BI X, ZHAO Y. Structures of New Triterpenoids and Cytotoxicity Activities of the Isolated Major Compounds from the Fruit of *Momordica charantia* L. **J Agric Food Chem**. 2012; 60(15):3927-3933

WEEBACH, M.R., MURRAY, M.T. **Botanical Influences on illness**. Tarzana, C A: Third Line Press. 1399-41. 1994.

WEN-HUEY W, BI-YU L, YUEH-HSIUNG K, CHING-JANG H. Triglycerides constituted of short and medium chain fatty acids and dicarboxylic acids in *Momordica charantia*, as well as capric acid, inhibit PGE2 production in RAW264.7 macrophages. **Food Chemistry** 117: 306-311. 2009.

WHO. **Selected Medicinal Plants** Vol. 4. Essent Med Heal Prod Inf Portal A World Heal Organ Resour. 2005;4:381-399.

XIAOQING, Y., XIAOHONG, G., JIAN T. Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser. **Food Chmestry** 111: 415-420. 2008

YALDIZ G, SEKEROGLU N, KULAK M, DEMIRKOL G. Antimicrobial activity and agricultural properties of bitter melon (*Momordica charantia* L.) grown in northern parts of Turkey: a case study for adaptation. **Nat Prod Res**. 2015;29(6):543-545.

YAMAGUCHI, N., SATOH-YAMAGUCHI, K., ONO, M. *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. **Phytomedicine**. v. 16, n. 4, 2009. p. 369-376.

YASIR, M., SULTANA, B., NIGAM, P.S., OWUSU-APENTEN, R. Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC–ESIMS/MS identification of phenolic components. **Food Chemistry** 199. 2016. 307–313.

YASUDA, M., IWAMOT, M., OKABE, H., YAMAUCHI, T. Structures of Momordicines I, II e III, The bitte principles in the leaves and vines of *Momordica charantia* L. **Chem. Pharm. Bull**. 32 (5), 2044-2047. 1984.

YEH-LIN, L., YUH-HWA, L., WEN-LI, L., JONG-HO, CH., KUR-TA, CH., HONG-JEN, L. AND WEN-CHI, H. Antibacterial and cytotoxic activities of different wild bitter gourd cultivars (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Seringe). **Botanical Studies**. 52: 427-434. 2011.

ZAFAR, A., MANJEET, S., SHARMA, P. Neuroprotective effect of *Momordica charantia* in global cerebral ischemia and reperfusion induced neuronal damage in diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology** 133: 729–734. 2011.

ZHANG J, et al. Cucurbitane Triterpenoids from the Leaves of *Momordica charantia*, and Their Cancer Chemopreventive Effects and Cytotoxicities. **Chemistry & Biodiversity** – Vol. 9: 428-440. 2012.

ZOCOLER, A.D., MOURÃO, K.M., MELLO, J.P., MARQUES, L.C. Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farm. Bonaerense**. 25 (1): 22-7. 2006.

APÊNDICE

Artigos publicados:

1. ***Momordica Charantia* L. Variety from Northeastern Brazil. Analysis of Antimicrobial Activity and Phytochemical Components.**
2. **Pharmacognostic Evaluation of Bitter Melon from Brazilian Northeast (*Momordica charantia* L.): Identification of Momoordicin II**

Momordica Charantia L. Variety from Northeastern Brazil: Analysis of Antimicrobial Activity and Phytochemical Components

William Antonio Sagástegui Guarniz^{1,6}, Kirley Marques Canuto², Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro², Hilania Valeria Dodou¹, Karla Nascimento Magalhaes³, Kellen Miranda Sá³, Patrícia Georgina Garcia do Nascimento⁴, Karine Lima Silva⁵, Gleilton Weyne Passos Sales⁶, Mirian Parente Monteiro¹, Nadia Accioly Pinto Nogueira¹, Sikiru Olaitan Balogun^{7,*}, Mary Anne Medeiros Bandeira¹

William Antonio Sagástegui Guarniz^{1,6}, Kirley Marques Canuto², Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro², Hilania Valeria Dodou¹, Karla Nascimento Magalhaes³, Kellen Miranda Sá³, Patrícia Georgina Garcia do Nascimento⁴, Karine Lima Silva⁵, Gleilton Weyne Passos Sales⁶, Mirian Parente Monteiro¹, Nadia Accioly Pinto Nogueira¹, Sikiru Olaitan Balogun^{7,*}, Mary Anne Medeiros Bandeira¹

¹Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Odontology and Nursing, Universidade Federal do Ceará, Ceará, BRAZIL.

²Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará, BRAZIL.

³Horto de Plantas Medicinais Prof EJA Matos, Universidade Federal do Ceará, BRAZIL.

⁴Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidade Federal do Ceará, Ceará, BRAZIL.

⁵Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Ceará, Ceará, BRAZIL.

⁶Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará, Ceará, BRAZIL.

⁷Faculdade Noroeste do Mato Grosso - AJES, 78.320-000, Juína, Mato Grosso, BRAZIL.

⁸Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, National University of Trujillo, PERU.

Correspondence

Sikiru Olaitan Balogun

Faculdade Noroeste do Mato Grosso - AJES, 78.320-000, Juína, Mato Grosso, BRAZIL.

E-mail: balogun.zhikrullah@gmail.com

History

- Submission Date: 15-07-2019;
- Review completed: 14-08-2019;
- Accepted Date: 14-08-2019.

DOI : 10.5530/pj.2019.11.203

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v11/i6>

Copyright

© 2019 Phcogj.Com. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Introduction: *Momordica charantia* L., Cucurbitaceae, is a pantropical food and medicinal plant. The plant is included in the Official List of Brazilian Medicinal Plants of interest to the Brazilian Unified Health System. The study aimed to perform microbiological studies with extracts of *Momordica charantia* L. including chemical characterization of the active extracts. **Methods:** The antimicrobial activity was evaluated with the hydroalcoholic and acetone extracts of *M. charantia* leaves, fruits and seeds from northeastern Brazil using microdilution broth technique on the selected clinical bacterial and fungal strains. Extracts that presented antimicrobial were subjected to ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QToFESI-MS). **Results:** The *in vitro* antimicrobial assays demonstrated that the leaves extracts presented good antibacterial effect against four *Staphylococcus aureus* strains, and a weak antifungal activity against *Candida albicans*. Fourteen compounds were identified in the hydroalcoholic extract, while 12 were found in the acetone extract. **Conclusion:** The present study demonstrated the potential antibacterial activity of *M. charantia* L. from northeastern part of Brazil, in addition to important phytochemical metabolites known to possess antibacterial activities, particularly against microorganisms of clinical importance. The UPLC phytochemical profile of the Brazilian variety is reported here for the first time. The phytochemical profile of the LHE and FAE demonstrated the presence of biologically and pharmacologically active compounds. There is lack of biological and pharmacological studies to support the medicinal uses of this important plant. The Brazilian variety of *M. Charantia* could be a potential therapeutic agent in the treatment of infections.

Key words: Ethnopharmacology, *in vitro* activity, Antibacterial, Antifungal.

INTRODUCTION

Momordica charantia L. belongs to the cucurbitaceae family is a climbing plant found frequently covering fences and shrubs along the paths from north to south regions of Brazil, especially during the rainy season. It is a species native to Africa that was introduced to South America in the colonial period by black slaves from the African continent.^{1,2}

Momordica charantia is found in nature in various forms distinguishable by the size of the fruits. Two of which are more frequent the northeastern Brazil, where it is popularly referred to as the *Melão-de-Caetano*, *erva-de-lavadeira* "laundry-plant", because the whole plant is used in the washing of clothes in the rural areas. A variety of large fruits that can measure up to 30 cm in length and about 5 cm in diameter is the most common variety in the Asian countries, used both in food and in medicinal preparations. This variety was introduced to Brazil in this century, and its fruits can readily be found in the open markets like in the state of São Paulo (Figures 1 and 2).³

In the state of Ceará, northeastern Brazil, one of the earliest records of *M. charantia* is found in the *Coleção Descritiva das Plantas da Capitania do Ceará do Naturalista Feijó* "Descriptive collection of Plants of Cearáregion" by João da Silva Feijó, who was a Ceará naturalist in 1818.⁴ As at that time, Brazil was still under Portuguese colonization. However, other works on northeastern Brazilian Flora by the naturalist Freire Allemão, who also recorded the species, were based on this collection.⁵ In the twentieth century, the ethnobotanical descriptions of *M. charantia*, including its use in the popular medicine of the northeast, can be encountered in important works like the *Formulário Fitoterápico* (Phytotherapeutic Formulary) of Professor Dias da Rocha,⁶ *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará* (Plants of the Northeast, especially of Ceará).⁷ and *Plantas da Medicina Popular do Nordeste* (Plants of the Northeastern People's Medicine).⁸

In the Brazilian state of Ceará, the plant is used topically in compresses, plasters, washes for the treatment of ulcers and various skin disorders

Cite this article: Guarniz WAS, Canuto KM, Ribeiro PRV, Dodou HV, Magalhaes KN, Sa KM, et al. *Momordica Charantia* L. Variety from Northeastern Brazil: Analysis of Antimicrobial Activity and Phytochemical Components. Pharmacogn J. 2019;11(6):1312-24.



Figures 1 and 2: Photos of F. J. A. Matos: *Momordica charantia* L. variety.

(abscesses, boils, pediculosis, pruritus and burns). And recently, its ethnomedicinal uses from the same region was detailed in the Ethnopharmacopoeia of Professor Francisco José de Abreu Matos⁹ which included wound healing, as antiseptic, treatments of gonorrhoea, skin diseases, colitis, gynecological inflammation, external tumor, vaginal discharge, infected wounds and for weight loss. The plant parts used are the leaves (its juice, natural form or as poultice, decoction and maceration in water, fruit (natural form or as poultice, its branch and the whole plant). It is also prepared in form of tinctures/alcohol extract and is employed externally to treat skin infections or parasite infestations.^{10,11}

This plant has received a lot of attention due to its many ethnomedicinal and culinary uses. Biological and pharmacological studies of *M. charantia* have shown interesting therapeutic potentials, particularly its antidiabetic¹²⁻¹⁷, antileishmania¹⁸, anti-HIV¹⁹, analgesics and anti-inflammatory activities.²⁰ In addition, pharmacological and biological action of its various metabolites have been cited.^{21,22}

Due to the ethnomedicinal importance of the local Brazilian variety, this species has been included in the National List of Medicinal Plants of Interest to Brazilian Public Health System²³ and is also part of the Official List of Medicinal Plants of Ceará, a northeastern state of Brazil (REPLAME-CE).²⁴ The plant also featured in the Brazilian Pharmacopoeia Phytotherapeutics Formulary.²⁵ Although, the antimicrobial properties of varieties other than that from Brazil have been cited in many studies using varying biological and pharmacological models, extracts from varying solvents²⁶⁻²⁸, few studies have been done on *M. charantia* antimicrobial activities collected in the northeastern region of Brazil.^{29,30} To the best of our knowledge, there is no detailed phytochemical studies of this important medicinal and food plant of this local variety from northeastern region of Brazil, despite being part of the Official Plant Lists. It is on this basis that we conducted the present study to establish scientific proof for its popular use in treating infections, to standardize extract with promising antibacterial activity and relate its metabolites content based on literature sources to its ethnomedicinal uses by people inhabiting northeastern region (Caatinga Biome) of Brazil.

