



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO  
VEGETAL E FORMULAÇÕES TÓPICAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
A PARTIR DE *Momordica charantia***

Recife  
2018

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO  
VEGETAL E FORMULAÇÕES TÓPICAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
A PARTIR DE *Momordica charantia***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo.

Recife  
2018

Catálogo na fonte:

bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

B817o Brandão, Deysiane Oliveira.

Obtenção e caracterização de insumo farmacêutico ativo vegetal e formulações tópicas com atividade antimicrobiana a partir de *Momordica charantia* / Deysiane Oliveira Brandão. – Recife: o autor, 2018.

189 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Rui Oliveira Macêdo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Inclui referências e apêndices.

1. *Momordica charantia*. 2. Termogravimetria. 3. Taninos. 4. Extratos vegetais. 5. Géis. I. Macêdo, Rui Oliveira (orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)  
217)

UFPE (CCS 2018 -

DEYSIANE OLIVEIRA BRANDÃO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO  
VEGETAL E FORMULAÇÕES TÓPICAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
A PARTIR DE *Momordica charantia***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica.

Aprovado em 17 de maio de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo (Presidente e Orientador)  
Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dra. Beate Saegesser Santos (Avaliadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Marta Maria da Conceição (Avaliadora Externa)  
Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros (Avaliadora Externa)  
Universidade Estadual da Paraíba

---

Prof. Dra. Cinthya Maria Pereira de Souza (Avaliadora Externa)  
Universidade Estadual da Paraíba

Dedicatória

Ao meu Pai Celestial, amigo e conselheiro, Deus;

Aos meus Pais Ednado e Goretti

A minha vó Geralda

A minha tia Célia Maria (*In memoriam-09/11/2017*)

## AGRADECIMENTOS

Ao amor da minha vida, aquele que é a minha inspiração, a minha força, o meu socorro bem presente, ao meu melhor amigo, ao meu salvador Jesus Cristo, por toda força e graça que me fez caminhar e finalizar mais essa etapa.

A minha família pela minha formação de caráter e por todo apoio em todas as áreas da minha vida, em especial a meus pais Ednaldo e Goretti, a minha avó Geralda e a minha tia Célia (*In memorian*) por todo esforço que fizeram durante este tempo.

Ao meu Orientador Rui Oliveira Mâcedo, por toda confiança, dedicação e disponibilidade fornecida durante esses quatro anos.

A Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou, por sua amizade, dedicação, confiança, paciência, estímulo à pesquisa, por tudo que conquistei durante esse tempo e por ter se tornado um exemplo para minha vida.

Aos meus companheiros de apartamento e de vida Fernando e Monik.

Aos colegas dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LUDEM) em especial a Nathála, Rayane, Ravelly, Geovani, Taynara, Fabrício, Venâncio, Lázaro, Ertha, Glória e Jdon por todo apoio durante esse tempo.

Ao pessoal do LABDEM/LQAQ por todo apoio e confiança que recebi durante esses anos, obrigada por tudo que vocês representam na minha vida.

A turma do doutorado 2014 do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFPE).

Ao pessoal do Prosangue diagnóstico, por todo conhecimento passado e por toda confiança recebida.

A professora Beate Saegesser pela grande disposição de estar participando desse momento final.

A professora Marta Maria da Conceição por diversos conhecimentos passados e pela disponibilidade de participar dessa banca.

A professora Cinthya Maria por toda amizade fornecida ao longo desses anos e que representa o início da minha vida científica.

Ao grande professor Ivan Coelho Dantas (*In memorian*), pelo lindo trabalho que executou, assim como por despertar o interesse pelas plantas medicinais.

A Universidade Federal da Paraíba e Universidade Estadual da Paraíba por me fornecer a estrutura física necessária a realização dos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela oportunidade de ingresso no Doutorado.

A Nerilin, secretária do PPGCCF/UFPE, por toda dedicação e paciência.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento da pesquisa.

## RESUMO

*Momordica charantia* é uma espécie amplamente utilizada na medicina popular, e os seus benefícios medicinais são bem documentado, incluindo a atividade antimicrobiana. Sendo esse vegetal uma grande fonte de compostos fitoquímicos, esse trabalho propõe o desenvolvimento de metodologias analíticas visando à caracterização de Ingrediente Ativo Vegetal, assim como desenvolver formulações derivadas dessa espécie. As folhas e frutos foram coletados na região do semiárido da Paraíba, Brasil. A droga vegetal foi obtida em diferentes tamanhos de partículas. Foram produzidos em três lotes extratos hidroalcoólicos (50%) das folhas e dos frutos e em seguida submetido à secagem em *spray dryer*. Determinou-se a atividade antimicrobiana das drogas através do método de microdiluição; a citotoxicidade das drogas vegetais foi obtida utilizando o método de hemólise, enquanto que para determinação dos extratos secos foi utilizado o método MTT. O conteúdo de metabólitos secundários das amostras foi mensurado por meio de espectroscopia na região do visível. As drogas vegetais e os extratos foram submetidos a técnicas termoanalíticas e identificado o perfil pirolítico. A Ressonância Magnética Nuclear foi realizada com a finalidade de apontar o perfil químico das drogas vegetais. Foi realizado o desenvolvimento e validação do doseamento microbiológico dos extratos. O estudo de compatibilidade fármaco/excipiente foi realizado aplicando técnicas termoanalíticas. Ademais, foram desenvolvidos e caracterizados dois géis com o extrato da folha e do fruto. As drogas vegetais inibiram o crescimento dos microrganismos testados. Em nenhuma das concentrações utilizadas, as drogas e os extratos apresentaram citotoxicidade acima de 50%. As amostras obtiveram concentrações significativas de metabólitos secundários. Os diferentes tamanhos de partículas apresentaram perfis diferentes. Em relação aos extratos observou-se equivalências quanto aos dados a entre os lotes diferenciados. Quanto ao doseamento microbiológico, esse apresentou-se dentro das especificações. No estudo de compatibilidade os excipientes que se apresentaram compatíveis foram utilizados no desenvolvimento das formulações tópicas, apresentando-se dentro das especificações. Assim, estudos que mostrem o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, bem como a caracterização e padronização dos ingredientes ativos vegetais são importantes, devido falta de metodologia oficial que comprove a qualidade, segurança e eficácia de destes produtos.

**Palavras-chave:** *Momordica charantia*. Termogravimetria. Taninos. Extratos vegetais. Géis.

## ABSTRACT

*Momordica charantia* is a widely used species in folk medicine, with its medicinal benefits being well documented, including an antimicrobial activity. As this plant is a great source of phytochemical, pharmacological and toxicological compounds, the objective of this work is the development of analytical methodologies for the characterization of Active Vegetal Ingredient, as well as formulations derived from this species. The leaves and fruits of *M. charantia* were collected in the semi-arid region of Paraíba, Brazil. The plant drug was obtained in different particle sizes. Hydroalcoholic extracts (50%) of the leaves and fruits were produced in three batches and then dried in a spray dryer. The antimicrobial activity of the drugs was determined by the microdilution method; the cytotoxicity of the plant drugs was obtained using the hemolysis method, whereas the MTT was used for the determination of dry extracts. The content of secondary metabolites of the samples was measured by spectroscopy in the visible region. The plant drugs and the extracts were submitted to thermoanalytical. The pyrolytic profile was performed. Nuclear Magnetic Resonance was performed with the purpose of pointing out the chemical profile of the plant drugs. The development and validation of the microbiological assay of the extracts was carried out. The drug/excipient compatibility study was performed using thermoanalytical techniques. In addition, two gels with leaf and fruit extract were developed and characterized. Plant drugs inhibited the growth of microorganisms tested. In none of the concentrations used, the drugs and extracts presented cytotoxicity above 50%. The samples obtained significant concentrations of secondary metabolites. The different particle sizes presented different profiles. In the <sup>1</sup>H-NMR the peak amounts varied according to the plant sample. Regarding the extracts, we observed equivalences the differentiated batches. As for the microbiological assay, it presented linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification and robustness within the specifications. In the compatibility study, were compatible and were used in the development of the topical formulations, being within the specifications. Thus, studies that show the development of an herbal medicine, as well as the characterization and standardization of Active Vegetal Ingredients are important, due to the lack of official methodology that proves the quality, safety and efficacy of these products.

**Keywords** *Momordica charantia*. Thermogravimetry. Tannins. Vegetable extracts. Gels.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.....	30
Figura 2 - Formação da Zona de Inibição do crescimento microbiano decorrente da difusão da substância antimicrobiana em ágar contido na placa (difusão radial). ....	35
Figura 3 - Estrutura de uma microplaca utilizada na microdiluição.....	36
Figura 4 - Esquema de um corte de pele.....	38
Figura 5 - Curvas TG das Drogas vegetais <i>M. charantia</i> (Folhas) em diferentes tamanhos de partículas na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).....	78
Figura 6 - Curvas TG das Drogas vegetais <i>M. charantia</i> (Frutos) em diferentes tamanhos de partículas na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).....	79
Figura 7- Curvas TG da <i>M. charantia</i> (folhas) em diferentes tamanhos de partículas. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min. ....	81
Figura 8 - Curvas TG da <i>M. charantia</i> (frutos) em diferentes tamanhos de partículas. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min. ....	P82
Figura 9 - Curvas DTA da <i>M. charantia</i> em diferentes tamanhos de partículas na razão de aquecimento de 10°C/min. (A) Folhas; (B) Frutos.....	86
Figura 10 - Pirogramas obtidos das folhas de <i>M. charantia</i> nas temperaturas de 450, 350 e 250°C. ....	93
Figura 11 - Pirogramas obtidos dos frutos de <i>M. charantia</i> nas temperaturas de 450, 350 e 250°C. ....	94
Figura 12 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 250°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.....	95
Figura 13 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C. ....	96
Figura 14 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos frutos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C. ....	97
Figura 15 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 350°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.....	98
Figura 16 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 350°C. ....	98
Figura 17 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos frutos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 350°C. ....	99
Figura 18 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 450°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.....	100
Figura 19 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C. ....	100
Figura 20 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos frutos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C. ....	101
Figura 21 - Espectros RNMH1 <i>M. charantia</i> (folhas). (A) - Deslocamento 0-14ppm. (B) - Deslocamento 0-3 ppm. (C) - Deslocamento 3-6 ppm. (D) - Deslocamento 6-9ppm. (E) - Deslocamento 9-14ppm.....	103

Figura 22 - Espectros RNMH1 <i>M. charantia</i> (frutos). (A) - Deslocamento 0-14ppm. (B) - Deslocamento 0-3 ppm. (C) - Deslocamento 3-6 ppm. (D) - Deslocamento 6-9ppm. (E) - Deslocamento 9-14ppm.....	104
Figura 23 - Curvas TG dos extratos <i>M. charantia</i> (Folhas) em diferentes lotes na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B). .....	105
Figura 24 - Curvas TG dos extratos obtidos da <i>M. charantia</i> (folha) em diferentes lotes de produção. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min. ....	110
Figura 25 - Curvas TG dos extratos obtidos da <i>M. charantia</i> (fruto) em diferentes lotes de produção. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min. ....	111
Figura 26 - Curvas DTA da <i>M. charantia</i> em diferentes lotes de produção na razão de aquecimento de 10°C/min. (A) Folhas; (B) Frutos.....	113
Figura 27 - Pirogramas obtidos os extratos das folhas de <i>M. charantia</i> nas temperaturas de 250 (A), 350 (B) e 450°C (C). ....	117
Figura 28 - Pirogramas obtidos os extratos dos frutos de <i>M. charantia</i> nas temperaturas de 250 (A), 350 (B) e 450°C (C). ....	118
Figura 29 - Os dados correspondem à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.* $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle. ....	124
Figura 30 - Efeito citotóxico do extrato do fruto da espécie <i>Momordica charantia</i> sobre a linhagem de fibroblasto L929 (A) e de mastócitos P815 (B), após 48h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. ....	124
Figura 31 - Curva de crescimento dos microrganismos <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) no tempo de 24 horas. ....	125
Figura 32 - Curva quantidade de unidades formadoras de colônias nos inóculos bacterianos em função da concentração da substância de referência e das amostras testes frente a <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E.coli</i> (B). ....	127
Figura 33 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de <i>M. charantia</i> obtido das folhas (A) e do fruto (B) e das análises realizada com Cefalotina (C) frente a <i>S. aureus</i> .....	129
Figura 34 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de <i>M. charantia</i> obtido das folhas (A) e do fruto (B) e das análises realizadas com Gentamicina (C) frente a <i>E. coli</i> .....	130
Figura 35 - Curvas DTA (A- folha, B- fruto) e TG (C-folha, D-fruto) dos extratos obtidos de <i>M. charantia</i> . ....	137
Figura 36 - Curvas DTA (A-Carbopol, B-Trietanolamina e C- Natrosol) e TG (D-Carbopol, E-Trietanolamina e F- Natrosol) do extrato obtido das folhas de <i>M. charantia</i> com os agentes gelificantes.....	140
Figura 37 - Curvas DTA (A-Carbopol, B-Trietanolamina e C- Natrosol) e TG (D-Carbopol, F-Trietanolamina e G- Natrosol) do extrato obtido dos frutos de <i>M. charantia</i> com os agentes gelificantes.....	141
Figura 38 - Curvas DTA (A-Glicerina e B-Propilenoglicol) e TG (C-Glicerina e D-Propilenoglicol) do extrato obtido das folhas de <i>M. charantia</i> com os agentes umectantes. ....	144
Figura 39 - Curvas DTA (A-Glicerina e B-Propilenoglicol) e TG (C-Glicerina e D-Propilenoglicol) do extrato obtido dos frutos de <i>M. charantia</i> com os agentes umectantes..	145

Figura 40 - Curvas DTA (A-Metilparabeno e B-Imidazolinidil uréia) e TG (C-Metilparabeno e D-Imidazolinidil uréia) do extrato obtido das folhas de <i>M. charantia</i> com os agentes conservantes. ....	147
Figura 41 - Curvas DTA (A-Metilparabeno e B-Imidazolinidil uréia) e TG (C-Metilparabeno e D-Imidazolinidil uréia) do extrato obtido dos frutos de <i>M. charantia</i> com os agentes conservantes. ....	147
Figura 42 - Aspectos Macroscópicos dos géis produzidos com os extratos das folhas (A) e do fruto (B). ....	149
Figura 43 - Perfis das viscosidades obtidas nas formulações produzidas. ....	151
Figura 44 - Espalhabilidade dos géis em função do peso adicionado. ....	152
Figura 45 - Perfis das viscosidades obtidas nas formulações produzidas no início e fim do ciclo de 12 dias. A- FEP; B-FEF. ....	154
Figura 46 - Espalhabilidade dos géis em função do peso adicionado no início e fim do ciclo de 12 dias. A- FEP; B-FEF. ....	154
Figura 47 - Curva quantidade de unidades formadoras de colônias nos inóculos bacterianos em função da concentração da substância de referência (extratos) e das amostras testes (formulações) frente a <i>S. Aureus</i> (A) e <i>E.coli</i> (B). ....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados etnofarmacológicos de <i>M. charantia</i> .....	27
Tabela 2 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (antimicrobianos) e amostras testes (Extratos nebulizados).....	63
Tabela 3 - Classes dos excipientes utilizados no estudo.....	67
Tabela 4 - Constituintes e seus percentuais utilizados na preparação do gel.....	68
Tabela 5 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (Extratos nebulizados) e amostras testes (Formulações).....	71
Tabela 6 - Valores de CIM apresentados contra os microrganismos estudados.....	73
Tabela 7- Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com infusões das folhas de <i>M. charantia</i> .....	74
Tabela 8 - Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com infusões dos frutos de <i>M. charantia</i> .....	75
Tabela 9 - Teor de Taninos equivalente a catequina obtidos por espectroscopia na região do visível.....	76
Tabela 10 - Teor de polifenóis equivalente a ácido gálico obtidos por espectroscopia na região do visível.....	76
Tabela 11 - Teor de flavonoides equivalente a quercetina obtidos por espectroscopia na região do visível.....	77
Tabela 12 - Parâmetros de decomposição da principal etapa de degradação das amostras obtidas da folhas.....	83
Tabela 13 - Parâmetros de decomposição da principal etapa de degradação das amostras obtidas dos frutos.....	84
Tabela 14 - Paramêtros cinéticos de degradação térmica das drogas vegetais obtidas dos frutos e das folhas da <i>Momordica charantia</i> .....	85
Tabela 15 - Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas das folhas de <i>M. charantia</i> em diferentes tamanhos de partículas.....	86
Tabela 16 - Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas dos frutos de <i>M. Charantia</i> em diferentes tamanhos de partículas.....	87
Tabela 17 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas ( <i>M.charantia</i> folhas).....	90
Tabela 18 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas ( <i>M.charantia</i> frutos).....	91
Tabela 19 - Quantidade de picos por região dos espectros de RMN 1H das drogas vegetais em diferentes tamanhos de partículas.....	102
Tabela 20 - Parâmetros obtidos durante a primeira etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.....	106
Tabela 21 - Parâmetros obtidos durante a segunda etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.....	106
Tabela 22 - Parâmetros obtidos durante a terceira etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.....	107
Tabela 23 - Parâmetros obtidos durante a quarta etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.....	108

Tabela 24 - Valores de resíduos mineral obtidos no perfil termogravimétrico dos extratos produzidos das folhas.....	108
Tabela 25 - Valores de resíduos mineral obtidos no perfil termogravimétrico dos extratos produzidos dos frutos.....	109
Tabela 26 - Paramêtros cinéticos de degradação térmica dos extratos vegetais obtidos das folhas da <i>Momordica charantia</i> .....	111
Tabela 27- Paramêtros cinéticos de degradação térmica dos extratos vegetais obtidos dos frutos da <i>Momordica charantia</i> .....	112
Tabela 28 - Eventos exotérmicos dos extratos nebulizados obtidos das folhas de <i>M. charantia</i> em diferentes lotes. ....	113
Tabela 29 - Eventos exotérmicos dos extratos nebulizados obtidos dos frutos de <i>M. charantia</i> em diferentes lotes. ....	114
Tabela 30 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas dos extratos obtidos das folhas.....	119
Tabela 31 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas dos extratos obtidos dos frutos.....	120
Tabela 32 - Teor de Taninos equivalente a Catequina obtidos por espectroscopia na região do visível. ....	121
Tabela 33 - Teor de Polifenóis totais equivalente a Ácido gálico obtidos por espectroscopia na região do visível.....	122
Tabela 34 - Teor de Flavonóides equivalente a Quercetina obtidos por espectroscopia na região do visível.....	122
Tabela 35 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e dos extratos frente a <i>S. aureus</i> .....	128
Tabela 36 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e dos extratos frente a <i>E. coli</i> .....	128
Tabela 37 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - $r^2$ ) para o padrão cefalotina e o os extratos obtidos da folha e fruto nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a <i>S. aureus</i> .....	131
Tabela 38 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação - $r^2$ ) para o padrão Gentamicina e o os extratos obtidos da folha e fruto nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a <i>E. coli</i> .....	131
Tabela 39 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra <i>S.aureus</i> .....	133
Tabela 40 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra <i>E. coli</i> .....	133
Tabela 41 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com <i>S.aureus</i> .....	134
Tabela 42 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com <i>E. coli</i> .....	134
Tabela 43 - Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a <i>S. aureus</i> em diversas condições.....	135
Tabela 44 - Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a <i>E. coli</i> em diversas condições. ....	135