In this study, we reported the antimicrobial activity of six extracts (hydroethanolic and acetone extracts of *M. charantia* leaves, fruits and seeds) obtained from the northeastern region of Brazil in order to justify its popular use, in addition to conducting phytochemical profile of the most promising extracts.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Brain heart infusion media and Agar Sabouraud Dextrose (Kasvi), Müller-Hinton agar, methanol, trichloroacetic acid, ascorbic acid,

potassium phosphate buffer, acetonitrile, ethanol, and methanol, used were hypergrade for LC-MS LiChrosolv* and are products of Merck KGaA, Germany. Others such as formic acid 98-100% and n-Hexane were also purchased from Merck KGaA, Germany. Dimethylsulfoxide (Biology applications grade, Sigma-Aldrich, Inc), Oxacilin and fluconazol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

Botanical material

The plant was collected from the Medicinal Plants Garden of Prof. Francisco José de Abreu Matos, Universidade Federal do Ceará, in the flowering and fruiting period, precisely in June 2018. The herbarium specimens were deposited in the Herbarium Prisco Bezerra the Universidade Federal do Ceará with specimen voucher number EAC31609 and identified as *Momordica charantia* L. For the preparation of the extracts, the leaves, fruits and seeds were submitted to drying in an air circulating oven at 45°C until constant weight, then milled with the aid of a knife mill.

Preparation of leaf, fruit pulp and seeds extracts for microbiological tests

Two extractions were performed for each part of the plant, with ethanol/H₂O (7: 3) and with acetone. 0.80 g of the leaf powder, fruit pulp and seed were weighed separately, and placed in a test tube with 4 mL hexane for degreasing. Subsequently, 4 mL of ethanol/H₂O solution (7: 3) was added, homogenized and the polar compounds extracted in an ultrasonic bath for another 20 min with fixed power (135 W). The samples were then centrifuged (3000 rpm/10 minutes). The hexanic phase was discarded. The hydroethanolic phase (ethanol/H₂O) was filtered on a 0.22 µm PTFE (polytetrafluoroethylene) filter, and thereafter the filtrate was collected in small vials, with subsequent drying and weighing.

For the extraction with acetone, the same procedure was performed, except that before adding acetone the hexanic phase was removed.

Thus, six extracts were obtained and coded as follows: Leaves - hydroethanolic extract/ethanol/H₂O (LHE) and acetone extract (LAE); Fruits - ethanol/H₂O extract (FHE) and acetone extract (FAE); Seeds - ethanol/H₂O extract (SHE) and acetone extract (SAE). All these samples were dried and weighed to calculate their yields.

To evaluate the antimicrobial action, the extracts were dissolved in 1% dimethyl sulfoxide solution (DMSO, Merck).

Microorganisms

All bacterial and fungal strains used in *in vitro* experimental models were obtained from the collection of the reference microorganisms used in Sanitary Surveillance (CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro) and were maintained in the Applied Microbiology Research Laboratory of Universidade Federal do Ceará. These are *Staphylococcus aureus*

ATCC 14458 (oxacillin sensitive), *S. aureus* CCBH 5330 (oxacillin resistant and methicillin resistant strain MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Candida albicans* ATCC 10231.

To prepare the microbial inoculum, the strains were cultured in Brain Heart Infusion (BHI) broth for bacteria or Sabouraud broth for yeasts. Subcultures were incubated for 24 hours at 37 °C. For standardization of the inocula, aliquots taken from the subcultured tube were transferred to 0.85% sterile saline to obtain turbidity equivalent to the McFarland 0.5 scale (about 10⁸ CFU/mL or 10⁶ CFU/mL for bacteria and yeast, respectively). This suspension was diluted to obtain the final microbial colony forming units (CFU) of 10⁶ CFU/mL for bacteria or 10⁴ CFU/mL for yeasts, and which were used in all the microbiological assays.

The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed according to the methodology recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute.^{31,32} In the 96-well, sterile microplates, 100 µL of culture medium (BHI broth for bacteria or Sabouraud for yeast), 20 µL of the sample (extract), were added in serial concentrations ranging from 2000.0 to 31.2 µg/mL and 80 µL of the microbial suspensions (10⁶ and 10⁴ CFU/mL, for bacteria and yeast, respectively). Controls of turbidity, medium sterility, microbial growth, diluent sterility and inhibition by the diluent were performed. As positive controls, oxacillin and fluconazole were used for bacteria and yeasts, respectively, at concentrations ranging from 0.0488 to 100 µg/mL.

The microplates were incubated for 24 hours at 37 °C and after this period, the visual reading of bacterial growth was carried out. MIC was determined as the lowest concentration of test substance capable of inhibiting microbial growth to the naked eye, as evidenced by the absence of turbidity.^{31,32}

For extracts with intense turbidity, 10 µL of resazurin (0.01%) was added and incubated at 37 °C for 2 hours. The maintenance of the blue color in the wells was interpreted as absence of bacterial growth, and the development of pink color, as occurrence of bacterial growth. The MIC was defined as the lowest concentration of the test substance in which there was no change in coloration.³³ The experiments were performed in triplicate and at two different times.

For determination of Minimum Bactericidal Concentration (MBC), 5 µL aliquots of microplate wells used to determine MIC that did not show bacterial growth were seeded in Petri dishes containing plate count agar and incubated for 24 hours at 37 °C. After this period, colonies were counted. MBC was considered as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth by at least 99.9% of the initial inoculum.^{34,35}

Analysis by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-ESI-MS)

Phytochemical analysis was performed only on extracts that presented significant antimicrobial activity. The extracts were prepared as described in Section 2.2 for UPLC analysis. After filtration in 0.22 µm PTFE filters, each extract was withdrawn and 100 µL of the standard internal solution (anthracene-9-carboxylic acid) was added at a concentration of 10 µg/mL (10 ppm). Only LHE and LAE extracts were subjected to UHPLC analysis.

The analysis was performed in Acquity UPLC system (Waters), coupled to a Quadrupole / Flight Time (QToF, Waters) system. Chromatographic runs were performed on a Waters Acquity UPLC BEH column (150 x 2.1 mm, 1.7 µm), fixed temperature of 40 °C, mobile water phases with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B), gradient ranging from 2% to 95% (15 min), flow rate of 0.4 mL/min and injection volume of 5 µL. High-resolution mass conditions - XEVO-

QToF. The ESI-mode was acquired in the range of 110-1180 Da, fixed source temperature at 120 °C, desolvation temperature 350 RegularC, withdrawal gas flow of 500 L/h, extraction cone of 0.5 V, capillary voltage of 2.6 kV. ESI + mode was acquired in the range of 110-1180 Da, source temperature 120 fixed RegularC, desolvation temperature 350 °C, desolvation gas flow 500 L/h and the capillary voltage of 3.2 kV. Leucine encephalin was used as a lock mass. The acquisition mode was MSE. The instrument was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Corporation).

The software used for data processing was the Masslynx (Waters Corporation) where the molecular formulas were calculated with their respective masses. The identification of the compounds was made based on comparison of spectral patterns already discussed in the literature regarding the species of *M. charantia*. In addition, online databases containing information on characterized metabolites such as Scifinder, Knapsack, PubChem and Chempidder were also consulted.

RESULTS AND DISCUSSION

Extracts yields

The yields of the six extracts, previously encoded, were as follows: LHE 9.8%, LAE 4.2%, FHE 17%, FAE 5.2%, SHE 13% and SAE 5.4%.

Microbiological assays

The only extracts that presented significant antimicrobial activity were those of the leaves, which are LHE and LAE, and therefore data for extracts without activity were not shown in the Table 1.

In the present study, antimicrobial activity of LHE and LAE was detected against four of the five clinically important bacterial and fungal isolates. The highest effect was observed for the acetone extract (LAE) (Table 1).

According to Aligiannis *et al.*³⁶, MIC values <0.5 mg/mL are considered potent inhibitors; MICs between 0.6 and 1.5 mg/mL are moderate inhibitors; and MIC > 1.6 mg/mL are weak inhibitors. Thus, the LAE extract is a potent inhibitor on strains of *S. aureus*, moderate on *S. epidermidis* and weak on yeasts (*C. albicans*). The antibacterial activities of extracts and fractions prepared from different parts of *M. charantia* have been reported from various parts of the world.^{28-30,37,38} The parts with reports of antimicrobial activities include the fruits, seeds, leaves and the stems. However, it is interesting to note that comparison based on literature reports is difficult based on many reasons. Sometimes, the minimal concentrations employed are in excess of up to 10 times the maximum concentration that we employed or even difficult to deduce^{37,38}, in some others the concentrations were not stated, but rather the activity stated^{38,39} and there seems not to be any clear criteria for reporting plants' extracts antimicrobial activities in many cases.^{37,39} In addition, the solvents or the methods employed are completely different.^{37,39,40}

On this basis, true comparison of the activities reported on *M. charantia* from different parts of the world seem to be a daunting and a very difficult task. In the case of divergent in the activities reported for the plants with similar methods used, the differences in the activities reported can be due to one of or combination of the following reasons: variations in the seasons of collections, temperature, water availability, ultraviolet radiation, nutrients availability, atmospheric pollution, mechanical damage, and pathogen attacks.⁴¹ These external differences invariably influence the composition and levels of important secondary metabolites of the plant materials employed in these different studies, in addition to the variations related to methodological approaches in the antimicrobial assays.⁴²

LHE extract, on the other hand, is a potent inhibitor of *S. aureus* strains, but moderate on *S. epidermidis*. The differences observed in the

antimicrobial potential between LAE and LHE extracts on strains of *Staphylococcus* may be due to the differences in metabolites composition of both extracts. Some cucurbitacins have been shown to have *in vitro* antibacterial activities.⁴³⁻⁴⁶ An excellent review on cucurbitacins and its derivatives was made by Jian *et al.*⁴⁷ Interested reader would find the review interesting.

Identification of chemical constituents of the hydroethanolic and acetone extracts (LHE and LAE)

The major chemical constituents of *M. charantia* leaves are the tetracyclic triterpenoids and their glycosides, most of which are referred to as cucurbitacins, and are known for their bitterness and biological effects, in addition to quercetins and kaempferols.

The cucurbitacins belong to a class of plant triterpenic, tetracyclic compounds and highly oxygenated derivatives cucurbitane skeleton. Cucurbitane-like molecules have several polarities due to the variation of substitutions in the side chain or portions of glucose or rhamnose.⁴⁷⁻⁵⁶ Several compounds were isolated from extracts of *M. charantia* by separations involving chromatographic processes, which served as reference in the identification of the chemical constituents of the present study.

The chromatograms of the hydroethanolic (LHE) and acetone (LAE) extracts obtained in the positive ionization mode are shown in Figures 3A and B, respectively. The characterized compounds are summarized in Table 2 with the relevant data, including retention time, experimental mass and calculated *m/z*, molecular formula, error in ppm provided by the software and the MS/MS fragments. Chemical profile of the extracts afforded the tentative identification of 14 compounds. These are one amino acid, four flavonoids and nine triterpenoids derivatives.

A brief comparison between the hydroethanolic extract and acetone extract of the leaves of *M. charantia* revealed some striking differences. Tryptophan, quercetin and kaempferol hexoside were found only in the LHE extract, while LAE extract presented two unknown compounds, Table 2.

Tryptophan was identified by the precursor ion at *m/z* 205 (C₁₁H₁₃N₂O₂) and the characteristic fragment at *m/z* 130 (indol nucleus).⁵⁷ Quercetin-*O*-hexoside isomers showed a precursor ion at *m/z* 465 (C₂₁H₂₁O₁₂) and a product ions at *m/z* 303, key fragment of quercetin aglycone, resulted from the loss of glucose unit. Additionally, quercetin-*O*-rhamnoside shows a typical precursor ion *m/z* 449 (C₂₁H₂₁O₁₁) and the characteristic fragment at *m/z* 303, loss of rhamnose.⁶⁴ Kaempferol-*O*-hexoside showed an *m/z* at 449 (C₂₁H₂₁O₁₁), with a key fragment of the kaempferol nucleus at *m/z* 287 indicated by the loss of a hexose. Prior studies have identified these compounds in *M. charantia*.^{58,65,66}

Cucurbitane-type triterpenes were identified due the losses of H₂O (18 Da), CO (28 Da) as well as because of a diagnostic fragment ion at *m/z* 109 resulting from the break of C17-20 linkage. Thus, hydroxycucurbitetraenol isomers were identified by the precursor ion at *m/z* 437 (C₃₀H₄₅O₇) and its product ions at *m/z* 419, 409, 391, 109. An example of this fragmentation pattern occurs with the 3 β -hydroxycucurbita-5 (10), 6,22 (E), 24-tetraen-19-ol, Figure 4, as previously reported in *M. charantia*.^{59-63,67} Epoxy isomers showed an additional oxygen (16 Da) and same fragmentation pattern. The Figure 5 depicts the MS fragmentation to 5 β ,19-epoxycucurbita-6,22(E),24-triene-3 β ,19-diol^{59,61} and 3-[(5-formyl-7 β ,25-dihydroxymethoxycucurbita-5,23-dien-3-yl)oxy]-3-oxopropanoic acid⁶², Figure 6.