Tabela 45 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes geilificantes com os extratos das folhas e dos frutos de <i>M. charantia</i> . ....	142
Tabela 46 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes umectantes com os extratos das folhas e dos frutos de <i>M. charantia</i> .....	144
Tabela 47 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes conservantes com os extratos das folhas e dos frutos de <i>M. charantia</i> . ....	146
Tabela 48 - Resultados dos parâmetros avaliados após 24 horas, estresse térmico e após centrifugação do gel obtido com os extratos das folhas. Os resultados de ph e condutividade das amostras estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	150
Tabela 49 - Resultados dos parâmetros avaliados após 24 horas, estresse térmico e após centrifugação do gel obtido com os extratos dos frutos. Os resultados de ph e condutividade das amostras estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ....	150
Tabela 50 - Determinação do pH e densidade, no início e término do ciclo de 12 dias. ....	153
Tabela 51 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos extratos e das formulações frente a <i>S. aureus</i> .....	156
Tabela 52 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos dos extratos e das formulações frente a <i>E. coli</i> .....	156
Tabela 53 - Valores de potências percentuais das formulações em relação aos extratos contra <i>S.aureus</i> e <i>E. coli</i> apresentados no T0 E T12. ....	157

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

TG	Termogravimetria
DTA	Análise Térmica diferencial
PYR-GC / MSP	Pirólise acoplada a Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massa
RMNH <sub>1</sub>	Ressonância Magnética Nuclear
E <sub>50</sub>	Concentração citotóxica efetiva 50%
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
RDC	Resolução Diretiva Colegiada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
C30	Carbono 30
C27	Carbono 27
CIM	Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitros
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas Práticas de Fabricação
MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
mm	Milímetros
CG-MS	Cromatografia gasosa/ Espectrometria de massa
%	Porcentagem
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CG	Cromatografia gasosa
n°	Número
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
µm	Micrometros
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
m	Massa
T	Temperatura

t	tempo
ACAM	Herbário Manuel de Arruda Câmara
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
BHI	Brain heart infusion
nm	Nanômetros
mg/mL	Miligramas por mililitros
±	Mais ou menos
h	Horas
μl	microlitros
rpm	Rotação por minuto
min	Minutos
mg	Miligramas
m/z	massa/carga
V	Volts
MHz	Megahertz
EHE	Extratos hidroetanólicos evaporados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-D6	DMSO deuterado
ppm	Partes por milhão
δ	Deslocamento químico
°C/min	Graus célsius por minuto
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
kJ/mol	quilojoule por mol
min <sup>-1</sup>	Por minuto
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
PCA	Análise dos componentes principais
MTT	(3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 OBJETIVO</b> .....	23
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	23
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	24
<b>3.1 <i>Momordica charantia</i> L</b> .....	24
3.1.1 Características gerais.....	24
3.1.2 Atividades Biológicas e uso Etnofarmacológico .....	24
3.1.3 Composição fitoquímica.....	25
<b>3.2 Atividade antimicrobiana de espécies vegetais</b> .....	28
3.2.1 Considerações gerais .....	28
3.2.2 Metabólitos secundários envolvidos na atividade antimicrobiana de plantas medicinais .....	29
3.2.2.1 <i>Taninos</i> .....	29
3.2.2.2 <i>Flavonóides</i> .....	30
3.2.2.3 <i>Terpenos</i> .....	31
3.2.2.4 <i>Saponinas</i> .....	31
3.2.2.5 <i>Alcalóides</i> .....	32
<b>3.3 Doseamento microbiológico de substâncias antimicrobianas</b> .....	32
3.3.1 Métodos Biológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos .....	33
3.3.1.1 <i>Método difusão em ágar</i> .....	34
3.3.1.2 <i>Método turbidimétrico</i> .....	35
<b>3.4 A Pele e Infecções Relacionadas</b> .....	37
<b>3.5 Forma Farmacêutica Gel</b> .....	40
3.5.1 Excipientes utilizados na forma farmacêutica gel.....	41
3.5.1.1 <i>Agentes gelificantes</i> .....	41
3.5.1.2 <i>Agentes umectantes</i> .....	43
3.5.1.3 <i>Agentes conservantes</i> .....	44
<b>3.6 Controle da Qualidade de Fitoterápicos</b> .....	44
<b>3.7 Estudo de Pré Formulação aplicados á Fitoterápicos</b> .....	47
<b>3.8 Técnicas analíticas aplicadas a Caracterização e Controle da Qualidade de Insumos Ativos Vegetais</b> .....	48
3.8.1 Granulometria .....	48

3.8.2 Técnicas Termoanalíticas .....	49
3.8.2.1 Termogravimetria.....	50
3.8.2.2 Análise Térmica diferencial.....	51
3.8.3 Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa .....	51
3.8.4 Ressonância Magnética Nuclear .....	52
3.8.5 Ferramentas quimiométricas.....	52
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Obtenção da droga vegetal.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 Preparação das amostras .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 Determinação da atividade antimicrobiana .....</b>	<b>56</b>
4.3.1 <i>Screening</i> Microbiológico .....	56
<b>4.4 Ensaios de citotoxicidade .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Ensaios Fitoquímicos.....</b>	<b>58</b>
4.5.1 Determinação de polifenóis totais.....	58
4.5.2 Determinação de Flavonoides totais .....	59
4.5.3 Determinação do teor de taninos condensados .....	59
<b>4.6 Análise termogravimétrica (TG) .....</b>	<b>59</b>
<b>4.7 Determinação da Cinética de degradação .....</b>	<b>60</b>
<b>4.8 Análise Térmica diferencial (DTA) .....</b>	<b>60</b>
<b>4.9 Pirólise acoplada a CG/MS.....</b>	<b>60</b>
<b>4.10 Ressonância magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H).....</b>	<b>61</b>
<b>4.11 Estudo de potência Microbiológica.....</b>	<b>61</b>
4.11.2 Ensaio microbiológico.....	62
4.11.2.1 <i>Meio de cultura</i> .....	62
4.11.2.2 <i>Microrganismos utilizados</i> .....	62
4.11.2.3 <i>Substâncias padrão de Referência</i> .....	62
4.11.2.4 <i>Determinação das condições experimentais</i> .....	63
4.11.2.4.1 <i>Obtenção da curva de crescimento dos microrganismos</i> .....	63
4.11.2.4.2 <i>Inserção das amostras e substâncias de referências</i> .....	64
4.11.3 Cálculo da potência antimicrobiana das amostras .....	64
4.11.4 Validação do método analítico.....	64
4.11.4.1 <i>Linearidade</i> .....	65
4.11.4.2 <i>Precisão e exatidão</i> .....	65
4.11.4.3 <i>Limite de detecção (LD)</i> .....	66
4.11.4.4 <i>Limite de quantificação (LQ)</i> .....	66

4.11.4.5 Robustez.....	66
<b>4.12 Desenvolvimento e caracterização das formulações com atividade antimicrobiana</b>	<b>66</b>
4.12.1 Estudo de compatibilidade.....	66
4.12.3 Desenvolvimento das formulações.....	67
4.12.4 Caracterização das formulações.....	68
4.12.4.1 Ensaios organolépticos.....	68
4.12.4.2 Centrifugação.....	68
4.12.4.3 Estresse térmico.....	69
4.12.4.4 pH.....	69
4.12.4.5 Viscosidade.....	69
4.12.4.6 Espalhabilidade.....	69
4.12.4.7 Avaliação preliminar da estabilidade.....	70
4.12.4.8 Análise da eficácia da formulação.....	70
4.12.4.9 Ensaio de doseamento microbiológico.....	70
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1 Droga vegetal.....</b>	<b>72</b>
5.1.1 Screening Microbiológico.....	72
5.1.2 Ensaio de citotoxicidade.....	73
5.1.3 Ensaios fitoquímicos.....	75
5.1.4 Análise termogravimétrica (TG).....	77
5.1.5 Determinação da Cinética de degradação.....	80
5.1.6 Análise Térmica Diferencial.....	85
5.1.7 Pir-CG/MS.....	88
5.1.8 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H).....	101
<b>5.2 Caracterização dos Extratos vegetais.....</b>	<b>104</b>
5.2.1 Análise termogravimétrica (TG).....	104
5.2.2 Determinação da Cinética de degradação.....	109
5.2.3 Análise Térmica diferencial (DTA).....	112
5.2.4 Pir-CG/MS.....	115
5.2.5 Ensaios fitoquímicos.....	121
5.2.6 Citotoxicidade.....	123
<b>5.3 Estudo de Potência microbiológica.....</b>	<b>125</b>
5.3.1 Curva de crescimento.....	125
5.3.2 Obtenção das curvas Taxa de crescimento x Concentração.....	127
5.3.3 Determinação da potência antimicrobiana e validação do método analítico.....	129

5.3.3.1 <i>Análise da Curva de Calibração e verificação da linearidade</i> .....	129
5.3.4 Precisão e Exatidão .....	132
5.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	134
5.3.6 Robustez .....	135
<b>5.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações</b> .....	136
5.4.1 Estudo de compatibilidade.....	136
5.4.1.1 <i>Gelificantes</i> .....	137
5.4.1.2 <i>Umectantes</i> .....	142
5.4.1.3 <i>Conservantes</i> .....	145
5.4.2 Caracterização das formulações.....	148
5.4.2.1 <i>Características organolépticas, determinação do pH, estresse térmico e centrifugação</i> .....	148
5.4.2.2 <i>Viscosidade</i> .....	151
5.4.2.3 <i>Espalhabilidade</i> .....	152
5.4.3 Avaliação preliminar da estabilidade .....	153
5.4.4 Análise da eficácia da formulação .....	155
5.4.4.1 <i>Doseamento microbiológico</i> .....	155
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	158
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	160
<b>APÊNDICE A</b> - Artigo publicado no Journal of Analytical Methods in Chemistry.....	176

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento da medicina popular e o uso de plantas medicinais tem importância fundamental no desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas, pois as plantas além de possuírem atividades farmacológicas, são de baixo custo e fácil acesso (HASENCLEVER et al.,2017). Associado a esses fatos, a evolução biológica traz consigo a resistência de patógenos aos fármacos já comercializados causando sérios problemas para população mundial. Portanto, se faz necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas infecções, principalmente a partir de produtos naturais (GUPTA, DUBEY, KUMAR, 2016).

Sob esta visão, os Fitoterápicos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2006, são entendidos como produtos farmacêuticos tecnicamente elaborados, constituídos exclusivamente de matérias-primas terapeuticamente ativas de origem vegetal, destinados a intervir no organismo animal, com benefício da saúde do usuário e caracterizados pelo conhecimento e pela manutenção de sua eficácia, segurança e especificações técnicas.

O mercado desses produtos tem crescido em todo mundo, todavia esse aumento não tem refletido na qualidade dos fitoterápicos disponíveis à população, pois são grandes as intervenções para efetuação do controle de qualidade e a comprovação de segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos. Isso ocorre devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais (ALVES, 2013).

Dessa forma, o controle da qualidade de um produto precisa envolver várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do produto final, o medicamento fitoterápico (BRASIL, 2016). Assim, avanços na pesquisa de produtos desenvolvidos, tendo como insumo farmacêutico ativo (IFA) o material vegetal, tornaram possível a elucidação de mecanismos de ação, estruturas moleculares e o conhecimento e perfis toxicológicos, além da realização de estudos pré-clínicos e clínicos destes produtos, permitindo a fabricação de medicamentos seguros, eficazes e de efeito reprodutível (SANTANA, 2016).

Um dos parâmetros essenciais, visando a qualidade desses produtos, é a padronização de extratos de produtos naturais, que fundamenta em análise química de constituintes ou metabólitos secundários, identificação da droga vegetal ou para verificação da presença de substâncias responsáveis pela ação farmacológica. Essa padronização serve para assegurar lote a lote as especificações dos teores de ativos em relação aos quais os ensaios clínicos de

segurança foram estabelecidos, representando parâmetro de avaliação de integridade indispensável para o controle de qualidade dos produtos (LEITE, et al., 2017).

No cenário industrial, existem várias formas farmacêuticas para serem vinculadas os extratos, destacando-se as formas farmacêuticas tópicas, como géis, que são bastante utilizadas popularmente, possuindo uma boa aceitação pelos consumidores por apresentarem características sensoriais agradáveis, além de possibilitarem uma boa permeação cutânea de ativos. Os estudos de caracterização devem ser realizados antes de disponibilizar os produtos ao consumo, requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade físico-química e ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem colocar em risco a saúde do consumidor e configurar infração sanitária. Pela caracterização de um produto, é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além da sua aceitação pelo consumidor (SOUZA E FERREIRA, 2010).

Entre as plantas incluídas no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011) esta *Momordica charantia* L. Essa espécie vegetal é popularmente conhecida como “cabaço amargo”, “melão amargo” ou “melão de são caetano”. *Momordica charantia* L é cultivada em todo o mundo. É bastante utilizada na medicina popular, sendo os seus benefícios medicinais bem documentados, especialmente as suas propriedades farmacológicas, entre essas a atividade antimicrobiana (GROVER & YADAV, 2004; BRACA et al, 2008; COUTINHO et al., 2010, ASSIS et al, 2015; KUSUMA et al., 2015). Os extratos obtidos a partir dessa planta contêm diversos metabólitos químicos biologicamente ativos que incluem glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos fixos, triterpenos, proteínas e esteroides (JOSEPH e JINI, 2013; DZOYEM, et al., 2016).

Sendo esse vegetal uma grande fonte de compostos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos, esse trabalho propõe o desenvolvimento de metodologias analíticas e processos tecnológicos visando a caracterização física, química e biológica de ingrediente ativo vegetal obtido de *Momordica charantia*, assim como desenvolver e caracterizar formulações de uso tópico com atividade antimicrobiana derivadas dessa espécie.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Obter e caracterizar com metodologias analíticas drogas vegetais e extratos secos das folhas e dos frutos de *M. Charantia* e desenvolver formulações em forma de géis com ação antimicrobiana a partir desse vegetal.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter pós das folhas e dos frutos de *Momordica charantia*, avaliando as diferenças químicas e biológicas entre diversos tamanhos de partículas;
- Preparar infusos das drogas estudadas de acordo com o que preconiza a RDC 10/2010;
- Realizar um *screening* microbiológico, citotóxico e fitoquímico dos infusos produzidos;
- Avaliar o perfil térmico e pirolítico das drogas vegetais obtidas;
- Analisar perfis das das drogas vegetais obtidas por Ressonância Magnética Nuclear;
- Produzir extratos hidroalcolicos nebulizados em três lotes diferentes das folhas e dos frutos de *M. charantia*
- Realizar um *screening* microbiológico, citotóxico e fitoquímico dos extratos produzidos;
- Desenvolver e validar um método de doseamento da potência antimicrobiana dos extratos nebulizados;
- Realizar estudo de formulação candidata a gel, avaliando a compatibilidade dos extratos nebulizados com excipientes através de técnicas termoanalíticas;
- Desenvolver formas farmacêuticas em gel com atividade antimicrobiana a partir dos extratos nebulizados de *M. charantia*.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Momordica charantia* L

##### 3.1.1 Características gerais

A espécie *Momordica charantia* é um vegetal conhecido em todo o mundo e pertence à família Cucurbitaceae. Essa família apresenta grande número de espécies de uso medicinal e outras consideradas tóxicas (ALAMA et al., 2009).

*Momordica charantia* L., conhecida popularmente por melão-de-são-caetano, erva-de-são-vicente, fruta-de-cobra, melãozinho, dentre outras denominações, é uma das espécies integrantes dessa família que possui grande interesse popular e científico pelas propriedades curativas que demonstra (LIMA, 2008)

Trata-se de uma trepadeira originária da Ásia e África que se adaptou facilmente ao Brasil em razão do clima tropical. Caracteriza-se pela presença de gavinhas simples, longas e pubescentes, apresentando caule herbáceo fino, sulcado e de coloração esverdeada. Suas folhas são membranáceas, alternas, com cinco ou sete lobos sinuados, ovado-oblongos, mucronados, denteados e opacos. As flores monóicas são amarelo-pálidas ou brancas e os frutos são bagas consideradas comestíveis (LIMA, 2008; GROVER, 2004).

*Momordica charantia* também faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. No período seco, quando a maioria das espécies da Caatinga perde as folhas, essa planta destaca-se por apresentar-se com as folhas totalmente verdes, o que caracteriza uma planta resistente à seca. O período de frutificação é muito curto e concentra-se nos meses de dezembro a março (ASSIS et al, 2015).

##### 3.1.2 Atividades Biológicas e uso Etnofarmacológico

Na medicina popular, uma série de usos terapêuticos, de todas as partes de *M. charantia* foram relatadas por diversos pesquisadores.

Dentre as atividades biológicas determinadas pode-se citar a antimicrobiana. O óleo essencial extraído de frutos e sementes de *M. charantia* apresentou boa atividade antimicrobiana contra os microrganismos *E. coli*, *C. albicans* e *S. aureus* (BRACA et al, 2009). Em estudo realizado por Coutinho et al, 2009 o extrato etanólico de folhas de *Momodirca*

*charantia* além de inibir cepas MARSA, diminuiu também a sua resistência dessa cepa a aminoglicosídeos.

O extrato etanólico também obteve atividade inibitória frente à *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *Aspergillus niger* (YALDIZ et al., 2015). Em estudo realizado por Lima (2010) os extratos etanólicos e hexânicos e hidroalcolícos obtidos a partir dos frutos de *M. charantia* obtiveram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*, sendo o extrato etanólico mais efetivo, com a obtenção de halos de inibição superiores a 10 mm.

Entre outras atividades biológicas de *M. charantia* determinadas estão a hipoglicemiante, (KUMAR et al., 2009; CHANG et al., 2011; BLUM et al., 2012; JOSEPH & JINI, 2013; JAIN et al., 2015.) hipolipemiante, (AHMED et al., 2001; WU et al., 2009; POPOVICH & ZHANG, 2010) antioxidante, (HUI LIU, 2010; JAIN et al., 2015) antitumoral, (SINGH et al., 1998; FANG, et al., 2012) anti-inflamatória (KUEI LII, et al., 2009; JAIN et al., 2015) e antiulcerogênica (GÜRBÜZ et al., 2010; LIU et al, 2012).

Algumas atribuições do seu uso etnofarmacológico de *M. charantia* estão relatados na tabela 1, onde estão identificadas a sua aplicação popular, as partes utilizadas e os estudos referenciados.

### 3.1.3 Composição fitoquímica

Triagens fitoquímicas realizadas em extratos de *M. charantia* mostraram a presença de vários metabolitos secundários como taninos, alguns compostos glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos fixos, triterpenos, taninos, proteínas e esteroides (GROVER & YADAV, 2004; JOSEPH & JINI, 2013).

Budrat e Shotipruk, 2009 tentaram extrair dos frutos de *M. charantia* diversos compostos polifenólicos, para isso foi utilizado o método de extração com fluido supercrítico. Dos polifênóis detectados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência se destacaram a catequina, o ácido gálico, o ácido gentísico e o ácido clorogênico.

Nos frutos de *Momordica charantia* L., Begum et al. (1997) identificaram três triterpenos pentacíclicos (momordicina, momordicinina e momordicilina) e um álcool monocíclico (momordol). Chen et al. (2009) isolaram quatorze triterpenos curcubitanos das folhas da *Momordica charantia* L. Zhao et al, 2014 isolaram 6 triterpenos provenientes das folhas e da casca dessa espécie.

Gomes et al, 2011 realizaram uma análise fitoquímica qualitativa de extratos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais, dentre eles os obtidos das folhas, talo e fruto do Melão de São Caetano. Nesse estudo detectaram a presença de taninos, diversos flavonóides e a ausência de alcalóides. Os autores atribuíram essa ausência à polimerização do extrato etanólico de *M. charantia* que possivelmente tenha impedido a observação desses compostos químicos. Entretanto Grover e Yadav (2004), revisando a ação farmacológica e potenciais usos biológicos de *M. charantia* concluíram que os princípios ativos incluem glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos não voláteis, triterpenos, proteínas e esteróides.

A presença de esteroides foi detectada nos extratos hidroalcolico, etanólico, metanólico e hexânico das folhas de *M. charantia* não houve diferença significativa em relação a quantidade desses compostos nos dois tipos de extratos (PEREIRA et al., 2010). Houssain, 2014 evidenciou esses mesmos compostos utilizando extratos aquosos dos frutos e sementes de *M. charantia* e atribuiu a atividade antidiabética dessa planta a esse composto.

Hsu et al, 2012 produziu extratos utilizando o solvente acetato de etila. Esse extrato foi analisado por meio de CG-MS, assim diversos compostos foram identificados o que mais prevaleceu foi o Fitol (22%).

Tabela 1- Dados etnofarmacológicos de *M. charantia*.

<b>Uso etnofarmacológico</b>	<b>Parte da planta (infusos e decoctos)</b>	<b>Referências</b>
Hipoglicemiante	Frutos	Behera, Singh e Staub, 2008;
Antidiabético.	Folhas e casca do caule	Macedo e Ferreira 2004.
Pedra nos rins, hipertensão, impigem, dengue, verme, reumatismo.	Folhas e futos	Oliveira, Barros e Moita Neto, 2010
Vermífugo e pediculose	Raízes, casca, e frutos	Ritter et al. (2002)
Leucorréia	Folhas	Fenner et al., 2006;
Regularização do fluxo menstrual, no combate a leucorréia, no alívio das cólicas abdominais e inflamações do fígado. atividades cicatrizante, anti-reumática e antidiabética.	Folhas, e frutos	Rodrigues et al., 2010.
Antissépticos, antiinflamatórios e no combate a cólicas menstruais.	Folhas, casca'	Cartaxo et al.,2010
Antidiabético, antihelmintico, antimicrobiano, anticâncer.	Frutos e Folhas	Muley, et al, 2012
Escabiose, Pediculose, picadas de insetos, malária, pruridos e úlceras malignas.	Casca e fruto	Nandhini e Sumathi, 2014.
Antidiarréico e antirreumático	Folhas	Pramyothin et al., 2006
Hemorroidas, flatulência, dismenorréias, menorragias e reumatismo articular,	Frutos e folhas	Zocooler, 2006
Antiviral e antihelmintico	Folhas	Beloim, 2005.

## 3.2 Atividade antimicrobiana de espécies vegetais

### 3.2.1 Considerações gerais

O surgimento de patógenos multirresistentes adicionado ao uso inadequado de antimicrobianos tem se tornado um grande problema de saúde pública, necessitando assim de medidas urgentes no âmbito da saúde mundial. De fato, as doenças causadas por microrganismos multirresistentes têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade global, principalmente em países em desenvolvimento. Assim, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos torna-se algo de grande perspectivas futuras (EDWARD JONES, 2013).

Nesse sentido, a busca por novos agentes antimicrobianos eficazes obtidos de produtos naturais tem atraído muita atenção, uma vez que os vegetais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas. Sendo assim, é esperado que compostos atinjam alvos diferentes daqueles utilizados pelos antibióticos conhecidos, sendo ativos contra patógenos resistentes (HÜBSCH et al., 2014).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos e foram comprovadas. No entanto, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Porém, as investigações científicas visando determinar o potencial terapêutico das plantas são limitadas, existindo a falta de estudos científicos experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas de um grande número dessas plantas (DUARTE, 2009).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, entre eles a caatinga, tem sua utilização terapêutica, por parte das populações locais, contra diversas patologias incluindo infecções fúngicas e bacterianas. Sendo assim a pesquisa de plantas com atividade antimicrobiana tem crescido no Brasil, porém, existe um baixo número de registro das plantas com atividade biológica. Isso ocorre devido a disseminação restrita dos resultados de pesquisa e muitos desses estudos são baseados apenas em informações etnofarmacológicas (VALLI et al, 2014).

Por isso, um amplo estudo pode ser mais efetivo se a investigação abranger o potencial farmacológico de várias espécies de um determinado gênero guiado pelo uso medicinal popular.

### 3.2.2 Metabólitos secundários envolvidos na atividade antimicrobiana de plantas medicinais

Alguns estudos mostraram que o potencial terapêutico das plantas medicinais está relacionado com a presença nas espécies vegetais de substâncias químicas conhecidas com metabólitos secundários. Estes metabólitos são estruturas complexas, de baixo peso molecular e que normalmente apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG & LUBERT, 2008).

Os metabólitos secundários já foram considerados apenas produtos de excreção da síntese metabólica dos vegetais, porém hoje se sabe que eles estão envolvidos na proteção das plantas contra as condições do meio ambiente e aos ataques de insetos. Assim as plantas medicinais são ricas em uma ampla variedade de metabólitos secundário, tais como taninos, terpenóides, alcalóides, flavonóides, fenóis e quinonas, entre outros compostos. (GUPTA, DUBEY, KUMAR, 2016).

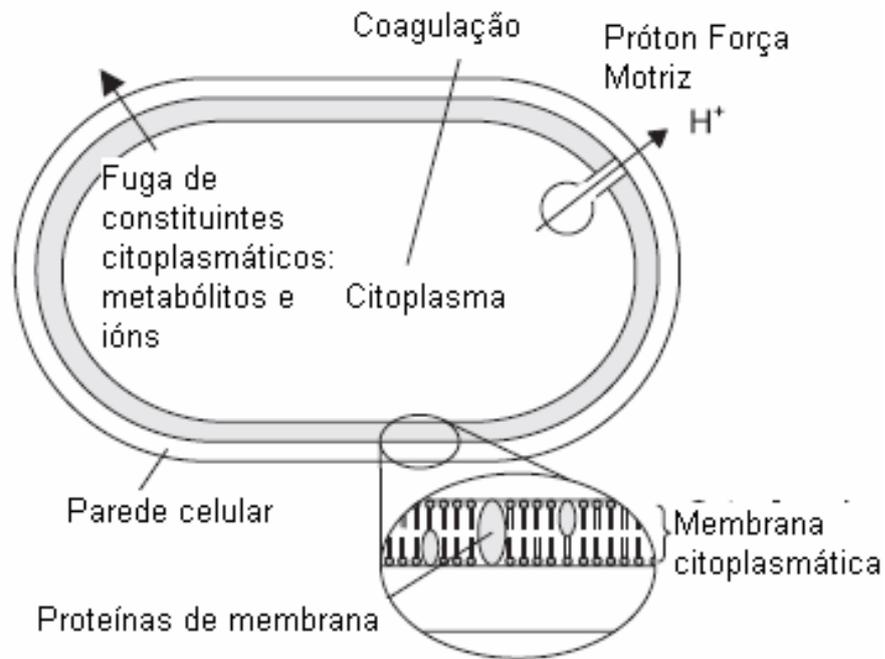
Os principais metabólitos envolvidos na atividade antimicrobiana são: Taninos, Terpenos, Flavonoides, Saponinas e Alcalóides (TRAORE, 2015).

#### 3.2.2.1 *Taninos*

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse terapêutico. Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides. Devido a essa capacidade de complexação com proteínas, esses compostos possuem propriedades adstringentes, o que leva a utilização terapêutica de drogas vegetais constituídas de taninos (MONTEIRO, ALBUQUERQUE, ARAÚJO, 2005).

Portanto, ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Inativando assim as proteínas essenciais aos microrganismos, como as lipoproteínas e algumas proteínas estruturais. A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas (MACHADO, et al, 2010).

Figura 1 - Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.



Fonte: SILVA, 2010.

### 3.2.2.2 Flavonóides

Os flavonoides constituem uma classe de polifenóis que estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Esses compostos possuem também importância farmacológica, resultante de algumas propriedades farmacológica como anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (SHANA, et al, 2012).

A atividade antimicrobiana desses compostos deve-se provavelmente à atribuição de grupos fenólicos hidroxilo que apresentam afinidade para as proteínas e, por essa razão, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese. Por outro lado, a natureza lipofílica dos flavonoides é também capaz de romper as membranas celulares de diversos microrganismos (ARIF et al., 2011; ÀVILA, et al., 2008; LI et al., 2012).

Alguns estudos conseguiram provar que a isoflavona extraída da soja, é capaz de inibir significativamente a atividade da DNA topoisomerase através da formação de complexos que interferem com as ligações a esta enzima interferindo na replicação de DNA, e expressão e recombinação de genes essenciais para as bactérias e fungos (WANG et al., 2010).

### 3.2.2.3 *Terpenos*

Os terpenos encontrados em óleos essenciais tais como monoterpenos e sesquiterpenos são compostos produzidos no metabolismo secundários das plantas, onde uma das principais finalidades destas classes de compostos é a proteção contra insetos-pragas em plantas (FERREIRA, 2010).

Uma característica importante, responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, são os componentes hidrofóbicos que permitem a partição de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeável. Acredita-se também que os componentes de óleos essenciais agem também em proteínas da membrana citoplasmática. Hidrocarbonetos cíclicos poderiam agir sobre enzimas ATPases que são conhecidas por estarem localizados na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas. E hidrocarbonetos lipídicos poderiam distorcer a interação lipídioproteína. Alguns óleos essenciais estimularam o crescimento de pseudomicélios, uma indicação de que pode atuar sobre enzimas envolvidas na síntese de componentes estruturais das bactérias (SILVA, 2010).

### 3.2.2.4 *Saponinas*

As saponinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, e incluem um grupo diverso de compostos caracterizados pela sua estrutura contendo uma aglicona esteroidal ou triterpenóide ligada a uma ou mais moléculas de açúcar. As saponinas são freqüentemente subdivididas em duas classes principais, triterpênicas e esteroidais, ambas derivadas do precursor óxido de esqualeno, com 30 átomos de carbono (C30). A diferença entre estas duas classes é que as saponinas esteroidais têm 3 grupos metila a menos (C27), enquanto as saponinas triterpênicas se mantêm com 30 átomos de carbono (RIBEIRO, 2012).

As saponinas apresentam atividade antimicrobiana e essa atividade é atribuída à interação entre as saponinas e os esteróis da membrana celular do microrganismo, causando aumento de permeabilidade e ruptura da célula do microrganismo (AUGUSTIN et al, 2011; CHEN et al, 2011).

### 3.2.2.5 Alcalóides

Os alcaloides formam um grande grupo de substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos, apresentando assim, as mais diversas interações com os organismos vivos. A ação antimicrobiana desse grupo, parece estar relacionada a sua capacidade de se intercalar entre a parede celular e o DNA do microrganismo. Porém por também possuírem uma grande atividade citotóxica inespecífica, sendo limitado seu uso como antimicrobiano (KOUASSI et al, 2015).

É importante descrever que a maioria das atividades farmacológicas dos vegetais está relacionado não a apenas um composto isolado, mas ao conjunto de substâncias que podem ser ativos quando estão juntas, formando um fitocomplexo que é o conjunto de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados (BRASIL, 2016).

### 3.3 Doseamento microbiológico de substâncias antimicrobianas

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismoteste, essa pequena quantidade é denominada de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a preocupação em relação aos dados toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (OSTROSKY, 2009).

Vários parâmetros podem variar a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de extratos de plantas. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (TRAPLE et al., 2014).

Todavia, para o sucesso terapêutico de substâncias antimicrobianas também é necessário que a potência dessas substâncias esteja correta nas apresentações farmacêuticas que serão administradas ao paciente. Se a potência estiver abaixo da necessária, o fármaco pode não atingir no plasma uma concentração capaz de exercer a atividade esperada. Por outro lado, se a concentração estiver muito alta, poderá provocar toxicidade. Nesse aspecto, é crescente a

preocupação com a qualidade dos medicamentos inovadores, a questão dos genéricos, a bioequivalência e a estabilidade das formulações (LI, et al., 2013).

Os ensaios para determinar essa potência têm sido realizados por métodos biológicos, sendo uma alternativa a outros métodos, tais como HPLC que têm sido amplamente adotados. Uma importante vantagem dos métodos físicoquímicos é a rapidez das análises, embora que os equipamentos necessários sejam frequentemente caro. Nos métodos biológicos a potência dos antibióticos geralmente é determinada, comparando-se a dose com a qual se inibe o crescimento de um microrganismo adequado e susceptível com a dose da preparação do antibiótico de referência nas mesmas condições de trabalho (LOURENÇO; PINTO, 2011).

A Farmacopéia Americana traz recomendação quanto à utilização de procedimentos microbiológicos para a determinação da potência de antimicrobianos nas apresentações farmacêuticas. Essas recomendações consistem no microrganismo, meio de cultura e diluente específico para cada substância assim como o método de análise empregado, geralmente são aplicados dois métodos, o do cilindro em placa e/ou turbidimétrico (BOTELHO, LOURENÇO, PINTO, 2013).

Uma redução na atividade antimicrobiana pode revelar mudanças não demonstráveis por métodos químicos. Dessa forma, a determinação da potência antimicrobiana é extremamente importante para o controle e garantia de qualidade em produtos e preparações farmacêuticas, portanto, é necessário o desenvolvimento de práticas e procedimentos de baixo custo que possa ser aplicado na validação e dosagem de drogas (LEONEL, SOARES e SIQUEIRA, 2012).

### 3.3.1 Métodos Biológicos Utilizados no Doseamento de Antibióticos

As farmacopeias, em geral, preconizam dois métodos para realização de doseamentos microbiológicos de antibióticos: o método por difusão em ágar e o turbidimétrico. Vários antibióticos têm os dois métodos descritos, apresentando a vantagem de poder ser escolhido o método que melhor se adequa a uma determinada situação (SOLANO et al., 2011).

O primeiro se baseia na difusão do antibiótico contido em um cilindro vertical, através de uma camada de ágar solidificado em uma placa de Petri, em uma extensão tal, que o crescimento do microrganismo agregado se detenha em uma área circular ou “halo de inibição” ao redor do cilindro que contém a solução do antibiótico. Já o método turbidimétrico se baseia na inibição do crescimento de um cultivo microbiano em uma solução uniforme do antibiótico,

em um caldo que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco (ESMERINO et al, 2004).

Os métodos prescritos nas farmacopeias tem sofrido transformações com o passar do tempo, principalmente no que diz respeito à natureza do diluente, microrganismo teste e inóculo empregado, concentração da curva padrão e composição do meio de cultura, embora o fundamento tem permanecido o mesmo (TRAPLE et al., 2013).

#### *3.3.1.1 Método difusão em ágar*

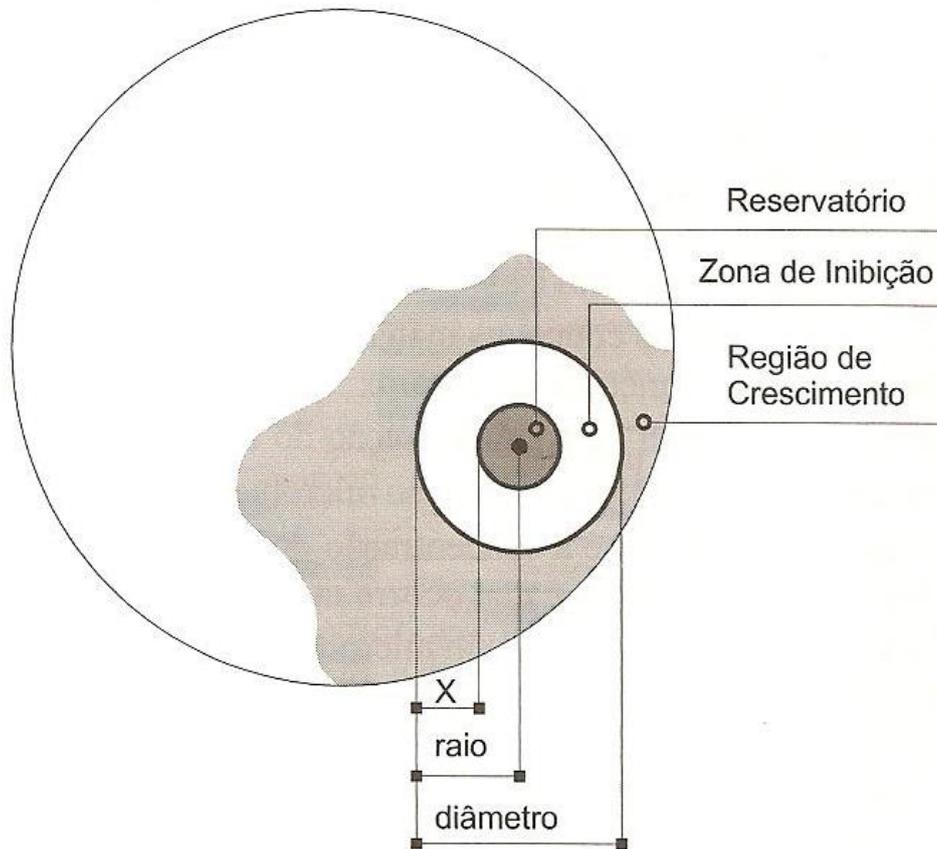
O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é utilizado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relacionando o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo, e desafiando com a concentração da substância ensaiada (OSTROSKY et al, 2009).

O método avalia a capacidade de um dado microrganismo de se multiplicar na presença de concentrações presumíveis de uma substância antimicrobiana aplicado no interior de um cilindro, sobre uma camada do ágar em uma placa de petri. O antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes, e a cepa bacteriana semeada cresce até encontrar a concentração inibitória mínima, e a partir do ponto de aplicação se forma um halo de inibição ao redor do cilindro. Esse halo é determinado em milímetros e é diretamente proporcional à concentração da substância antimicrobiana (SOLANO, et al., 2011).

Assim, à medida que se aumenta a concentração do antimicrobiano, são obtidos halos maiores, até que se esgote a capacidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Nesse ponto, o aumento na concentração da substância antimicrobiana não mais aumenta o halo de inibição (FARAGO et al., 2006).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

Figura 2 - Formação da Zona de Inibição do crescimento microbiano decorrente da difusão da substância antimicrobiana em ágar contido na placa (difusão radial).



Fonte: PINTO, 2010 (adptado).