Table 1: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), in mg/mL, of EtOH/H₂O and acetone extracts of *M. charantia*.

Microorganism	Leaves extracts		
	LHE MIC	LAE MIC	MBC
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	0.5	0.25	-
<i>S. aureus</i> CCBH 5330	-	0.125	2.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	2.0	1.0	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	2.0	2.0

LHE: leaves hydroethanolic extract (ethanol/H₂O, 7:3); LAE: acetone extract.

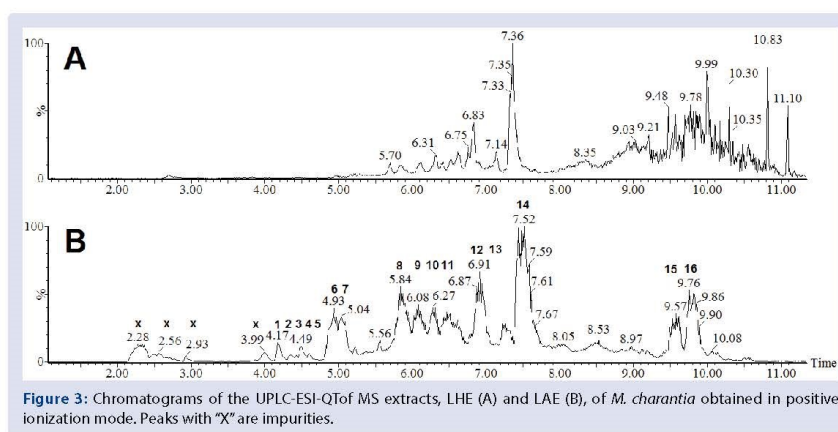
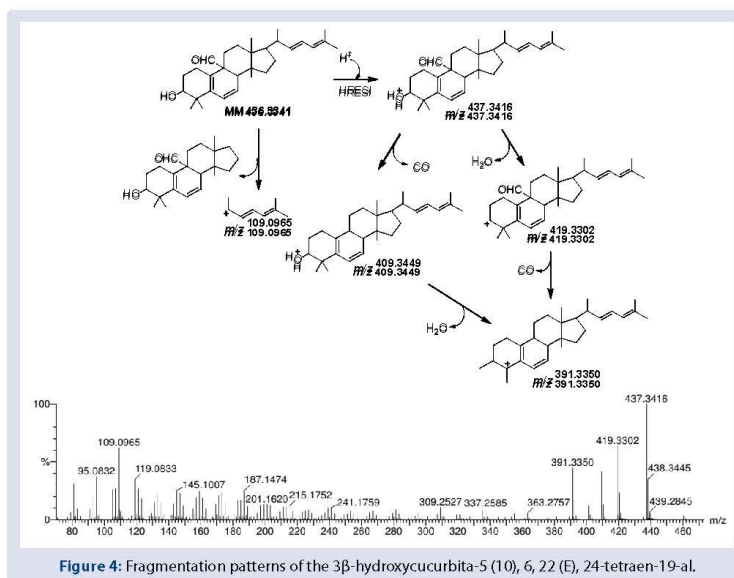


Figure 3: Chromatograms of the UPLC-ESI-QToF MS extracts, LHE (A) and LAE (B), of *M. charantia* obtained in positive ionization mode. Peaks with "X" are impurities.

Table 2: Chemical identification of compounds of the hydroalcoholic (FEC) and acetone (FAC) extracts from the leaves of *Momordica charantia* L. "Melão-de-são-caetano".

Peak	Rt min	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ Observed	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	LHE	LAE	Ref
1	4.17	205.0974	205.0977	146.0581, 130.0630	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	-1.5	Tryptophan	x	-	57
2	4.35	465.1047	465.1033	303.0482	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	3.0	Quercetin-O-hexoside	x	-	58
3	4.49	465.1031	465.1033	303.0475	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	-0.4	Quercetin-O-hexoside	x	x	58
4	4.52	449.1071	449.1084	303.0463	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	-2.9	Quercetin-O-rhamnoside	x	x	58
5	4.60	449.1101	449.1084	287.0553	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	3.8	Kaempferol-O-hexoside	x	x	58
6	4.93	805.5035	805.5043	787.4910, 614.4079, 175.1103	C ₅₂ H ₆₉ O ₇	-1.0	Unknown	x	-	-
7	5.03	769.4990	769.4985	333.1419, 175.1169	C ₅₆ H ₆₅ O ₂	0.6	Unknown	x	-	-
8	5.84	437.3416	437.3420	419.3302, 409.3449, 391.3350, 109.0965	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	0.9	Hydroxycucurbitetraenal isomer	x	x	59
9	6.08	437.3431	437.3420	419.3287, 409.3463, 391.3387, 109.1014	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	2.5	Hydroxycucurbitetraenal isomer	x	x	59
10	6.27	437.3434	437.3420	419.3312, 409.3437, 391.3375, 109.1018	C ₃₀ H ₄₅ O ₂	3.2	Hydroxycucurbitetraenal isomer	x	x	59
11	6.47	629.3694	629.3690	437.3415, 419.3294, 409.3463, 391.3355, 109.1007	C ₃₆ H ₅₃ O ₉	0.6	Oleanane- triterpenoid saponin	x	x	60
12	6.91	455.3530	455.3525	437.3390, 419.3274, 409.3472, 391.3347, 109.1015	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	1.1	Epoxycurcubitatrienediol isomer	x	x	22,61
13	7.26	581.3455	581.3454	541.3593, 523.3412, 495.3454, 437.3396, 409.3545, 391.3342, 109.0979	C ₃₃ H ₅₀ O ₇ Na	0.3	3-[(5-formyl-7β,25-dihydroxymethoxycucurbita-5,23-dien-3-yl)oxy]-3-oxopropanoic acid isomer	x	x	62
14	7.52	455.3527	455.3525	437.3463, 419.3361, 409.3446, 391.3396, 109.1000	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	0.4	Epoxycurcubitatrienediol isomer	x	x	59,63
15	9.57	477.3376	477.3376	437.3398, 419.3287, 391.3346, 109.0984	C ₃₂ H ₄₅ O ₃	1.5	Unknown	x	x	-
16	9.76	525.3571	525.3580	493.3336, 437.3434, 419.3293, 391.3380, 109.1009	C ₃₃ H ₄₉ O ₅	-1.7	Unknown	x	x	-

**Figure 4:** Fragmentation patterns of the 3β-hydroxycucurbita-5 (10), 6, 22 (E), 24-tetraen-19-al.

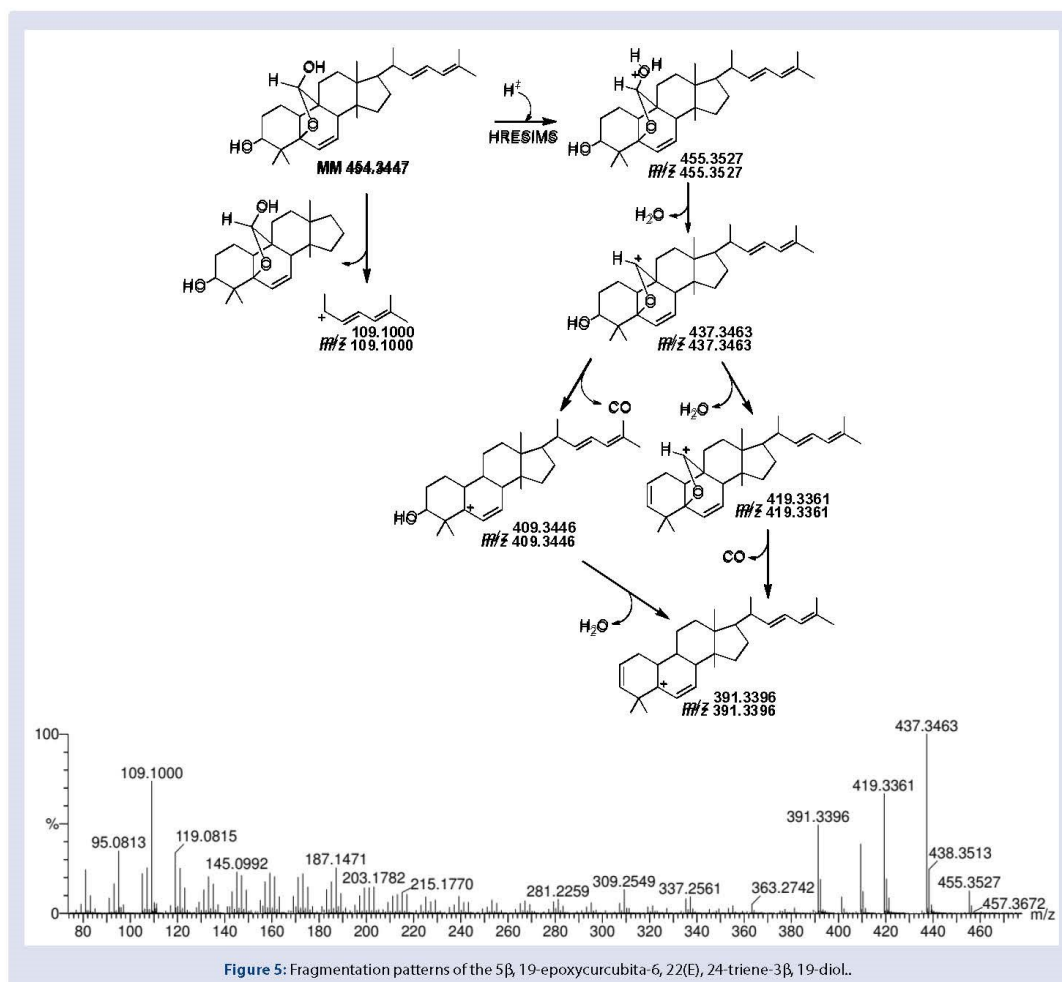


Figure 5: Fragmentation patterns of the 5β, 19-epoxycucurbita-6, 22(E), 24-triene-3β, 19-diol.

Literature survey of ethnomedicinal uses and biological or pharmacological compounds identified or isolated from *M. charantia*.

We present the ethnomedicinal uses reported from the northeastern region of Brazil (Table 3) and then made a summary of phytochemicals reportedly identified or isolated from *M. charantia* and verified in this present local variety, with the view of presenting plausible role for these metabolites in the potential therapeutic effects of this plant.

Literature survey of the ethnomedicinal uses in the northeast region of Brazil of *M. charantia* and its identified metabolites revealed some interesting findings. In spite of the widespread uses of this important food and medicinal plants, there are still lack of rigorous preclinical and clinical studies, particularly for many of its ethnomedicinal claims. In fact, there is no clinically supported medicinal uses.⁶⁸ It is also surprising that some of the biological activities reported are anecdotal due to poor experimental designs, among others. For example, some

studies related its biological activities using solutions made from the plants parts without stating the concentrations or dose used, the use of solvents other than those used reported in the ethnomedicinal uses, the parts used in the studies and sometimes the route of administration of the extracts. The most pre-clinically substantiated activities of *M. charantia* are its anti-diabetic and anti-neoplastic activities^{16,20,26,27,69,70}.

In the present study, we demonstrated the antibacterial and antifungal activities of the leaves extracts of *M. charantia* against clinically important bacterial and fungal strains. Similar reports have been observed in the literature^{28-30,37,106}. In order to be able to give plausible explanation as to the activity observed as well as to standardized the extracts, we performed phytochemical studies on the two extracts studied in the present work. Among the structures identified by UPLC in LHE and LAE extracts of *M. charantia*, a number of compounds derived from flavonoids and many of which have been shown to possess antimicrobial activities were identified in LHE. However, some of these

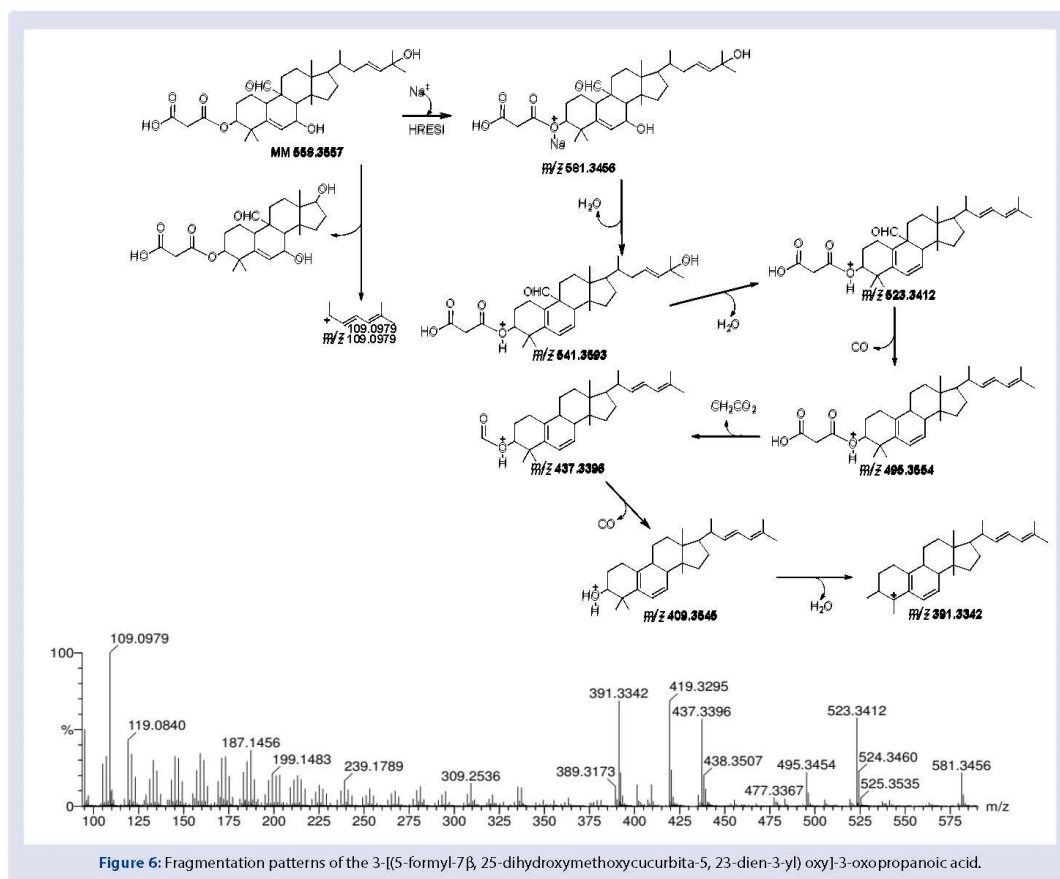


Figure 6: Fragmentation patterns of the 3-[(5-formyl-7 β , 25-dihydroxymethoxycucurbita-5, 23-dien-3-yl) oxy]-3-oxopropanoic acid.

constituents do not appear in LAE extract, which presented better antimicrobial and antifungal activity, suggesting that there are other metabolites, that were not identified in the present work and, which may contribute, at least in part, to the antibacterial and antifungal activities observed.

To the best of our knowledge, there are no sufficient chemical and biological studies to indicate the substances responsible for antibacterial or antifungal activity of *M. charantia*.

These results further demonstrate therapeutic potential of *M. charantia* extracts and calls for further biological and pharmacological prospecting of this important plant. There is need for *in vivo* antimicrobial assays to confirm the potential antimicrobial activity of the plant and its phytochemical constituents that are yet to be subjected to biological/pharmacological studies. In fact, most of its important phytochemical compounds are without biological or pharmacological studies. Majority of studies on its isolates are focused on antidiabetic and anti-cancer activities. In addition, there is lack of studies on many of its ethnomedicinal uses. Furthermore, there is need to carry out mechanistic studies to determine how *M. charantia* and its constituents afford the antimicrobial action observed here as in many studies.

CONCLUSION

The hydroethanolic extract (LHE) and acetone (LAE) from *M. charantia* L. showed different patterns of antimicrobial action against Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and on yeast (*C. albicans*), which are believed to be due to the differences in the composition of extracts as shown by the UPLC analysis of constituents. The study is a pioneer in the association between antimicrobial activity of different Brazilian bitter gourd extracts and its chemical constituents. Nevertheless, studies that will evaluate the compounds alone and in association, as well as those investigating their mechanisms of action are needed to elucidate this pharmacological effect.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Organization of American States (OAS) for conceding study fellowship grant to the first author, Grupo de Universidades Brasileiras de Coimbra (GCUB), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) for financial assistance, and to the Researchers of the Multi-user Laboratory of Chemistry of Natural Products of EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL.

Table 3: Summary of ethnomedicinal uses, chemical compounds identified, and activities reported in the literature that corresponds to *M. charantia* ethnomedicinal uses in the northeastern region of Brazil.

Ethnomedicinal uses	Confirmed biological/ pharmacological activities	Chemical compounds or extracts with activity	References
Indication in skin treatments wound healing.	Wound healing; various model	Fruit powder, extracts	26,71-77
Antiseptic (skin infections, mycoses) and antimicrobial	Antibacterial and antifungal activities	Quercetin-O-hexoside isomers, kaempferol, tannins, flavonoids and alkaloids, various crude extracts	29,78-90
Antiviral	antiviral activity (inhibit HRV2 replication)	Quercetin-7-Glucoside	91,92
Scabies, vermifuge, anthelmintic	Anti-helminthic activity	Crude extracts	93
Tumor and benign breast neoplasm	Antineoplastic and anti-tumor, anti-hepatocellular carcinoma; renal carcinoma cells in-vitro anticancer, malignant melanoma, cytotoxicity against chondrosarcoma SW 1353 cell line; modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line.	MAP30, Cucurbitacins (Cucurbitacin E glucoside, and Cucurbitacin I glucoside, cucurbitacines A, B, D, E), Kuguacin J and Cucurbitane-type triterpenoids (charantosides, momordicosides, karavilosides, karavilagenin D) and quercetin	19,20,26,27,45,47,49-54,56,70,94-105
Anti-diabetic	Antidiabetic activity, stimulatory effect on insulin secretion and various others, including clinical trials(too numerous to mention all)	Different extracts of <i>M. charantia</i> , Kuguacin (The Kuguacin R and Kuguacin II, 3 β ,7 β ,25-trihydroxycucurbita-5,23(E)-diene-19-al, momordicine I, Momordicosides L, charantioside VII	15,17,26,27,61,69,106-108
Internal and external inflammation	Pre-clinical anti-inflammatory activities, and in patients with primary knee osteoarthritis	Cucurbitacins, quercetin, kaempferol, and plant crude extracts	17,20,71,105,109-119
Contraceptive	Antiestrogen activity	Triterpenoid, Kaempferol Cucurbita-6, 22 (E), 24-trien-3 β -ol-19,5 β -olide, crude extract	59,120
Immunostimulating	Immunomodulatory activity	Polysaccharides from <i>M. charantia</i>	121
Antimalarial	In vitro (positive) and in vivo (no effect) anti-plasmodium activity	Crude extracts	122,123
Anti-diarrheal	In vivo anti-diarrheal activity	Crude aqueous extract	124
Indication in skin treatments: eczema, acne, scabies, hemorrhoid, and furuncles, carbuncle	No report	No report	
Gastroenteritis	No reports	No reports	
Colitis	No reports	No reports	
Gynecological inflammation	No report	No report	
Vaginal discharge	No report	No report	
Hemostatic	No reports	No reports	
Nasal congestion	No reports	No reports	