### 3.3.1.2 Método turbidimétrico

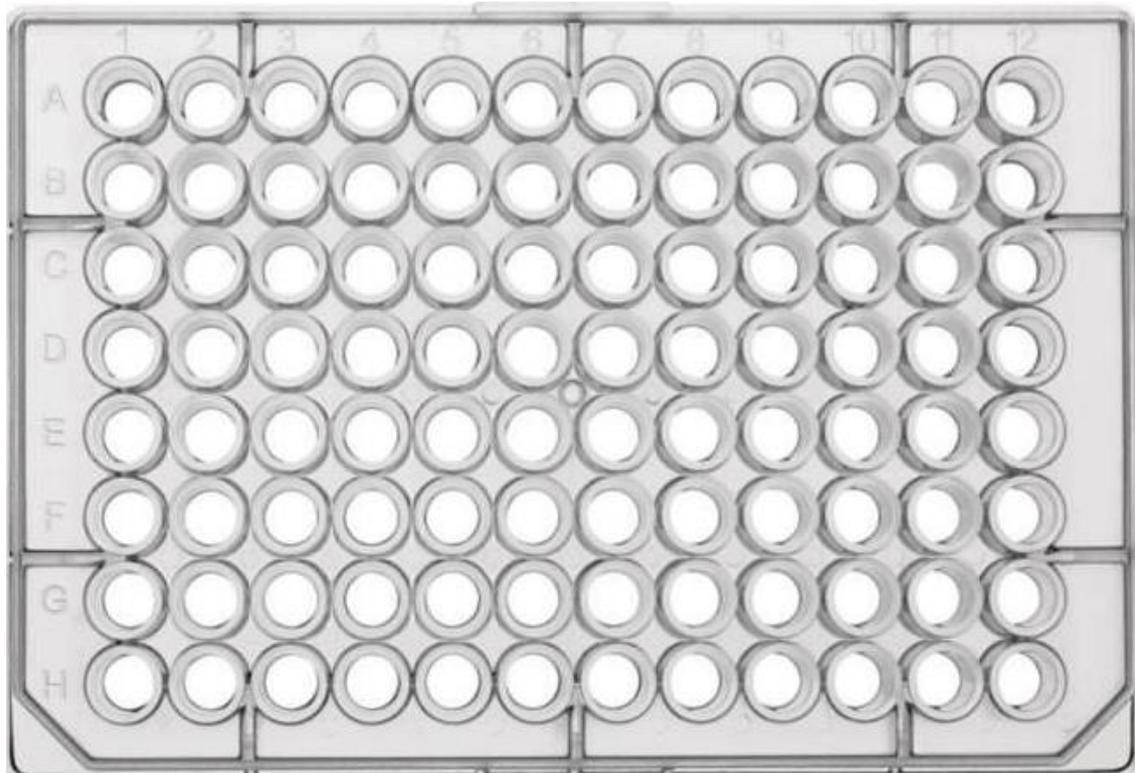
No método turbidimétrico, o meio de cultura líquido é inoculado com microrganismo teste e concentrações seriadas da amostra, as quais são adicionadas para permitir o contato entre o meio e a solução. A resposta do microrganismo a ação da amostra é evidenciada pela alteração da turvação do meio de cultura, sendo medida em espectrofotômetro ou com a utilização de um corante revelador (TRAPLER, 2014).

O método de turbidimetria apresenta a vantagem de ser mais sensível que o de difusão em ágar, já que responde às concentrações menores de substância. Por outro lado, tem desvantagens como: soluções turvas e coloridas interferirem na determinação da resposta; a necessidade das soluções da amostra e do padrão estarem estéreis; a interferência causada pela

presença de substâncias inibidoras e ativadoras de crescimento microbiano, como por exemplo, solventes orgânicos utilizados em processos extrativos e substâncias presentes na amostra (LOURENÇO; PINTO, 2009; SOLANO, 2010).

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Na utilização desse método para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais foi observado alguns inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise (OSTROSKY et al, 2008).

Figura 3 - Estrutura de uma microplaca utilizada na microdiluição.



Fonte: Direct Industry (2016)

Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras (BONA et al, 2014).

As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas, nos dois métodos citados. A susceptibilidade dos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo. A padronização desse se faz, portanto, necessária e a quantidade inoculada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de suscetibilidade utilizando a metodologia difusão em ágar, esse padrão deve ser de  $10^6$ UFC/mL. Para os testes de diluição em caldo, o padrão é de  $10^5$  UFC/mL no início do período de incubação (CLSI, 2017).

Embora geralmente sejam utilizadas as normatizações internacionalmente conhecidas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) como base para testes de suscetibilidade antimicrobiana, as diretrizes são direcionadas para antimicrobianos com parâmetros já conhecidos. Há poucos estudos comparativos relatando qual é o melhor método a ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, mesmo no que se refere às metodologias usualmente utilizadas. Além disso, há a necessidade da uniformização dos métodos de extração e testes in vitro, para que a pesquisa possa ser mais eficiente, e a interpretação dos resultados, mais facilitada e confiável (BONA et al, 2014).

### **3.4 A Pele e Infecções Relacionadas**

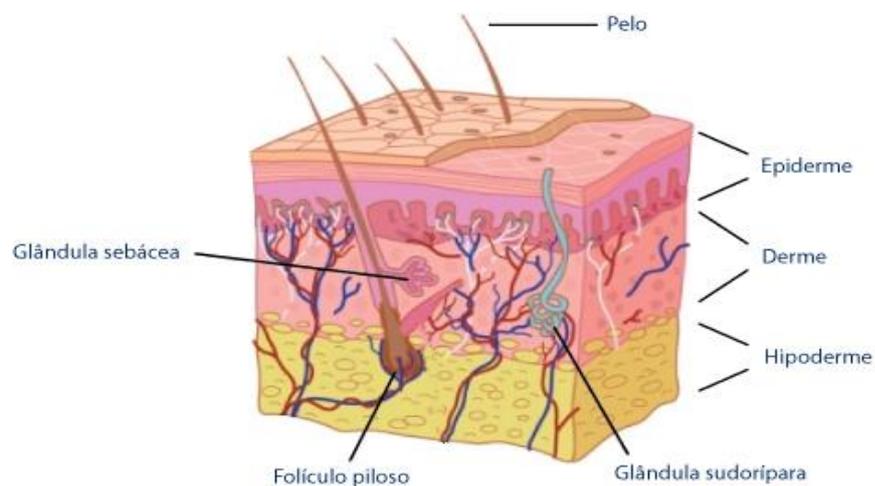
A pele ou *cútis* é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida e que isola os componentes orgânicos do meio exterior<sup>36</sup>. Ela representa 12% do peso seco total do corpo, com aproximadamente 4,5 quilos, e é o maior sistema de órgãos expostos ao meio ambiente (MENDONÇA e RODRIGUES et al, 2011).

Embora ela represente menos de 15% do peso do corpo, é considerada o maior órgão humano, pois a sua extensão corresponde a uma área de dois metros quadrados. É formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. Esta última não é considerada por muitos autores como parte integrante da pele, embora seja estudada dentro do sistema tegumentar o limite entre a epiderme e a derme não é regular, mas caracteriza-se pela presença de saliências e reentrâncias das duas camadas que se embricam e se ajustam entre si, formando as papilas dérmicas (KEDE E SABATOVICH, 2014).

A epiderme é, basicamente, um tecido epitelial estratificado queratinizado, com variações estruturais e funcionais significativas na dependência do seu sítio anatômico. É constituída por: sistema ceratinocítico, responsável pelo corpo da epiderme e de seus anexos (pelos, unhas e glândulas); sistema melânico, com função imunológica; células de merkel integrada ao sistema nervoso e células dendríticas indeterminadas, com função mal definida. A sua principal função é produzir queratina, proteína fibrosa maleável responsável pela impermeabilidade cutânea; as células que estão envolvidas são denominadas queratinócitos. A porção mais profunda da epiderme é constituída de células epiteliais que se proliferam continuamente para que seja mantido o seu número (DE MELO e CAMPOS, 2016)

Abaixo da epiderme, fica a principal massa de pele, a derme, um tecido forte, maleável, com propriedades viscoelásticas, e que consiste em um tecido conjuntivo frouxo composto de proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em substância basal amorfa. A derme está conectada com a fáscia dos músculos subjacentes por uma camada de tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme. Nela situam-se algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas, sendo suprida por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Também contém glândulas especializadas e órgãos do sentido. Tem espessura variável ao longo do organismo, desde 1 mm até 4 mm, e compõe-se de três porções: a derme papilar, a perianexial e a reticular. Como todo tecido conjuntivo, a derme contém muitos tipos diferentes de células incluindo fibroblasto e fibrócitos, macrófagos teciduais, melanófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011).

Figura 4 - Esquema de um corte de pele.



Fonte: Miura, 2012.

As infecções tóxicas estão entre as condições mais comuns em pacientes que comparecem ao pronto socorro. Às vezes, são suficientemente graves para levar a choque séptico e justificar a admissão do paciente em unidade de terapia intensiva (UTI). Essas infecções na sua forma grave são responsáveis por 4,3 - 10,5% dos episódios sépticos e têm um nível de fatalidade que varia entre 1,3 e 7,2% (MALHEIRO, et al., 2017).

Com relação à etiopatogenia, são causadas principalmente por bactérias piogênicas dos gêneros *Staphylococcus* e enterobactérias entre elas a *Escherichia coli*. Além disso, sabe-se que sua frequência está relacionada a fatores ambientais; a fatores individuais, dentre os quais incluem-se aqueles relacionados à baixa resistência imunológica, como na dermatite atópica e diabetes mellitus; à falta de higiene; à predisposição genética; e, também, a fatores relacionados ao grau de virulência e patogenicidade do microrganismo, sendo também a principal complicação de tratamentos com corticoides e imunossupressores (PIRES et al, 2015).

Aproximadamente 25-30% dos indivíduos saudáveis apresentam colonização ocasional por *S. aureus*, especialmente em axilas, períneo, faringe, mãos e narinas. A principal defesa contra os estafilococos é a fagocitose realizada pelos neutrófilos. Entretanto, existem condições predisponentes para a colonização da pele por baixa resistência ao agente, dentre as quais estão as dos pacientes diabéticos, que são mais propensos a uma série de complicações metabólicas e infecciosas, como as alterações cutâneas bacterianas, fúngicas e virais. Sendo assim, a invasão direta a partir de pequenas soluções de continuidade das mucosas, da pele e seus anexos resulta em uma variedade de infecções superficiais (SEITÉ et al., 2011). Dentre as infecções causadas por *S. aureus*, cita-se o impetigo bolhoso, a furunculose, a caburcunlose, a foliculite além da contaminação de feridas cirúrgicas (LIPNHARSK et al, 2013).

Em estudo realizado por Malheiro et al., 2017 revelou *Escherichia coli* como o patógeno mais comumente isolado na fascíte necrotizante, mesmo em pacientes oriundos da comunidade. Foi visto também nesse estudo que essa mesma bactéria está mais envolvida com as contaminações de feridas cirúrgicas. Um fato que pode ter contribuído para este achado podem ser a elevada proporção de envolvimento perineal, devido à proximidade desta região dos tratos geniturinário e gastrintestinal, e pelo fato de muitos destes casos terem sido precedidos por abscessos perianais ou perineais, nos quais bactérias Gram-negativas como a *E. coli* estão comumente envolvidas (SWAIN, et al, 2013).

### 3.5 Forma Farmacêutica Gel

Os géis são formas farmacêuticas semi-sólidas, constituídas da suspensão de pequenas partículas inorgânicas ou de grandes moléculas orgânicas interpenetradas por um líquido. São destinados geralmente para uso externo, com indicação para administração de ativos em peles mistas, oleosas e acnéicas, podendo também ter aplicação intranasal, intravaginal, retal, oral e parenteral (MELO, et al., 2013).

Entre as formas farmacêuticas semi-sólidas, os géis ganham destaque em produtos dermatológicos e farmacêuticos por apresentarem vantagens em relação aos cremes e pomadas. Algumas destas vantagens são a fácil espalhabilidade, por não serem gordurosos, e por poderem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas através da derme. A administração de fármacos através da via transdérmica está em evidência devido a facilidade de aplicação, além de proporcionar maior conforto ao paciente usuário do medicamento (NUNES et al, 2012).

De modo geral, os géis têm ação epidérmica, pois apresentam baixo poder de penetração na pele. Assim, são mais adequados para tratamentos superficiais dos tecidos. Entretanto, já são descritos na literatura inúmeros exemplos de formulações em gel empregadas como veículos para permeação cutânea, os chamados géis transdérmicos (SOUZA e FERREIRA, 2010).

Existem duas classes de géis, os géis hidrofóbicos, nas quais bases (oleogéis), geralmente constituídos de parafina líquida como polietileno ou óleos gordurosos gelificado, e os géis hidrofílicos, cujas bases hidrossolúveis (hidrogéis) consistem de água, glicerol ou propilenoglicol (GUZZI, 2011).

Os géis hidrofílicos (hidrogéis) são mais utilizados, sendo relativamente pequena a quantidade de preparações em oleogel (NUNES et al, 2012). Os hidrogéis têm sido muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas (CORRÊA et al., 2005). Esses géis possuem na maioria das vezes, comportamento reológico do tipo pseudoplástico e tixotrópico, ou seja, deformam-se durante a aplicação, tornando-se mais fluidos, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que encerra a aplicação, evitando que o gel escorra (SOUZA e FERREIRA, 2010).

Estudos sobre reologia de formulações farmacêuticas de uso tópico têm se tornado cada vez mais freqüentes, pois nota-se que a estabilidade física da formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma. Segundo Correa, 2005, reologia é o estudo do fluxo levando-se em conta as características de viscosidade de pós,

líquidos e semi-sólidos. São divididos em duas categorias: newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada (exemplo: água). O fluxo não newtoniano caracteriza-se por mudança da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. A viscosidade é a medida da resistência do fluido ao fluxo de um sistema após a aplicação de estresse. Portanto, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência e a força a ser aplicada para produzir o fluxo com uma determinada velocidade (THOMPSON, 2006; CORRÊA et al., 2005).

### 3.5.1 Excipientes utilizados na forma farmacêutica gel

Existe grande variedade de matérias primas disponíveis para a preparação de géis e a seleção adequada para o desenvolvimento destas formulações, baseia-se nos requisitos necessários para a estabilidade, liberação e eficácia do ativo que eventualmente será incorporado na preparação (SINHG, 2008).

O gel é composto por agente gelificante, veículo e conservantes, podendo também haver a presença de outros adjuvantes técnicos, como os umectantes. Os agentes gelificantes são utilizados nas preparações farmacêuticas e cosméticas por conferirem aumento de viscosidade. Essa elevação de viscosidade deve-se ao seu elevado grau de solvatação e hidratação e à capacidade de reter moléculas dos líquidos nas suas cadeias macromoleculares. Geralmente, são utilizados polímeros como substância formadora do gel, ou agente gelificante. Dependendo das características do polímero, os géis podem apresentar natureza iônica ou não-iônica. Os géis aniônicos são pH dependentes, apresentando-se mais estáveis em pH neutro ou próximo do neutro. Já os géis de caráter não-iônico possuem estabilidade em ampla faixa de pH, tornando possível a veiculação de substâncias ácidas (CORRÊA et al., 2005).

#### 3.5.1.1 Agentes gelificantes

Os agentes gelificantes podem ser divididos em três classes: derivados da celulose (carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose); polímeros não-celulósicos naturais ou semi-sintéticos (goma xantana, goma adraganta, alginatos, pectina, ágar, ácido algínico); e polímeros derivados do ácido acrílico (CORDEIRO et al, 2013).

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como, o seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele (CORRÊA et al., 2005).

**Carbopol**® é um polímero de ácido acrílico de alto peso molecular (variando de 2 a 30x10<sup>6</sup>) com ligação cruzada. É fornecido na forma pulverizada, como ácido livre. É um dos polímeros mais 37 comuns para fase aquosa. Muito utilizado em formulações farmacêuticas líquidas ou semi-sólidas, como géis, suspensões e emulsões (CORREA et. al., 2005; BONACUINA et. al., 2004).

O Carbopol® 940 é o mais utilizado para produzir géis cristalinos e brilhantes, e apresenta o maior efeito espessante dentre as resinas de carbopol®. O uso tópicos desses géis é vantajoso pois apresentam bom comportamento reológico, e permanecem maior tempo no local administrado (MERCLIN et al., 2004). A resina de Carbopol® quando em dispersão em água, umecta e forma uma dispersão aquosa com valor de pH na faixa de 2,8 – 3,2. Nesse estado, a cadeia polimérica do carbopol® esta extremamente enovelada e sua capacidade espessante é limitante. Para atingir o máximo de viscosidade a molécula deve se desenovelar completamente.

Embora sejam ácidos fracos ( $pK_a > 5,0$  na maioria dos casos), facilmente reagem para formação de sais correspondentes. Existem dois mecanismos para o desenrolamento da molécula, dando um alto efeito de viscosidade ou a melhor propriedade bioadesiva. O mecanismo mais comum envolve a neutralização dos grupamentos ácidos do polímero com uma base orgânica ou inorgânica, como por exemplo, trietanolamina ou hidróxido de sódio, e essa neutralização ionizará a resina com cargas negativas ao longo da cadeia do polímero. A repulsão entre essas cargas contribui para desdobrar a estrutura, enquanto o entrelaçamento das cadeias produz uma matriz tridimensional. O resultado é a formação instantânea de um gel de alta viscosidade. O segundo mecanismo consiste na adição de uma estrutura hidroxil a resina. A combinação de um grupo carboxil a um ou mais grupos hidroxil fornece espessura a resina devido a formação de pontes de hidrogênio. Alguns doadores de grupos hidroxil comumente utilizados são glicerina, propilenoglicol e polietilenoglicol (RECHIA, 2010).

**A Hidroxiethylcelulose** (Natrosol®250) tem grupos hidroxietila ligados à cadeia de celulose e também se encontra disponível em diferentes graus de viscosidade. Hidroxiethylcelulose tem a vantagem de ser solúvel tanto na água quente quanto na água fria, não formando gel sob aquecimento. Este gel é a base de celulose de maior interesse para a veiculação de ativos em dermatologia, possui caráter não-iônico. Tolerar bem pH ácido, sendo indicado para a incorporação de ativos que levem a um abaixamento do pH final da formulação,

como, por exemplo, o ácido glicólico. Embora bem tolerados, pHs extremos, podem causar alterações na viscosidade (CORDEIRO, et al., 2013).

Nos estudos de toxicidade realizados em animais, não foram observados efeitos tóxicos da hidroxietilcelulose na administração oral, tópica ou em contato com os olhos . Pode-se encontrar vários tipos de hidroxietilcelulose com propriedades diferenciadas que modificam sua dispersão e viscosidade em água. A concentração utilizada depende do solvente e do peso molecular do polímero (QUEIROZ, 2008)

### 3.5.1.2 Agentes umectantes

Os agentes umectantes são utilizados em muitas preparações de uso tópico, tais como géis e emulsões, caracterizando cosméticos “skin care”, cuja finalidade é de tratar diversos tipos de pele, em especial, as peles secas, hidratando e impedindo a perda de água do sistema cosmético. As moléculas de umectantes podem ser classificadas quanto a sua carga líquida elétrica em iônicos e não iônicos. Assim, agentes umectantes iônicos induzem interações eletrostáticas nas preparações, enquanto os umectantes não iônicos são adsorvidos na superfície por interações estéricas. No geral, os agentes umectantes mais empregados correspondem aos polióis, tais como butilenoglicol, propilenoglicol e glicerina. Embora seja intuitiva a relação existente entre a presença do umectante na formulação cosmética e sua viscosidade, ainda não se dispõe evidentemente de estudos que atestem a relação deste constituinte com a estabilidade de parâmetros reológicos, tal como da viscosidade aparente (SILVA et al, 2013).

O **Propilenoglicol** é um álcool diol, presente em uma grande quantidade de produtos que entram em contato com a pele humana, tais como medicamentos de aplicação tópica, dermatológica, cosméticos e material de limpeza. É um fluido viscoso, incolor, higroscópico e inodoro. O Propilenoglicol apresenta, além de várias outras propriedades, uma atividade antimicrobiana atuando na preservação contra contaminações microbiológicas das formulações cosméticas. Além disso, atuam na solubilização e dispersão de diversos ingredientes tais como ativos, extratos vegetais, proteínas, vitaminas, aminoácidos, colágenos, conservantes, filtros solares, essências, corantes, pigmentos entre outros (SILVA et al., 2013).