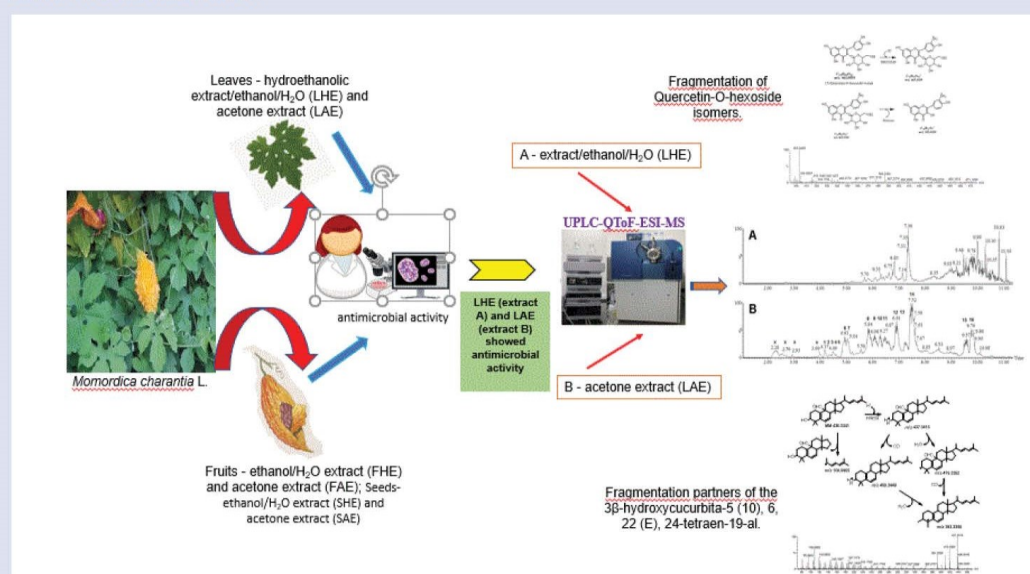
REFERENCES

- Carney J. Navegando Contra a Corrente: o papel dos escravos e da flora africana na botânica do período colonial. *África Rev Estud Africanos*. 2001;22(23):25-47.
- Duke JA. *Handbook of Medicinal Herbs*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2002.
- Matos FJ de A. *Medicinal Plants - Guide for Selection and Employment of Plants Used in Phytotherapy in the Northeast of Brazil*. *Plantas Medicinais - Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas Em Fitoterapia No Nordeste Do Brasil*. 3rd ed. Ceará: Edições UFC; 2007.
- NOBRE GS. *Studies on the Descriptive Collection of Plants of the Ceará Capitania Estudos Sobre a Coleção Descritiva Das Plantas Da Capitania Do Ceará*. Fortaleza: Gráfica Editorial Cearense Ltda.; 1984.
- Biblioteca Nacional. *OS MANUSCRITOS DO BOTÂNICO FREIRE ALEMÃO Catálogo e Transcrição*. Vol 81. (Damasceno D, Cunha W da, eds.). Brasília, Brazil: Biblioteca Nacional, DIVISÃO DE PUBLICAÇÕES E DIVULGAÇÃO; 1961.
- Matos FJA (Francisco J de A, Rocha FD da. *O Formulário Fitoterápico Do Professor Dias Da Rocha : Informações Sobre o Emprego Na Medicina Caseira, de Plantas Do Nordeste, Especialmente Do Ceará*. UFC Edições; 1997 https://books.google.com.br/books/about/O_formulário_fitoterápico_do_professor.html?id=T9JfAAAMAAJ&redir_esc=y. Accessed June 24, 2019.
- Braga R. *Plantas Do Nordeste : Especialmente Do Ceará / Renato Braga. - IJGB - Instituto Histórico Geográfico Brasileiro*. 5th ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró,; 2001. <https://ijgb.org.br/pesquisa/biblioteca/item/14062-plantas-do-nordeste-especialmente-do-ceará-renato-braga.html>. Accessed June 24, 2019.
- Matos FJA (Francisco J de A. *Plantas Da Medicina Popular Do Nordeste : Propriedades Atribuídas e Confirmadas*. Fortaleza: UFC Edições; 1999. https://books.google.com.br/books/about/Plantas_da_medicina_popular_do_nordeste.html?id=f5PINOACAAJ&redir_esc=y. Accessed June 24, 2019.
- Magalhães K do N, Guarniz WAS, Sá KM, et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil. *Ethnopharmacopeia (1980-1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos*. *J Ethnopharmacol*. 2019;237:314-53.
- Olasehinde GI, Ojirongbe O, Adeyeba AO, et al. *In vitro* studies on the sensitivity pattern of Plasmodium falciparum to anti-malarial drugs and local herbal extracts. *Malar J*. 2014;13(1):63.
- Santos KKA, Matias EFF, Sobral-Souza CE, et al. Trypanocidal, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. *Pharm Biol*. 2012;50(2):162-6.
- Wu SB, Yue G, To M-H, Keller A, Lau C, Kennelly E. Transport in Caco-2 Cell Monolayers of Antidiabetic Cucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia* Fruits. *Planta Med*. 2014;80(11):907-11.
- Chen JC, Lau CBS, Chan JYW, et al. The antigluconeogenic activity of cucurbitacins from *Momordica charantia*. *Planta Med*. 2015;81(4):327-32.
- Keller AC, Ma J, Kavalier A, He K, Brillantes AMB, Kennelly EJ. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion *in vitro*. *Phytomedicine*. 2011.

67. Chang C-I, Chen C-R, Liao Y-W, Cheng H-L, Chen Y-C, Chou C-H. Cucurbitane-Type Triterpenoids from *Momordica charantia*. J Nat Prod. 2006;69(8):1168-71.
68. WHO. Selected Medicinal Plants Vol. 4. Essent Med Heal Prod Inf Portal A World Heal Organ Resour. 2005;4:381-99.
69. May M, Schindler C. Clinically and pharmacologically relevant interactions of antidiabetic drugs. Ther Adv Endocrinol Metab. 2016;7(2):69-83.
70. Santos HM dos, Oliveira DF, Carvalho DA de, et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. J Nat Med. 2010;64(2):231-8.
71. Hsu C, Tsai T-H, Li Y-Y, Wu W-H, Huang C-J, Tsai P-J. Wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract and its bioactive components suppress *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. Food Chem. 2012;135(3):976-84.
72. Prasad V, Jain V, Girish D, Dorle AK. Wound-healing property of *Momordica charantia* L. fruit powder. J Herb Pharmacother. 2006;6(3-4):105-15.
73. Hussain F, Teoh SL, Muhammad N, Mazlan M, Latiff AA. *Momordica charantia* ointment accelerates diabetic wound healing and enhances transforming growth factor- β expression. J Wound Care. 2014;23(8):400-7.
74. İlhan M, Bolat İE, Süntar İ, et al. Topical application of olive oil macerate of *Momordica charantia* L. promotes healing of excisional and incisional wounds in rat buccal mucosa. Arch Oral Biol. 2015;60(12):1708-13.
75. Teoh SL, Latiff AA, Das S. The effect of topical extract of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing in nondiabetic rats and in rats with diabetes induced by streptozotocin. Clin Exp Dermatol. 2009;34(7):815-22.
76. Pereira LOM, Vilegas W, Tangerina MMP, et al. Lafoensia pacari A. St-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. J Ethnopharmacol. 2018;219:337-50.
77. Dziato M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. Int J Mol Sci. 2016;17(2):160.
78. Lee J-H, Park J-H, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. Biofouling. 2013;29(5):491-9.
79. Faria RX, Souza ALA, Lima B, et al. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. J Bioenerg Biomembr. 2017;49(6):473-83.
80. Anusuya S, Gromiha MM. Quercetin derivatives as non-nucleoside inhibitors for dengue polymerase: molecular docking, molecular dynamics simulation, and binding free energy calculation. J Biomol Struct Dyn. 2017;35(13):2895-909.
81. Chen H, Ouyang K, Jiang Y, et al. Constituent analysis of the ethanol extracts of *Chimonanthus nitens* Oliv. leaves and their inhibitory effect on α -glucosidase activity. Int J Biol Macromol. 2017;98:829-36.
82. Santos UP, Campos JF, Torquato HF V, et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties as well as the phenolic content of the extract from *Hancornia speciosa* Gomes. Agbor G, ed. PLoS One. 2016;11(12):e0167531.
83. Li M, Xu Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. Arch Pharm Res. 2008;31(5):640-4.
84. Ledoux A, St-Gelais A, Ciekiewicz E, et al. Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*. J Nat Prod. 2017;80(6):1750-7.
85. Pereira AMS, Hernandez C, Pereira SIV, et al. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. Chem Biol Interact. 2014;224:136-41.
86. da Silva ER, Maquiaveli C do C, Magalhães PP. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (Leishmania amazonensis) arginase. Exp Parasitol. 2012;130(3):183-8.
87. Galochkina A V, Anikin VB, Babkin VA, Ostrouhova LA, Zarubaev VV. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis. Arch Virol. 2016;161(4):929-36.
88. Golea L, Benkhaled M, Lavaud C, Long C, Haba H. Phytochemical components and biological activities of *Silene arenarioides* Desf. Nat Prod Res. 2017;31(23):2801-05.
89. Harasstani O, Tham C, Israf D, Harasstani OA, Tham CL, Israf DA. Kaempferol and Chrysin Synergies to Improve Septic Mice Survival. Molecules. 2017;22(1):92.
90. Panlilio BG, Macabeo APG, Knorn M, et al. A lanostane aldehyde from *Momordica charantia*. Phytochem Lett. 2012;5(3):682-4.
91. Vrba J, Kren V, Vacek J, Papouškova B, Ulrichová J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and cyp1a1 expression in HepG2 cells. Phyther Res. 2012;26(11):1746-52.
92. Song JH, Park KS, Kwon DH, Choi HJ. Anti-Human Rhinovirus 2 Activity and Mode of Action of Quercetin-7-Glucoside from *Lagerstroemia speciosa*. J Med Food. 2013;16(4):274-79.
93. Poolperm S, Jiraungkoorskul W. An update review on the anthelmintic activity of bitter gourd, *Momordica charantia*. Pharmacogn Rev. 2017;11(21):31-4.
94. Aljohi A, Matou-Nasri S, Liu D, Al-Khafaji N, Slevin M, Ahmed N. *Momordica charantia* extracts protect against inhibition of endothelial angiogenesis by advanced glycation endproducts *in vitro*. Food Funct. 2018;9(11):5728-39.
95. Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, et al. Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by anti-tumor agents GAP31 and MAP30. Anticancer Res. 2000;20(2A):653-59.
96. Ayyad S-EN, Abdel-Lateff A, Alarif WM, Patacchioli FR, Badria FA, Ezmirly ST. *In vitro* and *in vivo* study of cucurbitacins-type triterpene glucoside from *Citrullus colocynthis* growing in Saudi Arabia against hepatocellular carcinoma. Environ Toxicol Pharmacol. 2012;33(2):245-51.
97. Wang W-D, Liu Y, Su Y, et al. ANITUMOR AND APOPTOTIC EFFECTS OF CUCURBITACIN A IN A-649 LUNG CARCINOMA CELLS IS MEDIATED VIA G2/M CELL CYCLE ARREST AND M-TOR/PI3K/AKT SIGNALING PATHWAY. African J Tradit Complement Altern Med AJTCAM. 2017;14(2):75-82.
98. Chen J-C, Lau C, Chan J, et al. The Antitumor Activity of Cucurbitacins from *Momordica charantia*. Planta Med. 2015;81(04):327-32.
99. Souza PO de, Bianchi SE, Figueiró F, et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in glioma cell lines. Toxicol Vitr. 2018;51:23-33.
100. Forni C, Braglia R, Lentini A, et al. Role of transglutaminase 2 in quercetin-induced differentiation of B16-F10 murine melanoma cells. Amino Acids. 2009;36(4):731-8.
101. Shi Z-H, Li N-G, Tang Y-P, et al. Biological Evaluation and SAR Analysis of O-Methylated Analogs of Quercetin as Inhibitors of Cancer Cell Proliferation. Drug Dev Res.
102. Massi A, Bortolini O, Ragno D, et al. Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents. Molecules. 2017;22(8):1270.
103. Boykin C, Zhang G, Chen YH, et al. Cucurbitacin IIa: a novel class of anticancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. Br J Cancer. 2011;104(5):781-9.
104. Zhao GT, Liu JQ, Deng YY, et al. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems and leaves of *Momordica charantia*. Fitoterapia. 2014;95:75-82.
105. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Sci World J. 2013;2013:1-16.
106. Patel S, Patel T, Parmar K, Bhatt Y, Patel Y, Patel NM. Isolation, characterization and antimicrobial activity of charantin from *Momordica Charantia* Linn. fruit. Int J Drug Dev Res. 2010.
107. Gupta RC, Chang D, Nammi S, Bensoussan A, Bilinski K, Roufogalis BD. Interactions between antidiabetic drugs and herbs: an overview of mechanisms of action and clinical implications. Diabetol Metab Syndr. 2017;9.
108. Akihisa T, Higo N, Tokuda H, et al. Cucurbitane-Type Triterpenoids from the Fruits of *Momordica charantia* and Their Cancer Chemopreventive Effects. J Nat Prod. 2007;70(8):1233-9.
109. Tan MJ, Ye JM, Turner N, et al. Antidiabetic Activities of Triterpenoids Isolated from Bitter Melon Associated with Activation of the AMPK Pathway. Chem Biol. 2008.
110. Kobori M, Nakayama H, Fukushima K, et al. Bitter gourd suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. J Agric Food Chem. 2008;56(11):4004-11.
111. Huang W-C, Tsai T-H, Huang C-J, et al. Inhibitory effects of wild bitter melon leaf extract on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation in mice and cytokine production *in vitro*. Food Funct. 2015;6(8):2550-60.
112. Tsai T-H, Huang W-C, Ying H-T, et al. Wild Bitter Melon Leaf Extract Inhibits Porphyromonas gingivalis-Induced Inflammation: Identification of Active Compounds through Bioassay-Guided Isolation. Molecules. 2016;21(4):454.
113. Yang WS, Yang E, Kim M-J, et al. *Momordica charantia* Inhibits Inflammatory Responses in Murine Macrophages via Suppression of TAK1. Am J Chin Med. 2016;46(2):435-52.
114. Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. Front Pharmacol. 2019;10:486.
115. Chao C-Y, Sung P-J, Wang W-H, Kuo Y-H. Anti-inflammatory effect of *Momordica charantia* in sepsis mice. Molecules. 2014;19(8):12777-88.
116. Raish M, Ahmad A, Ansari MA, et al. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, inflammation, and apoptosis in ethanol-induced gastritis in mucosa through NF- κ B signaling pathway inhibition. Int J Biol Macromol. 2018;111:193-9.
117. Raish M. *Momordica charantia* polysaccharides ameliorate oxidative stress, hyperlipidemia, inflammation, and apoptosis during myocardial infarction by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. Int J Biol Macromol. 2017;97:544-51.
118. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009;8(3):229-35.