A **glicerina** também chamada de glicerol, é utilizada em diversas formulações farmacêuticas de uso tópico devido às suas características umectantes quando em contato com a pele. É miscível em água e álcool, como solvente é comparada ao álcool e tem propriedades conservantes (GUZZI, 2011).

### 3.5.1.3 Agentes conservantes

Pela possibilidade de contaminação microbiana em polímeros de base aquosa, torna-se de extrema importância a utilização de conservantes na formulação. Além da estabilidade das preparações contra a degradação química e física, ocasionadas pela mudança das condições ambientais no interior de uma formulação, certas preparações líquidas e semi-sólidas precisam ser preservadas contra a contaminação microbiana. As preparações aquosas constituem meios excelentes de crescimento para microorganismos, em especial as semissólidas (RECHIA, 2010).

Dentre os conservantes utilizados para formulações semissólidas de base aquosa, destaca-se os parabenos (metilparabeno e propilparabeno, por exemplo), utilizados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos desde a década de 1920. Os parabenos são antimicrobianos de largo espectro, hidrossolúveis, insípidos, incolores e inodoros. Com tais características, são largamente empregados na formulação de fármacos. As concentrações de parabenos nos medicamentos são variáveis, porém dificilmente excedem 1%. Com isso o Metilparabeno é um derivado do ácido benzóico utilizado em formulações tópicas e orais devido a suas propriedades conservantes e estabilidade numa faixa ampla de pH, fato que não se observa em relação ao ácido benzóico (RAMOS, 2010).

O **Imidazolidinil uréia** é um conservante compatível com praticamente todos os ingredientes da formulação em gel, inclusive tensoativos etoxilados, proteínas e outros ingredientes especiais. É bastante solúvel em água. É muito efetivo contra bactérias gram-negativas, inclusive *Pseudomona aeruginosa*. Tem ação sinérgica quando usado com outros conservantes, o que faz de suas combinações com parabenos, por exemplo, o preservante mais usado do mundo, já que esta associação promove um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e leveduras (PEREIRA, 2011).

## 3.6 Controle da Qualidade de Fitoterápicos

Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) declara que dados extraídos do banco IMS Health/PPP mostram que o mercado de fitoterápicos brasileiro é economicamente relevante e apresenta potencial de crescimento. Em 2014, foram vendidas aproximadamente 56

milhões de unidades, faturando um total de R\$ 1,1 bilhão de reais. Estes números representam 1,9% em unidades e 2,8% em faturamento da participação dos fitoterápicos no mercado total de medicamentos.

Assim, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, (2006), fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes de plantas medicinais, que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase III.

Na cadeia de produção de medicamentos fitoterápicos são necessários, inicialmente, estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos. O primeiro está relacionado com a coleta de informações junto à população a respeito da nomenclatura, dos usos e significados culturais das plantas (LIMA e SANTOS, 2006). Enquanto que, o segundo consiste em combinar as informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal (comunidades e especialistas tradicionais), com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2009).

As drogas vegetais são diferentes dos medicamentos fitoterápicos. Embora ambos sejam obtidos de plantas medicinais, são elaborados de forma diferenciada. As drogas vegetais são constituídas da planta seca, inteira ou rasurada e são utilizadas nas preparações dos “chás”. Os medicamentos fitoterápicos são produtos tecnologicamente elaborados, apresentados na forma final de uso que pode ser comprimido, cápsulas e xaropes. Os produtos iniciais usados na produção de medicamentos fitoterápicos são denominados geralmente de matéria prima vegetal que consiste na planta medicinal e a droga vegetal (CORREIA, 2011).

Nesse contexto, o estabelecimento e a manutenção da qualidade de produtos farmacêuticos de origem vegetal apresentam grandes problemas ligados à insuficiência de dados fitoquímicos sobre muitas matérias-primas vegetais, bem como o desconhecimento das substâncias responsáveis pelas atividades terapêuticas relatadas pois para muitas dessas drogas, as normas farmacopéicas de identificação e qualidade se limitam apenas à identificação botânica da matéria-prima, o que, isoladamente, não garante a qualidade dos produtos (ARAGÃO, 2002; FARIAS et al., 2008).

No entanto muitos vegetais foram estudados quimicamente e farmacologicamente, e esses trabalhos encontram-se publicados em revistas especializadas ou em monografias e podem ser utilizados como recurso na elaboração de técnicas apropriadas de controle de qualidade. Também para a elaboração de bulas, processos de licenciamento e desenvolvimento de produtos é indispensável o acompanhamento dos trabalhos realizados ou em andamento (CARVALHO et al, 2012; NASCIMENTO et al., 2008).

Com o crescimento do uso dessa terapia alternativa, a preocupação com a qualidade de tais produtos cresce em paralelo, pois as agências regulatórias e os fabricantes devem assegurar não apenas a eficácia terapêutica desses produtos, mas também sua qualidade, seja da matéria-prima para uso direto ou de produtos farmacêuticos (GINDRI et al., 2012).

Essa preocupação, em particular com as drogas vegetais, está associada a problemas que foram comumente encontrados ao analisar algumas amostras, tais como a autenticidade do vegetal, a composição química das matérias-primas e sua pureza, fatores que contribuem diretamente para a qualidade ou a má qualidade de um fitoterápico (ANTONIO et al., 2014). Isso ocorre devido ao fato de que as obtenções de drogas vegetais são normalmente oriundas de plantas coletadas, secas e empacotadas sem um controle sanitário rigoroso (GINDRI et al., 2012).

Assim, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 10/2010, a ANVISA regulou o uso popular de plantas medicinais na forma de drogas vegetais. Essa RDC regulamenta a produção de drogas vegetais no Brasil, estando voltada a indústria farmacêutica, e para os produtores e distribuidores de drogas vegetais, além da população em geral.

As drogas vegetais devem ser notificadas a ANVISA sobre a fabricação, importação e comercialização. Essas drogas são destinadas ao uso episódico, oral ou tópico para o alívio sintomático das doenças devendo ser disponibilizadas exclusivamente na forma de droga vegetal para o preparo de infusões, decocções e macerações. A forma de uso de cada droga é pré-determinada. As drogas vegetais enquadradas nessa RDC foram classificadas como produtos de venda livre, isentos de prescrição médica, e com indicação para doenças consideradas de baixa gravidade. O tempo de uso das drogas também foi determinado, sendo a orientação geral de não usar o produto por mais de uma semana (CARVALHO et al., 2012).

Outras importantes ações da ANVISA foram estabelecidas. A primeira foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006 (Atualizada em 2016) e em 2011 foi publicada a 1ª edição do Formulário Nacional de Fitoterápico integrada a Farmacopeia Brasileira, trazendo 83 monografias de medicamentos, como infusões, xaropes e pomadas que são reconhecidas como farmacopeias. (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011). Outra ação desenvolvida pela ANVISA foi à publicação da Resolução Diretiva Colegiada, nº 14 de 31 de março de 2010, que visa normatizar o registro de medicamentos fitoterápicos. Além disso, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 10/2010, a ANVISA regulou o uso popular de plantas medicinais na forma de drogas vegetais. Esses programas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com

qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país. A etapa seguinte é acompanhar o seu uso, com a finalidade de fiscalizar a produção destes fitoterápicos para preservar a saúde do consumidor (BRASIL, 2007).

Dentre os requisitos e parâmetros exigidos pela RDC 10/2010 e RDC 14/2010 e , estão a necessidade do controle de qualidade, com métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímica ou perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) cromatografia gasosa (CG), quando cabível, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica.

Dessa forma no controle da qualidade dos fitoterápicos que perpassa pelos derivados da droga vegetal, excipientes até o produto tecnologicamente acabado, deve-se utilizar metodologia descrita em farmacopéia ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA (BRASIL, 2007), ou validar uma metodologia analítica desenvolvida, obedecendo aos parâmetros especificados para a validação de métodos analíticos apresentados na RE 899/03 – ANVISA.

É exigido ainda Certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Controle para as linhas de produção da empresa, os quais devem atender aos critérios determinados na RDC nº 17/03 que dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Fabricação para as indústrias de medicamentos, para a obtenção de tal certificado. Cabe ressaltar que as normas exigidas para a produção de fitoterápicos e drogas vegetais são as mesmas estabelecidas para os demais medicamentos (CARVALHO, et al., 2012).

### **3.7 Estudo de Pré Formulação aplicados á Fitoterapicos**

Insumos ativos vegetais como plantas e seus derivados (extratos, tinturas, óleos essenciais ou produtos secos) têm sido largamente empregadas em farmácias magistral e estabelecimentos de produção industrial. O estudo inicial para o desenvolvimento de um novo medicamento é denominado de pré-formulação. Esta fase de desenvolvimento é caracterizado como a avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco isolado ou associado a diversos excipientes farmacêuticos, sendo a eficácia e segurança do medicamento desenvolvido, dependente de criteriosos estudos de pré-formulação e produção em concordância com as boas práticas de fabricação (BPF), visando a adequada biodisponibilidade da substância ativa (ALLEN JÚNIOR, 2007).

Todo fitoterápico, assim como todo fármaco possui características químicas e físicas importantes que precisam ser estudadas antes de sua incorporação em um veículo farmacêutico.

Entre estes parâmetros, estão a solubilidade, coeficiente de partição, velocidade de dissolução, forma física de apresentação e estabilidade, que poderão ser avaliados através de metodologias como: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia na região do infravermelho (IV), termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) entre outros (SILVA JÚNIOR, 2006).

Na indústria farmacêutica a utilização de adjuvantes tecnológicos adequados, juntamente com a tecnologia de spray drying, representa um passo importante na garantia da estabilidade e qualidade adequadas de um extrato vegetal (SANTANA, et al, 2017). Recomenda-se a incorporação destes extratos nebulizados em formulações, uma vez que são facilmente obtidos, padronizados e podem ser integrados em formas de dosagem. Estes extratos também têm alta estabilidade microbiológica, química e físico-química (OLIVEIRA E PETROVICK, 2010)

Assim, para a realização dos estudos de pré-formulação torna-se indispensável a realização de estudos de estabilidade do fármaco ou droga na presença de adjuvantes, pois o fármaco/droga e os adjuvantes devem ser compatíveis uns com os outros para produzir um medicamento, ou seja, estável, eficaz, atrativo, fácil de administrar e seguro. Neste estágio do desenvolvimento farmacotécnico, é necessário avaliar a compatibilidade entre o insumo ativo e excipientes. Isto é porque as interações podem afetar a natureza da composição química, e consequentemente, a sua segurança e eficácia (TITA ET AL., 2011).

Com os resultados dos estudos de pré-formulação elabora-se um informe que definirá a viabilidade da forma farmacêutica proposta e a metodologia a ser seguida no desenvolvimento na fase de formulação e elaboração (NUNES et al., 2009).

### **3.8 Técnicas analíticas aplicadas a Caracterização e Controle da Qualidade de Insumos Ativos Vegetais**

#### **3.8.1 Granulometria**

A Farmacopeia Brasileira V edição (2010) e a RDC nº 10 de 2010 descrevem testes que devem ser utilizados para caracterizar uma droga vegetal, como a análise granulométrica que é utilizada na caracterização de pós como grosso, moderadamente grosso, semifino, fino ou finíssimo.

O conhecimento do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento, envolvendo

sistemas de matérias particulados. Essa distribuição influencia em várias etapas da produção, portanto a sua determinação é uma etapa crítica em todos os processos que de alguma maneira envolvam materiais na forma de pó. A granulometria é o parâmetro que determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado na obtenção de preparações intermediárias líquidas como tintura de extratos (CORREIA, 2011).

A determinação da granulometria de pós é realizada por meio de um conjunto de peneiras (tamises) com diferentes aberturas nominais de malha ( $\mu\text{m}$  ou  $\text{mm}$ ). Os tamises são organizados um sobre o outro como uma bateria. Outra forma de caracterizar um pó é através do mesh que designa o número de malhas por polegada do tamis. Assim, uma determinada quantidade da droga vegetal é colocada sobre o primeiro tamis. A bateria é agitada como movimentos horizontais rotativos movimentos verticais, em torno de 15 minutos, promovendo assim, a passagem do pó nas diferentes malhas. O material retido em cada tamis é pesado e a granulometria calculada como porcentagem da quantidade total (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

### 3.8.2 Técnicas Termoanalíticas

Matérias-primas de plantas medicinais são produtos comerciais e tem que ser padronizadas e caracterizadas. No entanto, faltam informações sobre a composição química geral de muitas matérias-primas oriundas de plantas medicinais e suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, a caracterização térmica de materiais vegetais (WESOŁOWSKI e KONIECZYŃSKI, 2003).

Sendo assim, técnicas termoanalíticas têm sido amplamente utilizadas na caracterização e no controle de qualidade de matérias-primas de origem vegetal, uma vez que estas técnicas podem fornecer informações, como o teor de umidade, teor de cinzas, transformações de fase, teor de compostos voláteis e não-voláteis, caracterização de polimorfismo, estabilidade e cinética de degradação (WESOŁOWSKI & KONIECZYŃSKI, 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

Análise térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura. Os métodos térmicos têm sido utilizados na determinação do ponto de fusão de uma substância pura, estudo de interação fármaco/excipiente, caracterização de polimorfismo, na avaliação da cinética de reação, estabilidade e decomposição, entre outros. Sendo que os métodos mais empregados são: Termogravimetria

(TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (COSTA et al., 2013).

As técnicas termoanalíticas possuem importância crescente em todas as áreas de conhecimento da química básica e aplicada. A utilização dessa metodologia, dotada de grande potencialidade, foi favorecida pela disponibilidade de instrumentos controlados por microprocessadores, capazes de fornecer informações quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma precisa e num tempo relativamente curto. Tais métodos estão sendo largamente utilizados no controle da qualidade de produtos naturais ou sintéticos, pois fornecem, com rapidez, dados sobre a estabilidade do material analisado, em relação ao seu comportamento térmico. Além de que dados preliminares sobre o material analisado, levam a pensar que se conhecendo o comportamento térmico do componente majoritário de uma planta, pode-se identificar a autenticidade de um extrato bruto (CAMELO et al., 2012).

Portanto pode-se afirmar que são extensas as aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica em torno da investigação físico-química de produtos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle da qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré-formulação (ALVES et al., 2011).

### *3.8.2.1 Termogravimetria*

Termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura, enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Esta técnica determina as perdas ou ganhos de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo. Os experimentos para avaliar as variações de massa de um material em função da temperatura são executados através da termobalança, permitindo o trabalho sob as mais variadas condições experimentais. As curvas geradas possibilitam a obtenção de informações quanto à estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade dos compostos intermediários e do produto final (AMICO, et al, 2011; ARAÚJO, 2012).

Nas curvas termogravimétricas convencionais ou dinâmicas são registradas as massa da amostra ( $m$ ) em função da temperatura ( $T$ ) ou tempo ( $t$ ). Nessas curvas, os graus em relação ao eixo das ordenadas correspondem às variações de massa sofrida pela amostra e permitem a obtenção de dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas. Assim, as curvas de TG fornecem informações relativas quanto à composição e estabilidade térmica da amostra, dos

produtos intermediários e do resíduo formado além de poderem agregar aos resultados fornecidos pela termogravimetria informações relacionadas a entalpia, identificação de compostos, quantificação de compostos conhecidos e elucidação da estrutura e de propriedades químicas de moléculas, etc (COSTA, 2013).

### 3.8.2.2 *Análise Térmica diferencial*

A análise térmica diferencial verifica a diferença de temperatura entre a substância e o material de referência inerte em função da temperatura ou tempo quando os dois estão sendo submetidos a uma programação determinada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos dos compartimentos onde são acondicionados a amostra e o material de referência no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas, reações endotérmicas (picos descendentes e/ou exotérmicas (picos ascendentes) (CORREIA, 2011).

### 3.8.3 Pirólise acoplada a Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

Pirólise é um processo de conversão do material orgânico por energia térmica. O processo de decomposição térmica do material ocorre em temperaturas elevadas com ausência parcial ou total de oxigênio. Os resultados de uma pirólise ainda podem variar de acordo com os seguintes parâmetros: temperatura de operação do reator, tempo e a razão de aquecimento das amostras, e a pressão de operação do sistema (FRADE et al, 2010).

Quando a amostra é submetida a uma pirólise, parte da amostra é reduzida a carbono e a outra parte quando oxidada pode dar origem a vários compostos, como carboidratos, alcoóis, ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas e fenóis. Com os resultados obtidos, quanto à composição química, é possível determinar a impressão digital (*Fingerprint*) da amostra (FIGUEIREDO, 2011). Para isso pode ser utilizada sozinha ou acoplada a outras técnicas, tais como à Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (Pir-CG/EM)

A espectrometria de massas, em sua essência, consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra e a detecção dos fragmentos é feita de acordo com a massa. Os íons positivamente carregados produzidos são acelerados em um campo magnético que dispersa e permite medidas relativas de íons de diferentes razões massa/carga. O resultado da medida da abundância dos íons versus a massa constitui o espectro de massas, que consiste

de uma série de linhas variando em intensidade em diferentes unidades de massa (MARÇO et al 2008).

A CG/MS é usada tanto para a identificação qualitativa e quantitativa quanto para a medição de componentes individuais em misturas complexas como as drogas vegetais (OLIVEIRA et al, 2010; WANG et al, 2011)

#### 3.8.4 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) pode disponibilizar informações para a determinação da estrutura de um composto orgânico, através da medida dos momentos magnéticos de átomos de carbono e hidrogênio. A espectroscopia RMN é basicamente uma outra forma de espectroscopia de absorção, onde, sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da molécula, sendo que a absorção é função de determinados núcleos da molécula (PASSOS et al, 2011).

Pode ainda ser utilizada eficientemente para se detectar interações entre moléculas dissolvidas, estudando as modificações dos seus espectros e quantificando os deslocamentos químicos encontrados para os diversos grupamentos atômicos que constituem as moléculas (MANSUR et al., 2001).

As dificuldades para se trabalhar com este método podem ser resumidas na influência do solvente e complexidade dos espectros, principalmente os de materiais vegetais que comportam muitas substâncias orgânicas. Entretanto, uma das maiores vantagens de se trabalhar com RMN em comparação com outras técnicas na identificação de compostos está no fato da não necessidade de padrões (MARÇO et al., 2008).

Partindo destes princípios, a RNM pode ser uma técnica utilizada para caracterizar drogas vegetais e como método de controle de qualidade, onde amostras que oriundas do mesmo vegetal devem ter os mesmos espectros e deslocamentos químicos.

#### 3.8.5 Ferramentas quimiométricas

A quimiometria é definida como uma disciplina da química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para o planejamento ou a seleção de maneira otimizada, visando extrair o maior número de informações possíveis a partir dos dados

disponíveis. Dentre as diversas áreas da quimiometria destaca-se o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada (SOUZA et al., 2012).