119. Soo May L, Sanip Z, Ahmed Shokri A, Abdul Kadir A, Md Lazin MR. The effects of *Momordica charantia* (bitter melon) supplementation in patients with primary knee osteoarthritis: A single-blinded, randomized controlled trial. *Complement Ther Clin Pract*. 2018;32:181-6.
120. Ifeantyi AM, Eboetse YO, Ikechukwu DF, Adewale OA, Carmel NC, Olugbenga OA. Effect of *Momordica charantia* on estrous cycle of sprague-dawley rats. *Pacific J Med Sci*. 2011;8(1):37-48.
121. Deng YY, Yi Y, Zhang LF, *et al*. Immunomodulatory activity and partial characterization of polysaccharides from *Momordica charantia*. *Molecules*. 2014.
122. Kamaraj C, Kaushik NK, Rahuman AA, *et al*. Antimalarial activities of medicinal plants traditionally used in the villages of Dharmapuri regions of South India. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(3):796-802.
123. Amorim CZ, Marques AD, Cordeiro RSB. Screening of the antimalarial activity of plants of the Cucurbitaceae family. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(suppl 2):177-80.
124. I BR, A MO, I AA, W OO. Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. *J Pharmacogn Phyther*. 2011;3(1):1-7.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABOUT AUTHORS



SAGASTEGUI GUARNIZ WILLIAM ANTONIO

Full Professor in the Department of Pharmacology of the Universidade Nacional de Trujillo, Perú since 1993 – to date. I am a licenced Pharmaceutical chemist. Lectures at the Post-Graduate School of Universidade Nacional de Trujillo. Has bachelor in pharmaceutical chemistry 1988. Masters in Chemical Sciences, 1999. Doctorate in Biomedical Sciences, Post-Graduate School of the Universidade Nacional de Trujillo, 2010. Doctorate Studies at Universidade Federal Do Ceará, Brazil, 2015-2018. I am actively involved in research and has presentations in many scientific meetings.



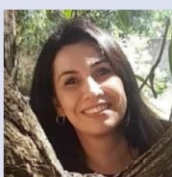
MARY ANNE MEDEIROS BANDEIRA

Mary Anne Medeiros Bandeira holds a degree in Pharmacy from the Federal University of Ceará (1981), a specialist in Pharmaceutical Chemistry (1985) from the Federal University of Minas Gerais, Master's degree (1993) and PhD (2002) in Phytochemistry from the Federal University of Ceará. She teaches Pharmacognosy, Phytotherapy and Phytochemistry at undergraduate and postgraduate levels at the Federal University of Ceará since 1995. Coordinator of the State Committee on Phytotherapy of Ceará and member of the Brazilian Committee on Medicinal Plants. Has experience in Pharmacy, focusing on Green Pharmacies, with research interest in the following areas: Phytotherapy in Public Health, Pharmacovigilance, Quality Control of Medicinal and Phytotherapeutic Plants and Phytochemistry of Natural Products.



KARLA DO NASCIMENTO MAGALHÃES

Karla do Nascimento Magalhães holds a degree in Pharmacy from the Federal University of Ceará - UFC (1999), a Master in Pharmacology from the Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará (2013) and a PhD in Development and Technological Innovation in Medicines from UFC (2019). Pharmacist at Fortaleza City Hall, Member of the State Committee of Phytotherapy of Ceará, Pharmacy of the Medicinal Plants Garden Professor Francisco José de Abreu Matos / UFC. Has experience in Clinical Pharmacy, Clinical Toxicology, Hospital Pharmacy and Ethnopharmacology.



KELLEN MIRANDA SÁ

Kellen Miranda Sá graduated from the Federal University of Ceará (2000), Master in Public Policy and Higher Education Management (2016), Specialist in Natural Products of Plants and Derivatives, Specialist in Hospital Administration. Pharmaceutical Garden of Medicinal Plants Francisco José de Abreu Matos at the Federal University of Ceará, Member of the State Committee on Herbal Medicine of Ceará, Member of the Alliance of International Aromatherapists (AIA-USA), Member Brazilian Association of Aromatherapy and Aromatology (Abraroma). Has experience in Phytotherapy, Aromatherapy, Pharmacotechnics, Cosmetology, Pharmaceutical Clinic and Hospital Pharmacy.



MIRIAN PARENTE MONTEIRO

Graduated in Pharmacy in the Federal University of Ceara (1982), Master degree in Inorganic Chemistry from the Federal University of Ceará (1987), PhD in Pharmacology at Federal University of Ceará (2000). Currently Associate Professor, level IV at Federal University of Ceará. Experience in Pharmacy with research themes in the following areas: pharmaceutical care, rational use of medicines, pharmaceutical assistance and drug information center. Collaborator Professor of Doctorate at the Postgraduate Program in Development and Technological Innovation in Medicines. Coordinator of the Group on Prevention of Inappropriate Use of Medicines, an Extension Program of the Federal University of Ceará.



PATRICIA GEORGINA

Bachelor in Chemistry from the Federal University of Ceará (2010), Master (2012) and Doctorate (2018) in Chemistry with concentration in Organic Chemistry from the same University. She is the current laboratory technician/phytochemist at the Laboratory of Natural Products in the Abreu Matos Medicinal Plant Garden of the Federal University of Ceará. She currently executes research projects aimed at the phytochemical characterization of medicinal plants. Has experience in Chemistry, focusing on Organic Chemistry, particularly focused on Natural Products, Organic Synthesis and Medicinal Plants.



NADIA ACCIOLY PINTO NOGUEIRA

Bachelor Degree in Industrial Chemistry from the Federal University of Ceará (1979), Master in Food Technology (1985) and PhD in Biochemistry from from the same University (1999). Full Professor at the Federal University of Ceará where she lectures at undergraduate and postgraduate levels. Has experience in Microbiology and Molecular Biology, with emphasis on Antimicrobial Activity and Bacterial Resistance. She is coordinator of the Applied Microbiology Research Laboratory and of the Molecular Biology Laboratory of Microorganisms of the Federal University of Ceará.



GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

Graduated in Pharmacy (Clinical Analysis), Master and PhD in Pharmaceutical Sciences from the Federal University of Ceará. Member of the Research group of the applied microbiology laboratory at Pharmacy (LabMicro). Member of the Ateneu Faculty graduate faculty. Has experience in Community Pharmacy, teaching at technical and higher levels. His research interests are: antimicrobial and antifungal activity of natural products and mechanism of action.



HILANIA VALÉRIA DODOU

Graduated in Pharmacy from the Federal University of Ceará - UFC (2014). Specialist in Clinical Cytology at Ateneu College (2015) and in Higher Education Teaching at Integrated College of Brazil (2016). Master in Pharmaceutical Sciences from UFC (2017). She is currently a PhD student in the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences at UFC. Has experience in Pharmacy, focusing on Applied Microbiology, developing research with antimicrobial activity, mechanism of action and toxicity of natural products



SIKIRU OLAITAN BALOGUN

I have Bachelor (Hons) and Masters (Biochemistry) degrees from Olabisi Onabanjo University, Ago-Iwoye (Nigeria) (Formerly Ogun State University) and a PhD in Health Sciences (Pharmacology area) from the Faculty of Medicine of the Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). I had lectured at Kampala International University, Uganda (2006 – 2010). Had taught and currently teaching Biochemistry, Pharmacology, Molecular Biology and other related medical sciences courses at both undergraduate and post-graduate levels. Presently lecturer at Faculdade Noroeste do Mato Grosso- AJES. Over 13 years of teaching and research experience. My teaching and research experience covers biochemistry, molecular biology, molecular epidemiology (microbiology), natural product pharmacology, ethnopharmacology, ethnobotanical, medicinal plant bioprospecting, in vitro and in vivo experimental models. Research interests includes molecular epidemiology (bacterial resistance), antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer, activities, ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity studies of medicinal plants.



Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro

Bachelor Degree in Industrial Chemistry from the Federal University of Ceará - UFC (2008), Master (2010) and Ph.D. in Natural Products from UFC (2016). Currently works with an emphasis on Natural Product, mainly in plant and fungal research. He works as Analyst B at the Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa. Has experience in mass spectrometry using instruments UPLC-Q-TOF, Waters, and LC-MS-Iontrap, Agilent, Infrared and in High-Performance Liquid Chromatography.

Cite this article: Guarniz WAS, Canuto KM, Ribeiro PRV, Dodou HV, Magalhaes KN, Sa KM, et al. *Momordica Charantia* L. Variety from Northeastern Brazil: Analysis of Antimicrobial Activity and Phytochemical Components. *Pharmacog J.* 2019;11(6):1312-24.

Pharmacognostic Evaluation of Bitter Melon from Brazilian Northeast (*Momordica charantia* L.): Identification of Momordicin II

William Antonio Sagástegui Guarniz¹, Lídia Audrey Rocha Valadas, Karine Lima Silva, Karla Do Nascimento Magalhães, Raimundo Braz Filho, Patrícia Georgina Garcia do Nascimento, Mirian Parente Monteiro, Mary Anne Medeiros Bandeira
Development of Drugs, Dentistry and Nursing College, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, BRAZIL

ABSTRACT

Objectives: To perform a pharmacognostic evaluation of bitter melon from Brazilian northeast (*Momordica charantia* L.) **Methods:** The botanical materials used consisted of leaves of *Momordica charantia* L., microcarpa and macrocarpa varieties collected in the period of flowering and fruiting. For the collection of the leaves was used pruning shears and for herborization were followed the usual procedures in this type of collection. The studies were carried out with the fresh leaves of these two varieties of *Momordica charantia* L. to do the macro and micro morphological analysis.

Results: the micro morphological analysis showed that the main differential parameter is that in the macrocarpa variety the trichomes are less frequent and are of the short multicellular type with 3 to 5 cells, whereas the microcarpa variety the trichomes are of the long multicellular type with 7 to 11 cells. The phytochemical approach has shown that the two varieties have in common alkaloids, steroids, terpenoids, flavonoids, saponins, phenolic compounds, condensed tannins and flavonoids. **Conclusion:** Momordicin II

(C₂₆H₃₈O₉) was isolated and identified in the microcarpa variety by means of ¹H-NMR and ¹³C-NMR and 2D structure similar to that found in the variety of Asian origin.

Key words: *Momordica charantia*, Pharmacognostic, Momordicin II Natural Products, Pharmacognosy

Correspondence

Dr. William Antonio Sagástegui Guarniz,

Development of Drugs, Pharmacy, Dentistry and Nursing College, Federal University of Ceara, 1210 Capitaó Francisco Pedro, Fortaleza-60430370, CE, BRAZIL.

Phone: +55 85 33668000

Email: williamantoniosag@gmail.com

DOI: 10.5530/jyp.2019.11.75

INTRODUCTION

In Brazil, *Momordica charantia* L. from the family Cucurbitaceae, is a climbing plant found with wide frequency covering fences and shrubs along the paths from north to south of the country, especially after the rainy season. The plant is easily recognized for its multipart leaves, small isolated yellow flowers and fusiform fruits of 4 to 5 cm, which, when ripe, open exposing seeds coated with a red aryl light, very sought after by birds and children and its foliage is highly estimated in the rural population due to the efficacy of the homemade preparations used against ectoparasites of man and animals, in the form of baths and compresses. It is a species native to Africa that was introduced in South America in the colonial period through the trafficking of black slaves brought from that continent, especially in the Northeast of Brazil.¹ Twelve varieties of this species are known, two of which are distinguished mainly by the size of the fruits. A short fruit, 3-7 cm in length, designated as microcarpa variety whose occurrence is most common in South America, popularly known as melão-de-são-caetano and the long fruit, 14-15 cm in length, referred to as the macrocarpa that occurs most commonly in Asia where it is designated by the names of Balsam pear, Bitter cucumber, Bitter gourd, Foo gwa, Karela, La-kwa and used as edible and medicinal,^{2,3} (Figure 1).