Com reconhecimento de padrões é possível, a partir de grande conjunto de dados sobre um determinado grupo de amostras, obter agrupamentos entre essas amostras, de forma a detectar similaridade ou tendências. Elas podem ser divididas em técnicas supervisionadas e não supervisionadas. Nas técnicas supervisionadas utilizam o conhecimento prévio do conjunto de amostra para a classificação. Já as técnicas não supervisionadas são verificadas a ocorrência de agrupamentos, sem o conhecimento prévio de características da amostra (FERNANDES, 2012). Dentre as técnicas que são supervisionadas, Veras et al., (2012) mencionam a HCA (Análise hierárquica de agrupamentos - Hierarchical Clusters Analysis) e a PCA (Análise dos componentes principais - Principal Components Analysis). A HCA está baseada na similaridade das amostras por meio das distâncias entre elas e estas expresso principalmente na forma de dendogramas. A PCA baseia-se na manipulação dos dados matemáticos, dos dados de origem, visando obter novas variáveis, que nada mais são que combinações lineares das variáveis originais (VERAS et al., 2012; CORREIA; FERREIRA, 2007).

A análise hierárquica de dados (HCA) esta baseada na similaridade entre as amostras com base nas distâncias expressas em dendogramas (VERAS et al., 2012). Para construção do dendograma, inicialmente calculou-se todas as distâncias entre pares de amostras, neste caso cada um dos excipientes, BRCA e as misturas extrato-excipiente. Existem diversos cálculos para a distância, mas o mais comum e utilizado neste artigo é a distância euclidiana em um espaço multidimensional, matematicamente expresso por:

$$d = \sqrt{((x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + \dots + (z_1 - z_2)^2)}$$

Em que x, y, z são os valores em cada dimensão para a amostra 1 e 2. Assim, calculou-se a raiz quadrada dos somatórios dos desvios quadrados em todas as dimensões.

Calculadas as distâncias entre pares de amostras, é possível construir os agrupamentos utilizando diversos procedimentos, dentre eles a ligação completa (complete linkage). Neste procedimento usa-se a distância dos vizinhos mais distantes, distância máxima, entre dois grupamentos para fazer a ligação entre eles.

Em termos de PCA, os dados são projetados nas direções (ou eixos) perpendiculares do espaço multidimensional, os quais contém a maior quantidade de informação possível (variância máxima), consistindo no tratamento dos dados visando obter novas variáveis, que nada mais são que combinações das variáveis originais apresentando ortogonalidade entre si

(VERAS et al., 2012). Esta manipulação matemática de dados de uma matriz possui como objetivo representar a variação presente em muitas variáveis, usando um pequeno número de fatores ou componentes principais (PC's).

Slavkovska et al., (2001) aplicaram a PCA para a avaliação de subespécies e espécies vegetais na parte central da península balcânica, confirmando mediante os resultados da composição do óleo essencial, que existiam diferenças em populações dentro da mesma subespécie (*Satureja montana* ssp. *montana*), entre as subespécies (*Satureja montana* ssp. *montana* e *Satureja montana* ssp. *pisidica*), e entre as espécies (*Satureja montana* e *S. kitaibelii*).

Rubiolo et al., (2006), classificaram os quatro quimiotipos de *Matricaria recutita*, através da aplicação das técnicas de Microextração em Fase Sólida (MEFS), PCA e cromatografia em fase gasosa. Os autores concluíram que MEFS em combinação com “Fast GC” e CG-EM podem ser usadas como alternativa ou métodos complementares para a classificação de cultivos da planta.

A composição química de 25 amostras de óleo essencial de *Thymus pulegioides* de duas variedades da subespécie *T. silvestris* e quatro variedades da subespécie *T. pulegioides* coletadas em 11 populações na Lituânia foi estudada por CG-EM e PCA e HCA Quatro quimiotipos foram identificados na subespécie *T. silvestris* var. *conglomeratus*, e três quimiotipos na subespécie *T. pulegioides* var. *pulegioides* (LOZIENE, et al.,2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da droga vegetal

A *Momordica charantia* (Folhas e frutos) foi coletada na região semiárida do Estado da Paraíba na zona rural no município de São José da Mata com Latitude ( $7^{\circ} 13'$ ) e longitude ( $35^{\circ} 55'$ ), no período de Dezembro de 2014 a Janeiro de 2015 no horário que compreende seis a dez horas da manhã. Sua exsicata foi depositada no Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba, sob número de registro EAN-257/ACAM, comprovando assim a autenticidade do vegetal.

### 4.2 Preparação das amostras

As folhas e os frutos das plantas foram desidratados em estufa com circulação de ar com temperatura controlada de  $40^{\circ}\text{C}$ . O material seco foi moído usando um moinho de quatro facas móveis e quatro fixas, modelo Willey, da marca Marconi, acoplado a um tamis de 10 mesh. A droga vegetal pulverizada foi submetida a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros:  $>297\mu\text{m}$ ,  $>149-297\mu\text{m}$ ,  $>74-149\mu\text{m}$ , e  $>37-74\mu\text{m}$ . As amostra de frutos foram de nominadas de F1 ( $> 297\mu\text{m}$ ), F2 ( $\leq 297\mu\text{m}$ ), F3 ( $\leq 149\mu\text{m}$ ), F4 ( $\leq 74\mu\text{m}$ ) e das folhas P1 ( $> 297\mu\text{m}$ ), P2 ( $\leq 297\mu\text{m}$ ), P3 ( $\leq 149\mu\text{m}$ ), P4 ( $\leq 74\mu\text{m}$ ).

Para produção dos extratos secos, inicialmente foram obtidos extratos hidroalcoólicos das folhas e dos frutos da *Momordica charantia*. Esses extratos foram adquiridos em condições do sistema de solvente etanol: água na proporção 50%:50% (v/v), foram submetidos ao processo em secagem em *spray drier* de escala laboratorial Modelo LAB PLANT SD-05.

O bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de abertura 1.2 mm operou com taxa de vazão de ar de  $40\text{ L min}^{-1}$  e pressão de 2.0 bar. O dióxido de silício coloidal (CSDA) com tamanho médio das partículas primárias de  $12\mu\text{m}$  foi adquirido da Henrifarma (Lot. 3157052414, Brasil) foi utilizado como adjuvante de secagem na proporção de 20% em relação ao resíduo seco de cada extrato.

O dióxido de silício coloidal (Aerosil) foi selecionado para o estudo por ser um adjuvante com elevada área superficial e estabilidade térmica, além de ser um excipiente seguro quando utilizado em produtos farmacêuticos por via oral ou tópica, sendo muito utilizado como adjuvante tecnológico em estudos para secagem de extratos vegetais por *spray-dryer*.

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da produção desses extratos, foram produzidos três lotes de extratos de cada parte da planta em dias diferentes, obtendo assim no final 6 extratos secos.

### 4.3 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram obtidas infusões a 5% (pó/solvente) dos diferentes tamanhos de partículas dos frutos e das folhas. Para obtenção dessas infusões o solvente utilizado foi água destilada a 100°C. Foram utilizadas cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klesbisiela pneumoniae* (ATCC 4352) as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

#### 4.3.1 *Screening* Microbiológico

Os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaios contendo ágar BHI e em seguida as bactérias foram cultivados em ágar Mullher Hinton a 37°C durante 24 horas e os fungos em ágar sabourad a 25°C durante 48 horas. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Foi utilizada microplacas com 96 poços de acordo com os procedimentos do Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI), (2017).

Os inóculos foram padronizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9%. A suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 625 nm para bactérias e 580 nm para fungos, em uma concentração equivalendo a 10<sup>6</sup>UFC.

Cem microlitros da infusão a 5% (50 mg/mL) foram submetidas a diluição seriada em caldo Mueller Hinton em cada microplaca obtendo assim as seguintes concentrações 25;12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,195 mg/mL de cada infusão. Dez microlitros de cada cultura de microrganismos foram adicionados em cada poço da microplaca.

Foram utilizados como controle negativo água destilada e como controle positivo Gentamicina a 80 mg/mL (bactérias). O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µl de solução aquosa de resarzurina (Sigma Aldrich) a 0,01% com uma incubação adicional a 37 ° C ± 1 ° C durante 2 h. Microrganismos viáveis reduziu o corante azul a coloração rosa. Dessa forma, a CIM foi definida pela menor concentração onde não ocorreu alteração de cor do corante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.4 Ensaios de citotoxicidade

Para determinação da citotoxicidade das drogas vegetais utilizou-se o método de hemólise (Red Blood Cell System). Assim, preparou-se uma suspensão de hemácias a 5% (50mg/mL) em solução salina 0,9%. Em seguida, 1mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL das infusões, diluídas em diferentes concentrações a fim de se obter 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 mg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 10 minutos e submetidas a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), com comprimento de onda de 540nm, utilizando como branco a solução salina 0,9% e como controle positivo a solução hemolizante de Ácido Acético a 2%. A visualização da hemólise foi classificada como: – (<25% de hemólise), + (25% -50% de hemólise), ++ (50% -75% de hemólise), +++ (75%-100% de hemólise) e ++++ (>100% de hemólise) de acordo com Luize et al. ( 2005) e Farmacopeia V edição (Tópico para realização de atividade hemolítica). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para a avaliação da citotoxicidade os extratos foram testados frente a as células da linhagem de fibroblasto L929 e de mastócitos P815.

Para o ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) foram utilizadas placas de 96 poços, micropipetador multicanal e de 1 mL, solução salina PBS, tripsina, meio DMEM acrescido de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), MTT a 5mg/mL, câmara de Neubauer, corante Azul de Tripán e DMSO.

Para realização desse teste foram utilizadas as seguintes concentrações: 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 e 200.0 µg/mL.

O ensaio de MTT consiste em um ensaio colorimétrico que avalia a atividade citotóxica ou proliferativa de diversos compostos. O MTT é um sal tetrazólio, solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan, com coloração púrpura, após a clivagem do anel tetrazólio mediado por desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas. Após a solubilização dos cristais de formazan e medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro ( $\lambda = 560$  nm), é possível avaliar a viabilidade celular, onde a intensidade do produto colorido formado após a solubilização do formazan será diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (FAHEINA-MARTINS, 2009).

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software Inc, San

Diego, CA, USA). Utilizou-se Análise de Variância ANOVA seguido do pós- teste Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

#### 4.5 Ensaio Fitoquímicos

O conteúdo de Polifenóis totais, Flavonoides totais e Taninos condensados das infusões e dos extratos foi mensurado por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o Leitor de ELISA EZ Read 2000 (Biochrom). As infusões foram obtidas nas concentrações de 5% (pó/água destilada). Utilizando microplacas de 96 poços, estas infusões foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 0,02% de cada infusão. Assim, foram testadas diluições seriadas que variaram de 5% a 0,02%. Os extratos foram diluídos em metanol (para quantificação de Flavonoides e taninos) e em água destilada (para quantificação de polifenóis totais) até a concentração de 8 mg/mL. Utilizando microplacas de 96 poços, as soluções dos extratos foram diluídas de modo a obter uma concentração final de 0.625 mg/mL de cada infusão e cada ex. Assim, foram testadas diluições seriadas que variaram de 8 a 0.0625 mg/mL.

##### 4.5.1 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi mensurado através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra e Mejia (2004) com adaptações.

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 50  $\mu\text{L}$  de cada solução e em seguida adicionado 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos antes da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (p/v). A solução foi deixada em repouso pelo período de 10 minutos e posteriormente foi realizada a leitura no comprimento de onda de 757 tendo como “branco” 50  $\mu\text{L}$  água destilada adicionado de 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 1N e 100  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 20% (p/v). As análises foram realizadas em triplicata.

A curva de calibração foi obtida com solução estoque de ácido gálico ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ), da qual foram feitas diluições seriadas nas concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em balões volumétricos de 10 mL. As leituras foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente, substituindo-se as amostras das infusões pelas soluções de ácido gálico.

O conteúdo total de polifenóis foi expresso em microgramas equivalentes do padrão utilizado.

#### 4.5.2 Determinação de Flavonoides totais

O total de flavonoides foi determinado através do método descrito por Meda e colaboradores (2005).

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 100  $\mu\text{L}$  de cada solução e adicionado 100  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  a 2% em metanol (p/v). Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura da absorbância no comprimento de onda de 415 nm. Foram realizadas ainda leituras das infusões com metanol no lugar da solução de  $\text{AlCl}_3$  e o valor da absorbância da leitura anterior foi subtraído do valor desta para que a coloração dos extratos não influenciassem na absorbância, superestimando a quantidade de flavonoides. A amostra do “branco” consistiu em 100  $\mu\text{L}$  de metanol adicionado 100  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  a 2% em metanol (p/v). As análises foram realizadas em triplicata.

O total de flavonoides foi determinado utilizando a curva de calibração utilizando Quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações de 4, 8, 10, 16, 20, 24 e 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e expresso em  $\mu\text{g}$  equivalente de quercetina.

#### 4.5.3 Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993).

Foram adicionados na microplaca de 96 poços 25  $\mu\text{L}$  de cada solução e adicionado 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 75  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado (37%). A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e metanol. As análises foram realizadas em triplicata.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 500 e 600  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de taninos condensados foi expressa em microgramas equivalentes de catequina.

### 4.6 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas das amostras foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-50H, da Shimadzu, na razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , variando

de 25 °C até temperatura de 900 °C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, com fluxo de 50 mL/min e 20 mL/min, respectivamente. Foi utilizada massa de  $5,00 \pm 0,05$  mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração da termobalança foi feita utilizando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas através do software TA 60 WS, da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa.

#### **4.7 Determinação da Cinética de degradação**

A cinética de degradação das drogas vegetais obtidas dos frutos e das folhas da *M. charantia* foi obtida utilizando curvas termogravimétricas em atmosfera de ar sintético (20mL/min) nas seguintes razões de aquecimento: 5, 10, 20 e 40 °C/min. Com base nos dados obtidos nas curvas gravimétricas aplicou-se o modelo de Ozawa para determinação dos parâmetros cinéticos, ordem de reação (n), fator de frequência (A) e energia de ativação (Ea). Para determinação desses parâmetros utilizou-se o software TA 60 WS, da Shimadzu.

#### **4.8 Análise Térmica diferencial (DTA)**

As curvas térmicas diferenciais das amostras obtidas em diferentes granulometrias foram obtidas em um analisador térmico diferencial, modelo DTA-50, da Shimadzu, na razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , variando de 25°C até temperatura de 900 °C, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ . As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina utilizando massa de  $5,00 \pm 0,5$  mg para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada através do ponto de fusão e entalpia dos padrões de índio e zinco. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa TASY 60, da Shimadzu.

#### **4.9 Pirólise acoplada a CG/MS**

A pirólise foi realizada usando um pirolizador (SHIMADZU, Pyr-4A), diretamente acoplado a um sistema de Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (SHIMADZU, GCMS-QP5050A). Foi utilizada uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95) ( com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula). A temperatura da interface  $70^{\circ}\text{C}$  e  $10^{\circ}\text{C/min}$  até  $300^{\circ}\text{C}$ , permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Utilizou-se como gás de arraste o Hélio a um fluxo de 1,7 mL/min e uma razão de split de 1:5. O Espectrômetro de massas foi configurado

para varrer uma faixa de massa entre  $m/z$  50 e 450. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a uma energia 70 e V.

A amostra correspondente a 2 mg do pó das drogas vegetais foi colocada em cadinho de platina e introduzida no pirolisador nas temperaturas de 250, 350 e 450 °C, selecionadas de acordo com as etapas de termodecomposição visualizadas através de termogravimetria das amostras.

Os compostos químicos produzidos nos processos pirolíticos foram identificados através da análise comparativa com os espectros de massa da biblioteca Wiley, 6ª edição para a o Class-500. Com os dados das áreas obtidos nos pirogramas foram montadas matrizes para análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise dos componentes principais (PCA).

#### **4.10 Ressonância magnética nuclear (RMN- $H_1$ )**

Espectros unidimensionais de  $H_1$  foram obtidos utilizando um espectrômetro Varian 500 MHz, tendo como amostra resíduos de extratos hidroetanólicos evaporados (EHE) das drogas vegetais nos diferentes tamanhos de partículas solubilizados em DMSO deuterado (DMSO- $D_6$ ).

Para obtenção dos EHEs foram acondicionados 250 mg da respectiva droga vegetal em um tubo de ensaio, sendo adicionados em seguida 5 ml de solução hidroetanólica 50%. O conjunto foi submetido a extração em banho de ultrassom (USC 2800A, UNIQUE, Brasil) por 1 hora, sendo em seguida deixados em repouso por 24 horas. Este ciclo extrativo foi repetido três vezes. Em seguida, o material foi filtrado utilizando algodão. O filtrado foi acondicionado em cápsulas de porcelana e levado para evaporação do solvente em estufa com circulação de ar (TE 394/2, TECNAL, Brasil) a 40°C por 24 horas. Ao final do processo obteve-se um resíduo que foi solubilizado DMSO- $D_6$  e submetido à análise.

Todos os espectros foram manualmente corrigidos quanto à fase e a linha de base e analisados utilizando-se o software MestreNova® 6.0.2 (Mestrelab Research). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

#### **4.11 Estudo de potência Microbiológica**

Foi realizada a determinação da potência microbiológica dos seguintes vegetais: *Momordica charantia* (frutos e folhas), Esses vegetais foram coletados na região semiárida do Estado da Paraíba, Brasil. Sua exsicata foi depositada no Herbário Manuel de Arruda Câmara

(ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba, sob número de registro EAN-257/ACAM, comprovando assim a autenticidade do vegetal.

Para produção dos extratos secos, inicialmente foram obtidos extratos hidroalcoólicos dos vegetais estudados. Esses extratos foram adquiridos em condições do sistema de solvente etanol: água na proporção 50%:50% (v/v), foram submetidos ao processo em secagem em *spray drier* de escala laboratorial Modelo LAB PLANT SD-05.

O bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de abertura 1.2 mm operou com taxa de vazão de ar de 40 L min<sup>-1</sup> e pressão de 2.0 bar. O dióxido de silício coloidal (CSDA) com tamanho médio das partículas primárias de 12 µm foi adquirido da Henrifarma (Lot. 3157052414, Brasil) foi utilizado como adjuvante de secagem na proporção de 20% em relação ao resíduo seco de cada extrato.

#### 4.11.2 Ensaio microbiológico

##### 4.11.2.1 Meio de cultura

O meio utilizado foi o caldo Müeller Hinton cátion-ajustado. Assim, após a dissolução do meio de cultura, este teve seu pH ajustado entre 7,0 e 7,5 com ácido clorídrico 6,0 M ou hidróxido de sódio 6,0 M e a seguir esterilizado em autoclave a 121° por 15 minutos.

##### 4.11.2.2 Microrganismos utilizados

O ensaio foi realizado utilizando cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923). as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

##### 4.11.2.3 Substâncias padrão de Referência

Como substâncias de referências ou padrão foram utilizados antimicrobiano de utilização clínica, conforme preconizado no Clinical and Laboratory Standards Institute procedures (CLSI) (2015) para as bactérias em questão. Assim foram utilizados o antimicrobiano Cefalotina (Sigma- aldrich L5501) para as análises com *Staphylococcus aureus*

e para as análises com *Escherichia coli* o antimicrobiano Gentamicina (Sigma- aldrich G1914-Sulfato de gentamicina).

As concentrações dos antimicrobianos de referência também foram preconizadas de acordo com o CLSI, 2015 no que diz respeito a concentração inibitória mínima (CIM) para cada antimicrobiano. Assim utilizou-se as concentrações demonstradas na tabela 2. de substâncias de referências, extratos secos obtidos da folha e do fruto. Todas as substâncias foram diluídas em solução salina a 0,9%.

Tabela 2 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (antimicrobianos) e amostras testes (Extratos nebulizados).

Níveis de concentração (%)	Cefalotina µg/mL	Gentamicina µg/mL	Extrato folha mg/mL
25	0,250	0,250	0,250
50	0,500	0,500	0,500
100	1,000	1,000	1,000
200	2,000	2,000	2,000
400	4,000	4,000	4,000

#### 4.11.2.4 Determinação das condições experimentais

##### 4.11.2.4.1 Obtenção da curva de crescimento dos microrganismos

Construiu-se uma curva de crescimento microbiano com o objetivo de identificar o melhor tempo (fase de crescimento) para inserir as amostras testes e as substâncias de referências.

Inicialmente preparou-se um inóculo bacteriano dos dois microrganismos. Assim pegou-se culturas recentes cultivadas em meio sólido, diluiu em solução salina até atingir uma absorbância de 0,08 no comprimento de onda de 630 nm correspondente a  $10^6$  UFC (CLSI, 2017). Para essa leitura utilizou-se um Leitor de ELISA EZ Read 2000 (Biochrom). Em seguida, colocou-se essa suspensão em caldo muller hinton na concentração de 1:10 e encubou-se a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Realizou-se leituras de 30 e 30 minutos até 24 horas, realizando repiques em meio sólido ágar nutriente, através do semeio de superfície. Ao final de 24 horas realizou-se a contagem das colônias e construiu uma curva para observar as fases do crescimento microbiano.

Observando as quantidades de Unidades formadoras de colônia/mL na fase exponencial, estacionária e de decaimento.

#### **4.11.2.4.2 Inserção das amostras e substâncias de referências**

As amostras testes e as substâncias de referências foram inseridas quando os microrganismos encontravam-se em suas fases exponenciais de crescimento. Todas as substâncias testes foram adicionadas nas concentrações estabelecidas. Após 24 horas foram feitas as leituras das absorbâncias e realizou-se repiques em meio sólido ágar nutriente, através do semeio de superfície. Ao final de 24 horas realizou-se a contagem das colônias e foi traçado um gráfico, onde o eixo das abscissas representa a concentração da substância teste e o eixo das ordenadas representa a quantidade e Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Esse gráfico foi utilizado como referência para se determinar a potência antimicrobiana dos extratos nebulizados e das drogas vegetais em relação aos padrões de referência utilizado.

#### 4.11.3 Cálculo da potência antimicrobiana das amostras

Para determinação da potência das substâncias testes em relação aos padrões de referência foi utilizado o Ensaio Balanceado ou fatorial com 3 doses (3x3) onde utiliza-se três concentrações do padrão e três concentrações das amostras testes. Para efetuação dos cálculos foram utilizadas as seguintes expressões matemáticas (LOURENÇO, 2009, SOLANO, 2008, PINTO, KANECO E PINTO, 2010, FARMACOPÉIA, 2010).

$$P = \text{AntiLog}M$$

Onde: P = Potência antimicrobiana

$$M = \text{Log}(r) * A/B$$

Onde: r = razão entre as concentrações das amostras

A = Diferença entre a somatória das concentrações do padrão e das amostras.

B = Soma das diferenças entre a maior e menor dose do padrão e das amostras.

#### 4.11.4 Validação do método analítico

Após a determinação das condições que apresentaram melhor curva dose/resposta, o método desenvolvido foi validado, A validação foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA), e *International Conference on Harmonization* (ICH, 2015), através da determinação dos parâmetros através da avaliação dos parâmetros de, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez. As curvas respostas também foram avaliadas quanto aos parâmetros de regressão linear, falta de ajustes, dispersão dos resíduos e paralelismos entre as retas dos padrões e das amostras.

#### 4.11.4.1 Linearidade

Foram obtidas curvas analíticas tanto das amostras como das substâncias testes nas concentrações apresentadas na tabela 1. Para cada curva analítica foi obtida a equação da reta de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e realizada a análise da adequação do modelo proposto. Além disso, calculou-se o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) que, segundo a resolução brasileira (RDC 889/03) deve ser igual ou superior a 0,98 para considerar a curva analítica adequada. Além disso, foi realizado o teste da falta de ajuste, o teste de significância da regressão e análise dos resíduos.

#### 4.11.4.2 Precisão e exatidão

Três níveis de concentração foram utilizados para avaliar a repetitividade e exatidão das potências antimicrobianas calculadas.

Soluções dos antimicrobianos foram preparados nas concentrações de 0.125, 0.250 e 0.500  $\mu\text{g/mL}$  e da amostra foram nas concentrações de 0.125, 0.250 e 0.500  $\text{mg/mL}$  para a avaliação do nível a 50 % do valor real. Para avaliação do nível de 100% foram utilizadas as concentrações de 0.250, 0.500 e 1.00  $\mu\text{g/mL}$  dos antimicrobianos e 0.250, 0.500 e 1.00  $\text{mg/mL}$  dos extratos. Por fim, para análise do nível de 200% foram estabelecidas as concentrações dos antimicrobianos de 0.500, 1.00 e 2.00  $\mu\text{g/mL}$ , assim como dos extratos de 0.500, 1.00 e 2.00  $\text{mg/mL}$ .

Para cada uma das três faixas de concentração foram preparadas cinco séries de soluções, realizando desta forma, cinco doseamentos a cada nível, sendo realizados dois experimentos em um único dia e mais três experimentos em dias diferentes, avaliando assim a precisão intermediária e a exatidão intradia e interdia.

#### 4.11.4.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor concentração do analito, que é possível detectar pelo método. Assim, foram realizadas análises nas mesmas condições do item 2.2.4 com as os antimicrobianos, amostras e apenas a solução salina a 0.9% (diluente). Além disso, calculou-se o limite de detecção também pela curva de calibração. Portanto, calculou-se na análise do LD a média corrigida do número de Unidades formadoras de colônias obtidas com as análises dos extratos e dos antimicrobianos, assim como o branco que foi o solvente utilizado para diluir as amostras. Além disso obteve-se o limite de detecção também pela curva de calibração.

#### 4.11.4.4 Limite de quantificação (LQ)

Utilizou-se a curva de calibração para determinação do limite de quantificação, que é a menor concentração que pode ser quantificada com exatidão e precisão. Cinco procedimentos foram realizados, dois no mesmo dia e três em dias diferentes; foram calculados o desvio padrão e coeficiente de variação para determinação da exatidão e precisão.

#### 4.11.4.5 Robustez

Para avaliação da robustez houve variação de três parâmetros: Comprimento de onda da leitura da absorbância no espectro (600 e 650nm), pH do meio de cultura utilizado (6.0 e 8.0 ajustados com Ácido clorídrico e Hidróxido de sódio respectivamente) e diluente da amostra (DMSO- 10% e Glicose- 5%). Utilizou-se como controle as condições utilizadas para obtenção da curva de calibração.

Assim, utilizando as concentrações dos níveis 50, 100 e 200% (tabela 1) calculou-se a potência antimicrobiana dos extratos nessas condições.

### 4.12 Desenvolvimento e caracterização das formulações com atividade antimicrobiana

#### 4.12.1 Estudo de compatibilidade

Foi realizado estudo de compatibilidade no intuito de avaliar a compatibilidade entre os extratos obtidos a partir de *M. charantia* (folhas e frutos) com excipientes farmacêuticos comumente utilizados na produção de gel.

O estudo utilizou o sistema de misturas binárias, as quais foram produzidas na proporção 1:1 conforme excipientes apresentados na tabela 3.

Cada mistura assim como os extratos e os excipientes isolados foram submetido a análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TG). As curvas de TG e DTA foram obtidas utilizando um módulo de termobalança simultânea TG / DTA, modelo DTG-60 (Shimadzu), utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados, com cerca de  $2 \pm 0,1$  mg, sob uma atmosfera de nitrogênio a 50 mL/min. Os experimentos foram realizados em temperatura crescente no intervalo de 25 a 450 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa TASY 60, da Shimadzu.

Tabela 3 - Classes dos excipientes utilizados no estudo.

<b>Função</b>	<b>Excipiente</b>
Gelificantes	Trietanolamina; Carbopol; Natrosol
Umectante	Propilenoglicol; Glicerina
Conservante	Metilparabeno; Imidazolinidil uréia,

Para avaliar a compatibilidade extrato/excipiente determinou-se a região de temperaturas onde ocorreram os eventos exotérmicos, calculando a energia liberada na região de 25-250°C e de 250-450°C. Em seguida, foi estabelecido um valor teórico de entalpia para cada região da mistura com base nas energias liberadas na decomposição dos extratos e dos excipientes conforme fórmula a seguir:

$$Et(mistura) = E(extrato) + E(excipiente)$$

Onde:

Et = Entalpia Teórica

E = Entalpia liberada em cada evento

Com isso, considerou-se como excipiente compatível aquele em que a sua mistura apresentou valores reais de entalpia mais próximos ou maiores que os valores teóricos.

#### 4.12.3 Desenvolvimento das formulações

Para o desenvolvimento do gel, foram selecionados aqueles excipientes que uma melhor compatibilidade através da DTA e TG.

Para o preparo do gel foram determinados os percentuais dos constituintes para 100 g da formulação, indicados na Tabela 4. Iniciou-se com água aquecida a 70 °C para a solubilização dos componentes da formulação na sequência (sem o Natrosol). Acrescentou-se lentamente o Natrosol, agitando-se com velocidade moderada, até a dispersão completa, ajustando-se o pH para a faixa entre 6,5-7,0 após 24 horas com a trietanolamina. O gel foi acondicionado em recipiente plástico opaco, com tampa de rosca, em temperatura ambiente (BRASIL, 2012).

Tabela 4 - Constituintes e seus percentuais utilizados na preparação do gel.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (%)
Natrosol	4
Propilenoglicol	7.0
Imidazolinidil uréia	0.6
Extratos	5.0
Água destilada	q.s.p. 100

#### 4.12.4 Caracterização das formulações

##### 4.12.4.1 Ensaios organolépticos

Os aspectos organolépticos do gel foram avaliados após 24 horas de formulado, após os ensaios de centrifugação e estresse térmico.

**Aspecto:** Foram observadas características macroscópicas, turvação e precipitação.

**Cor:** Por meio de leitura visual foi avaliado se ocorreu mudanças na coloração inicial do produto.

**Odor:** Foi observado se houve mudança no odor inicial do produto.

##### 4.12.4.2 Centrifugação

As formulações foram centrifugadas durante 30 minutos a 3000 rpm, à temperatura ambiente. Em seguida, as formulações foram avaliadas quanto a possíveis sinais de instabilidade como formação de sedimentos, precipitações, mudanças na viscosidade e separação de fases.

#### 4.12.4.3 Estresse térmico

O estresse térmico foi realizado com submissão das amostras a aquecimento em um banho termostático. A faixa de temperatura utilizada foi de 40 °C a 60 °C, com aumento crescente de 10 °C. As amostras foram mantidas em cada temperatura por 30 minutos, sendo avaliadas quanto a possíveis sinais de instabilidade como formação de sedimentos, precipitações, mudanças na viscosidade e separação de fases.

#### 4.12.4.4 pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25 °C. As amostras foram diluídas em água destilada a proporção de 1:10, e as leituras foram realizadas em triplicata, com imersão do eletrodo na solução formada.

#### 4.12.4.5 Viscosidade

A viscosidade das amostras foi determinada utilizando viscosímetro de Brookfield Viscotead one (Fungilab, Brasil) acoplado ao *spindle* R6 na velocidade de rotação progressiva 10-100 RPM. Os resultados foram obtidos em triplicata.

#### 4.12.4.6 Espalhabilidade

A espalhabilidade das amostras foi determinada a partir da leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em um sistema formado por uma placa molde circular de vidro com orifício central, sobre uma placa suporte de vidro posicionada sobre uma escala milimetrada (ISAAC et al., 2008). Aproximadamente 0,5 g da amostra foi introduzido no orifício da placa e a superfície foi nivelada com espátula, sendo a placa-molde cuidadosamente retirada. Uma placa de vidro de peso pré-determinado foi colocada sobre a amostra. Após o intervalo de um minuto, a área superficial abrangida pela formulação foi determinada através da medição dos diâmetros no sentido horizontal e vertical, com o auxílio da escala milimétrica (papel milimetrado). O procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas, todas previamente pesadas. A espalhabilidade foi calculada conforme a Equação 3:

$$Ei = d^2 \cdot \frac{\pi}{4}$$

Onde: Ei: Espalhabilidade da amostra para um determinado peso (mm<sup>2</sup>); d: diâmetro médio (mm).

#### 4.12.4.7 Avaliação preliminar da estabilidade

As formulações foram caracterizadas no início (T0) e final (T12) do ciclo. Para comparação, foram armazenadas amostras à temperatura ambiente, sendo caracterizadas com o pH, viscosidade, espalhabilidade, e características organolépticas após 12 dias

#### 4.12.4.8 Análise da eficácia da formulação

O gel desenvolvido foi submetido à ensaio de doseamento microbiológico e a ensaio fitoquímico com 24 horas e no final de 12 dias com o objetivo de avaliar se foram mantidos o efeito antimicrobiano dos extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia* quando incorporado à formulação.

#### 4.12.4.9 Ensaio de doseamento microbiológico

Para realização do doseamento microbiológico utilizou-se a técnica de microdiluição. Dessa forma o meio utilizado foi o meio utilizado foi o caldo Müeller Hinton cátion-ajustado e o ensaio foi realizado utilizando cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

O doseamento foi realizado utilizando como padrão os próprios extratos que já tiveram sua potência antimicrobiana definida.

Assim, as concentrações utilizadas dos extratos e das formulações estão apresentadas na tabela 5. Todas as substâncias foram diluídas em solução salina a 0,9%.

Tabela 5 - Níveis e concentrações utilizadas das amostras de referência (Extratos nebulizados) e amostras testes (Formulações).

<b>Níveis de concentração (%)</b>	<b>Extrato folha mg/mL</b>	<b>Extrato fruto mg/mL</b>	<b>Formulação folha mg/mL</b>	<b>Formulação fruto mg/mL</b>
<b>50</b>	0.500	0.500	10.00	10.00
<b>100</b>	1.000	1.000	20.000	20.000
<b>200</b>	2.000	2.000	40.000	40.000

As amostras testes e as substâncias de referências foram inseridas quando os microrganismos encontravam-se em suas fases exponenciais de crescimento. Todas as substâncias testes foram adicionadas nas concentrações estabelecidas. Após 24 horas foram feitas as leituras das absorvâncias e realizou-se repiques em meio sólido ágar nutriente, através do semeio de superfície. Ao final de 24 horas realizou-se a contagem das colônias e foi traçado um gráfico onde o eixo das abscissas representa a concentração da substância teste e o eixo das ordenadas representa a quantidade e Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Esse gráfico foi utilizado como referência para se determinar a potência antimicrobiana das formulações em relação aos extratos.

Para determinação da potência das formulações em relação aos extratos foi utilizado o Ensaio Balanceado ou fatorial com 3 doses (3x3) onde utiliza-se três concentrações do padrão e três concentrações das amostras testes. Para efetuação dos cálculos foram utilizadas expressões matemáticas descritas no capítulo 3. (LOURENÇO, 2006. SOLANO, 2008. PINTO. KANECO E PINTO. 2010. FARMACOPÉIA. 2010).

Foi utilizado como branco a formulação sem a adição dos extratos.

A potência antimicrobiana foi calculada em 24 horas (T0) e 12 dias (T12) após a formulação está pronta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Droga vegetal

#### 5.1.1 *Screening* Microbiológico

No *screening* microbiológico de *M. charantia* foi verificado que a droga vegetal apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas padrão de *S. aureus*, *E. coli*, *K.pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Tabela 6). Evidenciando que a água é um solvente eficiente que pode ser utilizado para a extração de materiais vegetais bioativos. Esta informação é importante, pois de acordo com Romero et al., 2005 a água é geralmente o solvente principal usado pela medicina popular para obtenção de preparações a partir de plantas. Muitos dessas preparações são usados para tratar condições que normalmente resultariam em infecções bacterianas. Além disso, Houssain, 2014 evidenciou esteroides glicosilados isolados em extratos aquosos dos frutos e sementes de *M. charantia*. e Miranda et al, 2013 afirmam que os esteroides glicosilados, dentre outras substâncias, encontraram-se presentes nos extratos de algumas espécies vegetais ativas contra alguns microrganismos e atribuiu a atividade antibacteriana observada para esses vegetais a tais classes de compostos.

A Tabela 6 apresenta os valores de CIM dos infusos com concentrações abaixo de 1 mg/mL para as diferentes bactérias, independentemente dos tamanhos de partículas.. Todavia verificou-se diferenças nos valores CIM para os infusos das folhas entre as bactérias, sendo mais potente em *Staphylococcus aureus* seguida por *Escherichia coli* e menos potente para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae*. Os infusos dos frutos apresentaram valores CIM com mais potência para *Escherichia coli*, seguida de *Klebsiela pneumoniae* e menos potente em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os tamanhos de partículas influenciaram apenas na potência antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Alguns estudos relatam a diferenciação na composição química e atividade farmacológica em função do tamanho de partícula (MA e MU, 2016; LIN, TEY e CHAN, 2014).

Tabela 6 - Valores de CIM apresentados contra os microrganismos estudados.

Drogas vegetais	MIC (mg/mL)			
	Microrganismos testados			
<i>Momordica charantia</i>	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>K.p</i>
<i>Folhas</i>				
P1	0,195	0,195	0,780	0,780
P2	0,195	0,195	0,780	0,780
P3	0,195	0,195	0,780	0,780
P4	0,195	0,390	0,780	0,780
<i>Momordica charantia</i>				
<i>Frutos</i>				
F1	0,780	0,195	0,780	0,390
F2	0,780	0,390	0,780	0,390
F3	0,780	0,390	0,780	0,390
F4	0,780	0,195	0,780	0,390

*S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *E.c.*: *Echerichia coli*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*

### 5.1.2 Ensaio de citotoxicidade

Este ensaio de citotoxicidade permite quantificar e avaliar os efeitos adversos de algumas substâncias sobre a membrana plasmática das hemácias e a conseqüente liberação da hemoglobina (hemólise) quantificado por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e a concentração da substância fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vivo* (PINTO et al, 2010).

Em todas as concentrações estudadas as infusões de *M. charantia* apresentou uma citotoxicidade menor que 50% em relação ao controle positivo (Tabela 7 e 8), dessa forma nenhuma das concentrações testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC<sub>50</sub>), ou seja que é capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 4% de eritrócitos (SCHULZ, et al., 2009). O mesmo perfil foi obtido com as infusões obtidas das folhas e as obtidas dos frutos.

Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e conseqüentemente danos à saúde (BAGANTINI; SILVA; TEDESCO, 2007). A citotoxicidade de plantas medicinais deve ser considerada um problema de saúde pública, pois efeitos adversos, intoxicação e interações com outras drogas comumente ocorrem, o que não foi observado nesse estudo, mas, algumas plantas utilizadas apresentaram efeito hemolítico nas concentrações que mostraram atividade antimicrobiana (VEIGA JUNIOR, PINTO E MACIEL, 2008).

Zhao et al, 2014, avaliaram a Citotoxicidade contra células humanas cancerígenas de alguns compostos isolados dos frutos de *M. charantia*, onde todos os compostos apresentaram um efeito citotóxico fraco com valores de E50 bastante elevados (acima de 14.3 µmol/L).