The growing number of year-to-year research on this species demonstrates the great interest aroused by its pharmacological and chemical studies among researchers,⁴⁻¹³ for example.

Among the various constituents identified in the leaves, we can highlight as characteristic of *M. charantia* the momordicines I, II and III. The structures of the momordicines I and II were elucidated as 3β, 7β, 23] trihydroxycucurbita-5, 24-dien-19-al and its 23-O-β- glucopyranoside,

respectively. The momordicine III was isolated as acetate of 23-O-β- glucopyranoside of 3β, 7β, 23]- trihydroxy-24-oxo-cucurbita-5,25-dien-19-al. The mixture of these three components is called curcubitacin.¹⁴

In these works, the origin of the plant studied is not informed, although it can be deduced, with some degree of security, by the names of the authors, titles of the periodicals and countries where the research was carried out. It was thus verified that the great majority of the studies was developed with plants collected in Asia, that is, with great probability of being of the macrocarpa variety. Few are the works about the constituents and the pharmacological properties of the microcarpa variety of South America. The introduction of the Asian macrocarpa variety in the Horticulture of Medicinal Plants Prof. Francisco José de Abreu Matos from the Federal University of Ceara was given by the referred professor, when receiving a copy of the fruit of Altamira-Pará-Brazil, with the information that native Indians of the region were using the fruits as food, from cultivation coming from seeds provided by Japanese visitors, which served as a stimulus for the more detailed study of the microcarpa variety, as well as to determine pharmacognostic parameters between these two varieties, now presented, allowing its comparison with the data recorded in the literature.

MATERIALS AND METHODS

Botanical materials

The botanical materials used consisted of leaves of *Momordica charantia* L., microcarpa and macrocarpa varieties collected from specimens of the

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.



Figure 1: Photos F. J. A. Matos: *Momordica charantia* L. microcarpa (1- short fruits) and macrocarpa varieties (2- long fruits).

Horticulture of Medicinal Plants Prof. Francisco José de Abreu Matos from the Federal University of Ceara, in the period of flowering and fruiting. For the collection of the leaves was used pruning shears and for herborization were followed the usual procedures in this type of collection.¹⁷ The exsiccates of *Momordica charantia* L. collected are deposited in the Herbarium Prisco Bezerra of the Federal University of Ceara under the numbers EAC31608, EAC31609, EAC16698 and EAC12887.

The studies were carried out with the fresh leaves of these two varieties of *Momordica charantia* L.

Macro and Micromorphological Analysis

The macromorphological analyzes were performed with the fresh leaves to the naked eye, proceeding to the general descriptions of each part, concomitantly, comparing the leaf characteristics of the *M. charantia* macrocarpa and microcarpa varieties.

For the micromorphological analysis, the leaves were cross-sectioned, which were fixed in 70% formaldehyde / acetic acid (FAA) for 48 hr and later, stored in alcohol 70%. Semi-permanent blades with section sections of 5µm were obtained from Leica 2065 microtome, clarified in 20% sodium hypochlorite, then washed in distilled water, bathed in acidified water and again in distilled water.¹⁸ The sections were stained with toluidine blue and analyzed using a Leica DM 4000B Led Optical Microscope and compared with the literature data.¹⁹

Preliminary phytochemical approach

For the accomplishment of preliminary phytochemical comparative analyzes between two varieties of *M. charantia*, microcarpa and macrocarpa, tests were carried out to determine groups of chemical substances common in plants, according to the methodology described by:²⁰ All experiments were performed in triplicate.

Obtaining Momordicine II

Fresh leaves (500g) of *Momordica charantia* L, microcarpa variety, were extracted by maceration in 1L of ethanol (96.5° GL) for 48 hr. The 50% ethanolic extract obtained was submitted to evaporation with the aid of a rotary evaporator. During this evaporation process, precipitation of off-white solid was observed. Thereafter, the procedure was interrupted and still in the flask, the supernatant alcohol phase was removed, to isolate the solid precipitate. This precipitate was washed successively with solvents of increasing polarities such as hexane, dichloromethane and acetone, to obtain a white solid encoded as (MSC). For the structural determination of this isolated substance (MSC), white amorphous solid, melting point 220-221°C, we adopted a comparative analysis of MSC spectral data with those of momordicine I (Mo-1) and momordicine II (Mo-2), Table 2.

The one-dimensional and two-dimensional Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (NMR¹H) and Carbon 13 (NMR¹³C) spectra were obtained on Bruker spectrometers, models DPX-300 and DRX-500, operating at a frequency of 300 and 500 MHz for hydrogen and 75. and 125 MHz for carbon 13, both belonging to the Northeastern Center for the Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance (CENAUREN), from the Department of Organic and Inorganic Chemistry of the Federal University of Ceara.

The analytical procedure adopted, then, involved the comparison of the NMR¹H (Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen) and NMR¹³C (Nuclear Magnetic Resonance of Carbon) of MSC, momordicine I (Mo-1) and momordicine II (Mo-2), interpreted with the contribution of two-dimensional (2D) spectra of heteronuclear correlation ¹H-¹³C-COSY-ⁿ_{CH} [n=1, HMQC (H-detected heteronuclear Multiple Quantum Coherence); n=2 e 3, HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)] e homonuclear ¹H-¹H-COSY (Correlation Spectroscopy of hydrogen and hydrogen, scalar spin-spin interaction) and ¹H-¹H-NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Hydrogen and hydrogen Spectroscopy, dipole interaction promoted by spatial proximity), using deuterated pyridine (C 5 D 5 N) to obtain the spectra.

RESULTS

Macroscopic and Microscopic Parameters

The leaves of *Momordica charantia* L. of the macrocarpa and microcarpa varieties show the following common macroscopic characteristics: Are alternate, membranous, petiolate, orbicular limb, slightly toothed margin, obtuse apex and truncated base. They measure 6 to 12 cm in length and 8 to 12 cm in diameter, are multi-ribbed, with 5 to 7 angular lobes, separated by deep furrows. In both varieties, the upper face is slightly pubescent and the lower side is more densely hairy along the veins.

It was observed that the main differential macroscopic parameter between the leaves of the two varieties is that the leaves of the macrocarpa variety are larger than those of the microcarpa variety, as can be seen in the xeroexsicate (Figure 2). It is worth mentioning that the term and technique of xeroexsicates were elaborated by Professor Francisco José de Abreu Matos, this being a useful procedure to visualize the original morphological characters of the plant, which are often lost by drying the material after the preparation of conventional exsiccata. It is the colored photocopy of the part of the plant to be studied.²¹

The micromorphological analyzes of the leaves of *Momordica charantia* L, macrocarpa and microcarpa varieties present the following common anatomical characteristics: the upper and lower epidermis consist of a

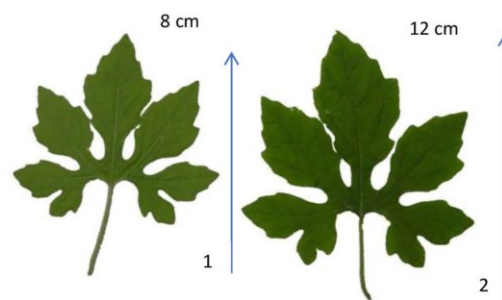


Figure 2: Xeroexsicate of the adult leaves of *Momordica charantia* L. microcarpa (1) - 8 cm and macrocarpa varieties (2) - 12 cm.

layer of polygonal cells. The mesophyll is narrow and compact, with few intercellular spaces. Its structure is dorsiventral, presenting palisade parenchyma constituted by a layer of elongated cells, of thin walls compactly arranged. The lacunar parenchyma is formed by several layers of cells of rounded to slightly elongated shape and looser arrangement. In the region of the midrib it is observed a single and small bicollateral bundle, immersed in parenchyma tissue. Below the epidermis occurs two layers of collenchyma, narrower on the adaxial side, as observed by:¹⁹ Rare short pedicled glandular hairs.

Comparative Phytochemical Approach

According to the results shown in Table 1, the phytochemical approach has shown that the two varieties have in common: alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, phenolic compounds, condensed tannins and flavonoids.

Structural determination of MSC (momordicine II)

The NMR¹H spectrum of MSC showed signals for hydrogens of five methyl groups bonded to quaternary carbons (δ 0,94 (s), 1,22 (d, 7,8), 1,51 (s), 1,21 (s), 0,91 (s)); and two more of these methyl groups are attached to an olefinic carbon (δ 1,79 (s), 1,71 (s)); three hydrogens linked to carbons with hydroxyls (δ 3,84 (sl) and 4,38), where one of which is adjacent to the olefinic hydrogen. It is observed a hydrogen bonded to a formyl group (δ 10,63) bonded to quaternary carbon, (Figure 3).

The NMR¹³C spectrum showed signals for six quaternary carbons (δ 43,21, 147,14, 52,03, 47,35, 49,72, 133,66), ten methylene carbons (δ 77,07, 125,75, 67,17, 52,10, 38,29, 52,71, 34,12, 77,07, 130,58), where among them is the aldehyde carbon in δ 209,27; seven methylene carbons (δ 23,20, 29,26, 24,14, 31,07, 36,38, 31,38, 31,34, 45,2). It was observed the presence of carbons related to the β -Glucopyranosyl group (δ 105,62, 76,65, 80,37, 73,31, 79,70), (Figure 4).

Table 1: Prospection of the chemical constituents present in the leaves of *Momordica charantia* L. macrocarpa (MCMa) and microcarpa (MCMi) varieties.

TESTS	(MCMa)	(MCMi)
Alkaloids	+	+
Anthocyanidins	0	0
Anthocyanins	0	0
Antranols	0	0
Aurones	0	0
Quaternary bases	0	0
Catechins	0	0
Chalcones	0	0
Cumarines	0	0
Steroids	+	+
Free phenols	+	+
Flavonoids	+	+
Cyanogenic heterosides	0	0
Leucoantocianidines	0	0
Resins	0	0
Saponins	+	+
Condensed tannins	+	+
Pyrogallics tannins	0	0
Triterpenoids	+	+
Xanthones	0	0

Caption: positive (+); negative (0).

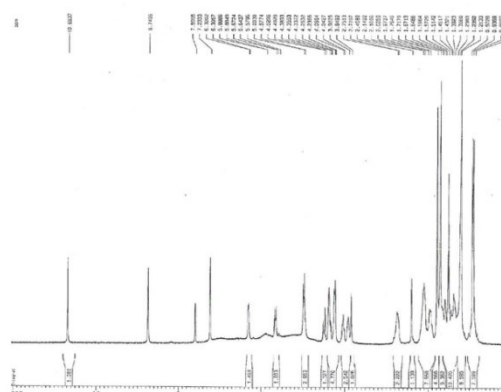


Figure 3: NMR¹H of MSC compound in deuterated pyridine, momordicine II, present in the leaves of *Momordica charantia* L. microcarpa varieties (MCMi).

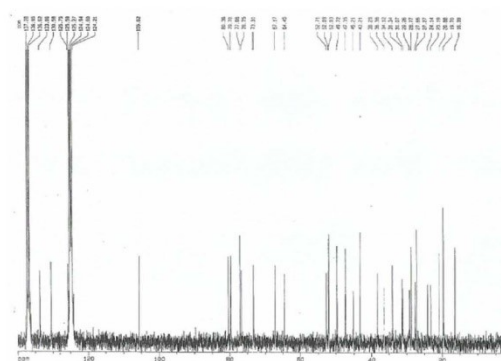


Figure 4: NMR¹³C of MSC compound in deuterated pyridine, momordicine II, present in the leaves of *Momordica charantia* L. microcarpa varieties (MCMi).

On Table 2 it's possible to see the comparison of the spectral data with of momordicine I (Mo-1) and momordicine II.

DISCUSSION

The knowledge about medicinal plants often is on result of the alternatives therapeutic resources of various communities and ethnic groups. In poorer regions and even large Brazilian cities, medicinal plants are commercialized in open markets, popular markets and found in residential yards.²²

Many exotic vegetables are known for their biological properties. Bitter Melon (*Momordica charantia* L.), is a good example. This specie has nutritional and medicinal qualities and is commonly found in China, India and Africa. It is a flowering vine and contains an array of novel and bioactive phytochemicals.^{23,24}

The main differential parameter between the varieties is that in the macrocarpa variety the trichomes are less frequent and are of the short multicellular type with 3 to 5 cells, while those of the microcarpa variety are of the long multicellular type with 7 to 11 cells and are rarely starry. From the organoleptic characteristics of the analyzed leaves and stems,

Table 2: Spectral data of NMR¹H and NMR¹³C of MSC.

	MSC, in C ₅ D ₅ N				in C ₅ D ₅ N	
	¹ H- ¹³ C-COSY- ¹ J _{CH}		¹ H- ¹³ C-COSY- ⁿ J _{CH}		Mo-1	Mo-2
	δ _c	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _c	δ _c
C						
4	43.21	-	3H-28; 3H-29		41.79	41.95
5	147.14	-	H-7; 3H-28; 3H-29		145.73	148.30
9	52.03	-	H-8		50.61	34.41
13	47.35	-	3H-18		45.76	46.43
14	49.72	-	H-8; 3H-30		48.28	48.46
25	133.66	-	3H-26; 3H-27		69.72	130.84
CH						
3	77.07	3.84(sl)	3H-28; 3H-29		75.68	76.05
6	125.75	6.31(d, 4.3)	H-7		124.29	121.03
7	67.17	4.38	H-8		65.73	72.55
8	52.10	2.41	H-19; 3H-30		50.66	48.14
10	38.29	2.73(s)	H-8		36.90	39.29
17	52.71	1.60	3H-18; 3H-21		50.15	51.34
19	209.27	10.63(s)			207.81	-
20	34.12	2.20	3H-21		36.58	32.99
23	77.07	4.98	H-1 ²		124.23	65.31
24	130.58	5.66 (d, 8.6)	3H26; 3H-27		141.73	131.83
CH₂						
1	23.20	2.10; 1.75			21.76	21.72
2	29.26	1.50			29.94	30.12
11	24.14	1.68; 1.60			22.71	28.23
12	31.07	1.97	3H-18		29.44	32.89
15	36.38	1.40	3H-30		34.96	34.82
16	31.34	2.10; 1.70			27.75	30.65
22	45.21	2.10; 1.25	3H-21		39.56	45.51
CH₃						
18	16.39	0.94(s)			15.05	15.64
19	-	-			-	29.33
21	20.87	1.22(d, 7.8)			18.96	19.31
26	19.70	1.79(s)	3H-27		30.85	25.79
27	27.26	1.71(s)	3H-26		30.85	18.10b
28	27.66	1.51(s)	3H-29		26.24	26.34
29	28.77	1.21(s)	3H-28		27.39	28.38
30	19.70	0.91(s)	H-8		18.20	18.07b
Polysaccharides						
1'	105.62	4.99 (d, 7.7)			-	101.20
2'	76.65	4.05	H-3'		-	75.12
3'	80.37	4.24			-	78.77
4'	73.31	4.24			-	71.93
5'	79.70	3.92			-	78.50
6'	64.44	4.50 (d, 11.3), 4.34			-	62.82

the bitter taste, the dark green color and the odor were similar in both varieties of *M. charantia* L.

In a phytochemical approach of the leaves of *Momordica charantia* L. microcarpa variety,¹⁹ reports not having detected the presence of alkaloids. It should be noted that the alkaloids detected in the present study were revealed with Dragendorff, Hager and Mayer reagents, highlighting the characteristic smoke odor in the extracts prepared for analysis, which may also contribute to the indication of the presence of this chemical class.

The comparison of the spectral data with those of momordicine I (Mo-1) and momordicine II (MO-2) leads to conclude that the substance encoded as MSC, C₃₅H₅₈O₉, is the glycosylated tetracyclic triterpene (3 α , 7 β , 23] trihydroxy-cucurbitane-5,24-dien-19 α)-23-O- γ -glucopyranoside), whose common name is momordicine II, with similar structure to those found in plants of *M. Charantia* L. of Asian origin, by other authors.^{16,25,26} (Table 2).

The phytochemical tests performed in the present work revealed the presence of alkaloids, steroids, triterpenoids, saponins, phenolic compounds, condensed tannins and flavonoids in *Momordica charantia* L., Table 1. According to these results, the same secondary metabolites were found in fractions of *M. charantia* plant collected in northeastern Brazil.²⁷ Silva, 2018 reports that tests performed on the collected species revealed the presence of flavonoids, tannins and alkaloids. In a phytochemical approach also from the leaves of *Momordica charantia* L.,¹⁹ obtained positive results for the flavonoid, saponin, tannin and steroid / triterpene groups, but, contrary to the works cited, reports not having detected the presence alkaloids, which may be related to the collection time or some phytoecographic factor.²⁸

CONCLUSION

The phytochemical approach, with the results of the characterization of similar chemical classes among the studied varieties of *Momordica charantia* L., as well as the identification of momordicine II, also in the microcarpa variety, reflect the chemotaxonomic relationship between the macrocarpa and microcarpa varieties. Because they are botanically distinct, it is necessary to continue studies to observe other parameters from the chemical and pharmacological point of view. The identification of momordicine II in the microcarpa variety is being reported for the first time in the literature. The information presented here also contributes to the importance of distinguishing these varieties when scientific articles are published with the species.

ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge Federal University of Ceara.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ABBREVIATIONS

CENAUREN: Northeastern Center for the Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance; *M. charantia*: *Momordica charantia*; MQC: Multiple Quantum Coherence; NMR: Nuclear Magnetic Resonance.

REFERENCES

- Duke JA, Bogenschutz-Godwin M, DuCellier J, Duke PA. CRC Handbook of Medical Herbs. Second edition. Boca Raton, FL: CRC Press. 2000;78-80 1985;315-4.
- Weebach MR, Murray MT. Botanical Influences on Illness. Tarzana, CA: Third Line Press. 1994;1399-41.
- Grover J, Yadav S. Pharmacological actions and potencial uses of *Momordica charantia*: A review. J Ethnopharmacol. 2004;93(1):123-s32.
- Lee-Huang S, Huang P, Huang P, Bourinbaier A, Hao-Chia CH, Hsiang-Fu K. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(19):8818-22.
- Seham B, El-Gengaihi S, Shabrawya O. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2006;108(2):236-42.
- Nguyen N, Phan K, Chau M, Ninh B, Nguyen C, Nguyen T, et al. α -Glucosidase Inhibition Properties of Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides from the Fruits of *Momordica charantia*. Chem Pharm Bull. 2010;58(5): 720-4.
- Gupta S, Raychaudhuri B, Banerjee S, Das B, Mukhopadhyaya S, Datta S. Momordicin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent anti *Leishmania* agent. Parasitol Internat. 2010;59(2):192-7.
- Singh J, Cumming E, Manoharan G, Kalasz H, Adeghate E. Medicinal Chemistry of the Anti-Diabetic Effects of *Momordica charantia*: Active Constituents and Modes of Actions. The Open Medic Chem J. 2011;5 (Supple 2):70-7.
- Zafar A, Manjeet S, Sharma P. Neuroprotective effect of *Momordica charantia* in global cerebral ischemia and reperfusion induced neuronal damage in diabetic mice. J Ethnopharmacol. 2011;133(2):729-34.
- Yeh-Lin L, Yuh-Hwa L, Wen-Li L, Jong-Ho CH, Kur-Ta CH, Hong-Jen L, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of different wild bitter gourd cultivars (*Momordica charantia* L. var. abbreviata Seringe). Botanic Stud. 2011;52(4):427-34.
- Ullah M, Showkat M, Uddin N, Saiful I, Nurul A. Evaluation of *Momordica charantia* L. fruit extract for analgesic and anti-inflammatory activities using *in vivo* assay. Res J Medic Plant. 2012;6(3):236-44.
- Hyun Y, Seung M, Sanghyun L, Kye M, Eun J. The butanol fraction of Bitter Melon (*Momordica charantia*) scavenges free radicals and attenuates oxidative stress. Prev Nutr Food Sci. 2013;18(1):18-22.
- Hsian-Yi W, Wei-Chin K, Tain-Junn C, Sung-Hsun Y, Liang-Hao C, Jiunn-Jye CH. Differential anti-diabetic effect and mechanism of action of charantin-rich extract of Taiwanese *Momordica Charantia* between type 1 and type 2 diabetic mice. Food and Chem Toxicol. 2014;69:347-56.
- Dandawate P, Subramaniam D, Padhye S, Anant S. Bitter melon: A panacea for inflammation and cancer. Chin J of Natur Medic. 2016;14(2):81-100.
- Svobodova B, Barros L, Calhelha R, Heleno S, Alves M, Walcott S, et al. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. Indust Crops and Prod. 2017;95:365-73.
- Yasuda M, Iwamoto M, Okabe H, Yamauchi T. Structures of Momordicines I, II and III, The bitter principles in The leaves and vines of *Momordica charantia* L. Chem Pharm Bull. 1984;32(5):2044-7.
- Instituto de Botânica (São Paulo). Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico. 1984;61. (Manual N° 4).
- Oliveira F, Akissue G. Fundamentos de Farmacobotânica. Ed. Atheneu, São Paulo. 1993;216.
- Zocoler AMD, Mourão KSM, Mello JCP, Marques LC. Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). Acta Farm Bonaerense. 2006;25(1):22-7.
- Matos FJA. Introdução a Fitoquímica Experimental. 3 ed, Editora UFC. 2009;150.
- Matos FJA. Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Editora UFC. Fortaleza. 2007;365.
- Soares F, Freire N, Souza T. Pharmacognostic evaluation and analysis of labels of the medicinal plants Boldo-do-Chile (*Peumus boldus* Molina) and Charnornil (*Matricaria recutita* L.), commercialized in Fortaleza, Ceará State, Brazil. Ver Bras Plant Medic. 2015;17(3):468-72.
- Islam S, Jalaluddin M. Biological Functions and Sensory Attributes of Different Skin Colored Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) Varieties. Ann J Food Sci H. 2019;5(2):25-31.
- Madala NE, Piater L, Dubery I, Steenkamp P. Distribution patterns of flavonoids from three *Momordica* species by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry: A metabolomic profiling approach. Rev Bras Farmac. 2016;26(4):507-13.
- Puspawati N. Isolation and identification momordicin I from leaves extract of *Momordica charantia* L. J Kimia. 2008;2(1):53-6.
- Weng J, Bai L, Lin W. Identification of a Triterpenoid as a Novel PPAR γ Activator Derived from Formosan Plants. Phytother Res. 2017;31(11): 1722-30.
- Costa JGM, Nascimento EMM, Campos AR, Rodrigues FFG. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) extracts and fractions. J Basic Clin Pharm. 2011;2(1):45-51.
- Silva CCDC. Análise fitoquímica e avaliação toxicológica do extrato de *Momordica charantia* frente ao microcrustáceo *Artemia* Salina Leach. Universidade Federal De Pernambuco. 2018.

Article History: Submission Date : 09-06-2019; Revised Date : 20-07-2019; Acceptance Date : 24-09-2019.

Cite this article: Guarniz WAS, Valadas LAR, Silva KL, Magalhães KN, Filho RB, Nascimento PGG, Monteiro MP, Bandeira MAM. Pharmacognostic Evaluation of Bitter Melon from Brazilian Northeast (*Momordica charantia* L.): Identification of Momordicin II. J Young Pharm. 2019;11(4):366-70.