Em estudo toxicológico realizado por Baltran, Gengaihi e Shabrawy 2006, foram testados os extratos aquoso e etanólico das folhas de *M. charantia* em ratos. No fim do experimento os autores concluíram que nenhum dos extratos apresentaram efeitos tóxicos nos ratos normais. Para esse resultado foram avaliados alguns parâmetros bioquímicos como Ureia, Creatinina, TGO e TGP.

Tabela 7- Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com infusões das folhas de *M. charantia*.

Concentrações (mg/mL)	Absorbância	Intensidade de hemólise
50	0,320	-
25	0,300	-
12,5	0,285	-
6,25	0,200	-
3,12	0,178	-
(controle positivo)	1,620	++++

– (<25% de hemólise), + (25%-50% de hemólise), ++ (50%-75% de hemólise), +++ (75%-100% de hemólise) e ++++ (>100% de hemólise)

Tabela 8 - Ensaio de citotoxicidade. Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com infusões dos frutos de *M. charantia*.

Concentrações (mg/mL)	Absorbância	Intensidade de hemólise
200	0,551	-
100	0,430	-
50	0,254	-
25	0,222	-
12,5	0,201	-
(controle positivo)	1,620	++++

- (<25% de hemólise), + (25%-50% de hemólise), ++ (50%-75% de hemólise), +++ (75%-100% de hemólise) e +++++ (>100% de hemólise)

### 5.1.3 Ensaio fitoquímico

Foi utilizado a concentração de 0,25 % (pó/água) para todas as drogas vegetais, visto que na concentração de 5% (pó/água) a absorbância foi ultrapassada dos valores equivalentes a cada um dos padrões utilizados.

Com os resultados das tabelas 9, 10 e 11, é possível perceber que os taninos são os metabólitos secundários que se apresentam em maior quantidade nas folhas e nos frutos de *M. charantia*. A presença de taninos em *M. charantia* já foi relatado em alguns estudos (GROVER e YADAV, 2004; ZOCOLLER, et al., 2006; GOMES et al, 2011; JOSEPH & JINI, 2013). Esses compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, portanto, ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. (MONTEIRO, ALBUQUERQUE, ARAÚJO, 2005). Dessa forma a atividade antimicrobiana dessa espécie pode ser atribuída, entre outros fatores, a presença de taninos em altas concentrações nas folhas e nos frutos dessa planta.

Tabela 9 - Teor de Taninos equivalente a catequina obtidos por espectroscopia na região do visível.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração µg/mL</b>
P1	132.293±0.01
P2	142.693±0.02
P3	162.560±0.02
P4	175.093±0.01
F1	132.026±0.02
F2	143.360±0.02
F3	170.960±0.01
F4	190.426±0.01

Os polifenóis totais também se apresentaram em quantidades significantes em todas as infusões obtidas. Budrat e Shotipruk, 2009 em estudos realizados com frutos de *M. charantia*, obtiveram um extrato aquoso obtido por fluido supercrítico onde foi determinada a quantificação de polifenóis totais utilizando o mesmo método desse estudo, assim, foram obtidas concentrações desses compostos que variaram de 0,02 a 0,42 mg/g (peso seco) equivalentes a ácido gálico (EAG). Comprovando assim, que em extratos aquosos pode conter quantidades significativas desses compostos.

Tabela 10 - Teor de polifenóis equivalente a ácido gálico obtidos por espectroscopia na região do visível.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração µg/mL</b>
P1	61.705±0.01
P2	68.437±0.01
P3	74.450±0.01
P4	76.934±0.01
F1	48.503±0.01
F2	55.823±0.01
F3	70.921±0.01
F4	74.777±0.01

Os compompostos que apresentaram em menor quantidade foram os flavonoides totais, porem com quantidades também significativa, visto que vários estudos comprovam a presença desses compostos na *M. charantia* (GROVER & YADAV, 2004; ZOCOLLER, et al., 2006; ROOPASHREE et al., 2008; GOMES et al, 2011).

Tabela 11 - Teor de flavonoides equivalente a quercetina obtidos por espectroscopia na região do visível.

<b>Amostras</b>	<b>Concentração µg/mL</b>
P1	11.016±0.06
P2	14.326±0.05
P3	17.021±0.07
P4	18.912±0.05
F1	9.952±0.05
F2	11.773±0.02
F3	19.290±0.02
F4	20.212±0.03

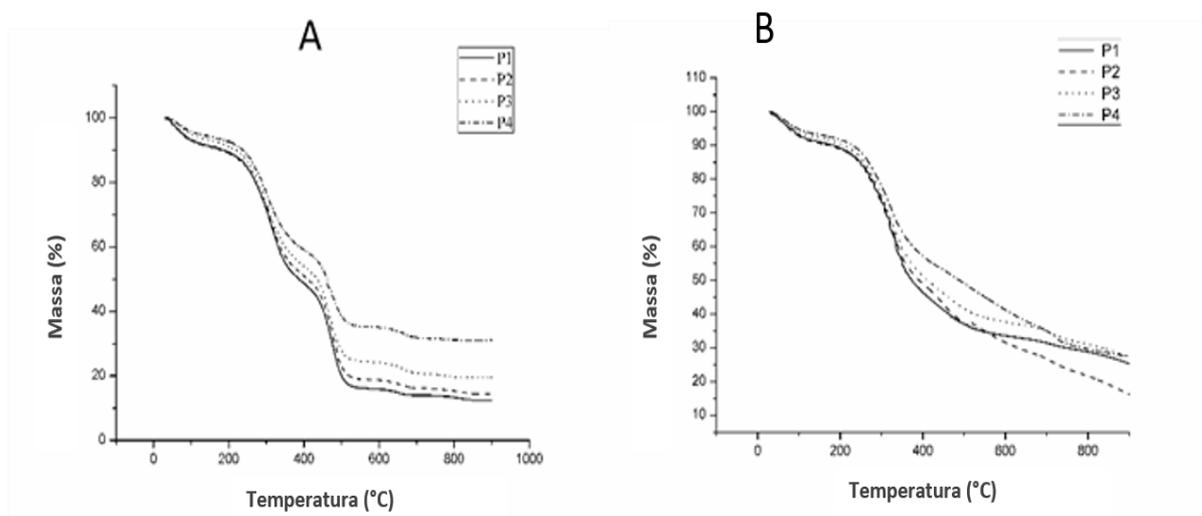
Percebe-se ainda que ocorreu uma variação inversalmente proporcional nas concentrações de todos os metabólitos em função do tamanho de partícula. Portanto, as drogas vegetais obtidas com tamanhos de partículas menores possuem quantidade maiores dos metabólitos quantificados. Possivelmente esse fato ocorreu devido ao aumento da área superficial das amostras com tamanhos de partículas menores, facilitando assim, a reação entre diversos compostos químicos e aumentando a concentração dos produtos dessas reações.

Essa mesma observação pode ser confirmada pela diferença dos deslocamentos nas curvas TGs, nos valores da energia de ativação da cinética de degradação e nos valores de entalpia das curvas DTAs que serão explicados posteriormente.

#### 5.1.4 Análise termogravimétrica (TG)

A decomposição térmica das amostras, tanto folhas como frutos ocorreu em seis etapas quando submetidas as atmosfera de ar sintético e atmosfera inerte na razão de aquecimento de 10°C/min. Entretanto, observou-se que na presença de ar sintético a degradação das drogas vegetais ocorreu de forma mais intensa, apresentando assim, mais uma etapa de degradação e um menor resíduo mineral em todas as amostras em relação a atmosfera inerte na mesma razão de aquecimento (Figuras 5 e 6).

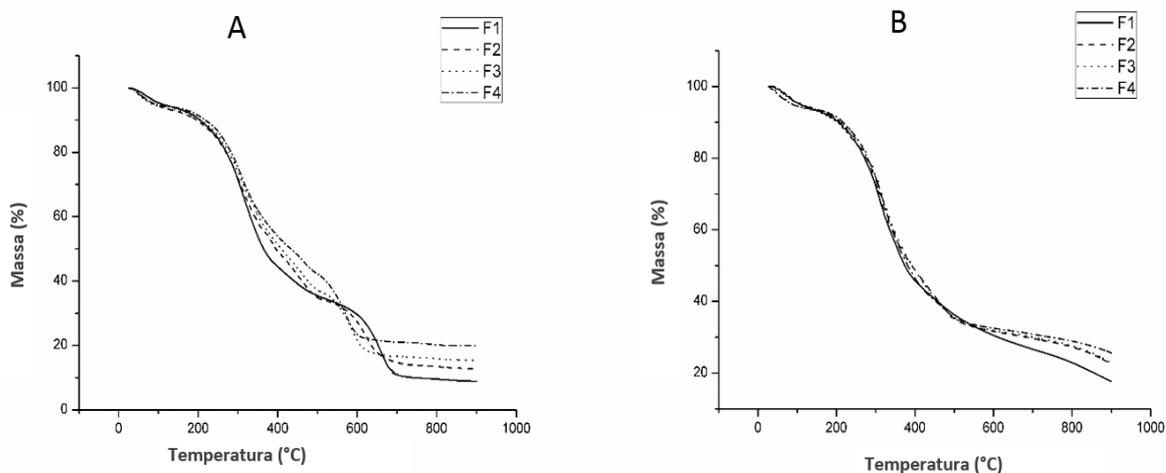
Figura 5 - Curvas TG das Drogas vegetais *M. charantia* (Folhas) em diferentes tamanhos de partículas na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).



Em atmosfera oxidativa (ar sintético) o primeiro evento de decomposição térmica ocorreu nos seguintes intervalos de temperaturas para as folhas 35-103°C, 35-106°C, 35 – 109°C, 35-116°C, com as seguintes perdas de massas 6,7%; 7,3%;5,6% e 5,0%, para as amostras P1, P2, P3, e P4, respectivamente. Os mesmos eventos foram observados quando as drogas vegetais foram submetidas a atmosfera inerte, obtendo assim as seguintes faixas de temperaturas 35-96°C, 35-105°C, 35-106°C e 35-107°C para as seguintes perdas de massa equivalentes 3,3%, 6,9%, 6,1% e 5,4% referindo-se as amostras P1, P2, P3 e P4, respectivamente.

Para as drogas vegetais obtidas a partir dos frutos da *Momordica charantia*, observou-se eventos semelhantes. Dessa forma, essa primeira etapa de decomposição em ar sintético ocorreu em 35-108°C, 35-90°C, 35-89°C e 35-116°C-, com as seguintes perdas de massas 4,6%, para as amostras F1 e F2, e de 4,7% e 5,0% para F3 e F4, respectivamente, observando os mesmos eventos quando as drogas vegetais foram submetidas a atmosfera inerte, obtendo assim as seguintes faixas de temperaturas 35-107°C, 35-108°C, 35-110°C e 35-114°C para as seguintes perdas de massa equivalentes 3,8%, 4,5%, 5,3% e 4,4% referindo-se as amostras F1, F2, F3e F4, respectivamente.

Figura 6 - Curvas TG das Drogas vegetais *M. charantia* (Frutos) em diferentes tamanhos de partículas na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).



A primeira etapa de decomposição térmica tem como característica marcante a perda de produtos voláteis principalmente a água livre, já que tal evento ocorre nas faixas de fusão e vaporização dessa substância (FERNANDES et al, 2012; CORREIA, et al 2015). Estes valores de perda de massa referente a água estão de acordo com o nível recomendado de água na amostra que é inferior a 14% (ARAUJO et al, 2012).

A segunda etapa de degradação térmica está relacionada com a perda de água ligada nas drogas vegetais, observando uma menor perda de massa nas drogas vegetais obtidas dos frutos (F1, F2, F3 e F4) com perdas de 2,2%, 3,2%, 3,1% e 4,0% respectivamente, em relação as obtidas das folhas (P1, P2, P3 e P4) com perda de 4,5%, 4,4%, 4,6% e 4,0% respectivamente. Foi observado praticamente os mesmos eventos nas duas atmosferas avaliadas, indicando que possivelmente essa etapa de degradação não depende da atmosfera na qual as drogas vegetais foram submetidas.

Nas drogas vegetais obtidas das folhas de *Momordica charantia* a terceira etapa em ar sintético apresentou valor máximo de perda de massa de 11,9%, ocorrendo entre 213°C a 285°C para a amostra P1, obtendo valores semelhantes na atmosfera inerte. Para as drogas oriundas dos frutos, a maior perda de massa em atmosfera oxidativa ocorreu na amostra F3 entre a faixa de temperatura de 184°C a 267°C perdendo 9,3% de massa, ocorrendo valores semelhantes quando submetida a atmosfera inerte. Sugere-se que não houve decomposição pela degradação dos componentes da matriz do vegetal, mas apenas saída de constituintes das amostras, podendo ter ocorrido uma transição de fase, como uma volatilização, já que obteve perfis semelhantes para as drogas vegetais nas duas atmosferas estudadas (CORREIA et al, 2013).

A etapa de degradação em que houve uma maior perda de massa foi a quarta etapa para todas as drogas vegetais. Dessa forma, entre as drogas obtidas das folhas a que teve uma maior degradação foi a P2 com perda de massa de 24,6% obtida entre as temperaturas de 270°C a 358°C. Para os frutos a que teve uma maior degradação nessa etapa foi a F1 com perda de massa de 35,9% entre a faixa de temperatura de 251°C a 360°C. Essa etapa foi considerada como a principal etapa de decomposição térmica de todas as drogas vegetais. Este evento provavelmente está relacionado com a decomposição térmica de hidratos de carbono e outros compostos orgânicos presentes na espécie (COSTA et al, 2013).

Houve perfis de decomposição térmica semelhantes nas duas atmosferas avaliadas nessa etapa, assim como nas amostras obtidas de frutos e folhas e nos diferentes tamanhos de partículas sugerindo assim a presença dos mesmos constituintes químicos de origem orgânica em todas as drogas vegetais.

A etapas seguintes representaram a continuidade do processo de degradação com formação de resíduo mineral no final. A quantidade desse resíduo mineral variou de 18,3% a 37,0% para as amostras obtidas das folhas e de 10,2% a 37,0% para as amostras dos frutos. Observou também uma variação dessa quantidade de acordo com o tamanho de partícula. Os dados mostram que os resíduos minerais das amostras de folhas e frutos em diferentes tamanhos de partículas podem ser utilizados para fazer a diferenciação da integridade da amostra em cada granulometria. Os resultados obtidos corrobora com aqueles encontrados por Correia et al, 2015.

#### 5.1.5 Determinação da Cinética de degradação

Foram obtidas curvas termogravimétricas de todas as amostras nas seguintes razões de aquecimento 40, 20, 10 e 5°C/min. Todas as curvas foram obtidas utilizando atmosfera oxidativa.

Todas as amostras apresentaram seis eventos de decomposição térmica. Foi observado um aumento da temperatura inicial de cada evento em função da razão de aquecimento. Observou-se também um deslocamento das temperaturas e perdas de massas de acordo com o tamanho de partícula quando obtidos na mesma razão de aquecimento (Figura 7 e 8). As partículas de menores tamanho (P4 e F4) obtiveram uma menor perda de massa, obtendo assim um maior resíduo mineral.

Esse deslocamento pode estar associado com a composição química diferenciada em cada tamanho de partícula, existindo diferentes taxas de transferência de calor para cada

amostra e de energia de ativação para degradação em cada diferente tamanho de partícula (TITTA et al, 2011). Não foram obtidos perfis diferentes entre as drogas obtidas das folhas e dos frutos de *M charantia*.

A maior perda de massa foi obtida da amostra P1 quando submetida na razão de aquecimento de 5 °C/min, sendo essa perda de massa igual a 29,4% ocorrendo entre as temperaturas de 247,65°C a 342,13°C. Essa maior perda de massa pode estar associado a presença na amostra P1 de uma quantidade maior de constituintes químicos degradáveis nessa faixa de temperatura. Assim como ocorreu com amostra F1 na razão de 10°C/min que foi a amostra entre as drogas vegetais obtidas dos frutos que apresentou uma maior perda de massa (35,974%) entre 251,66°C a 360,03°C.

Figura 7- Curvas TG da *M. charantia* (folhas) em diferentes tamanhos de partículas. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razao de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min.

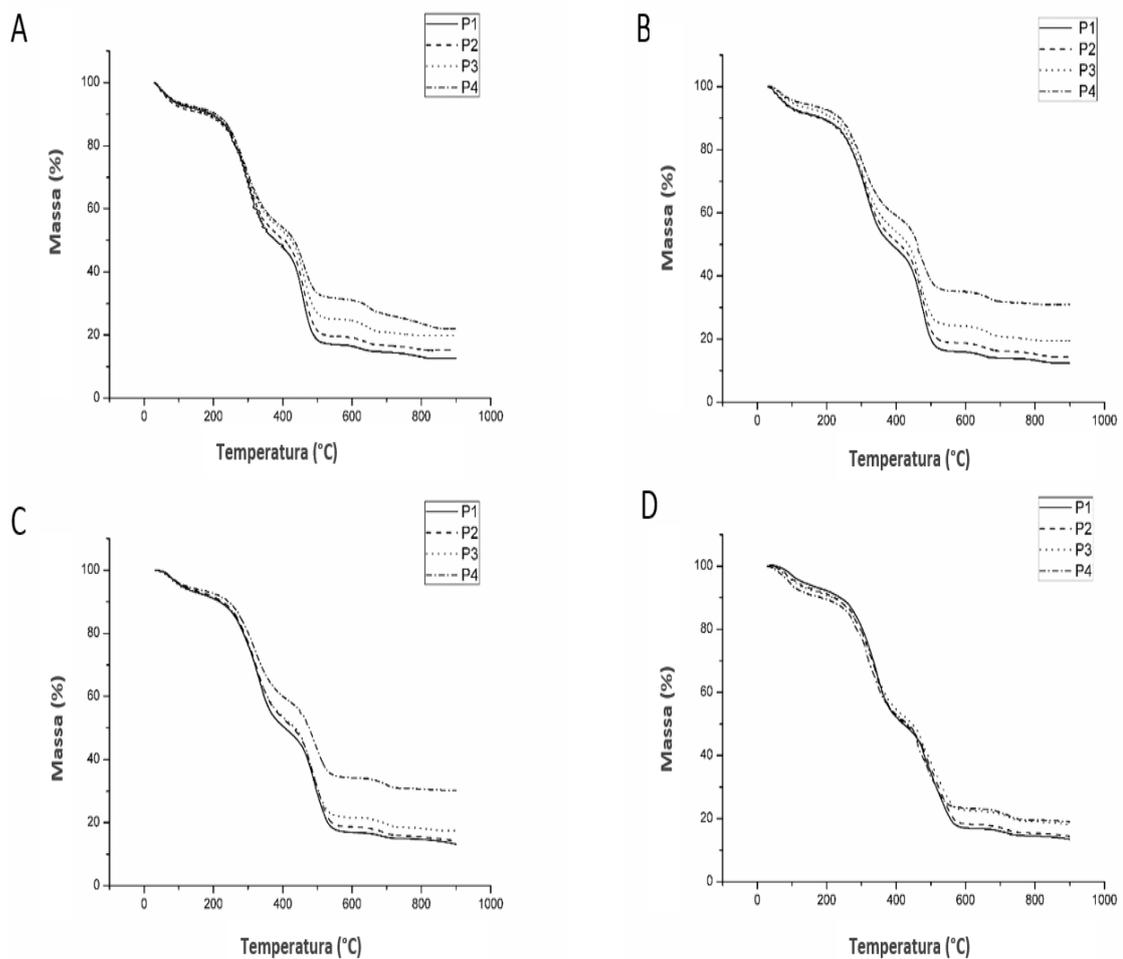
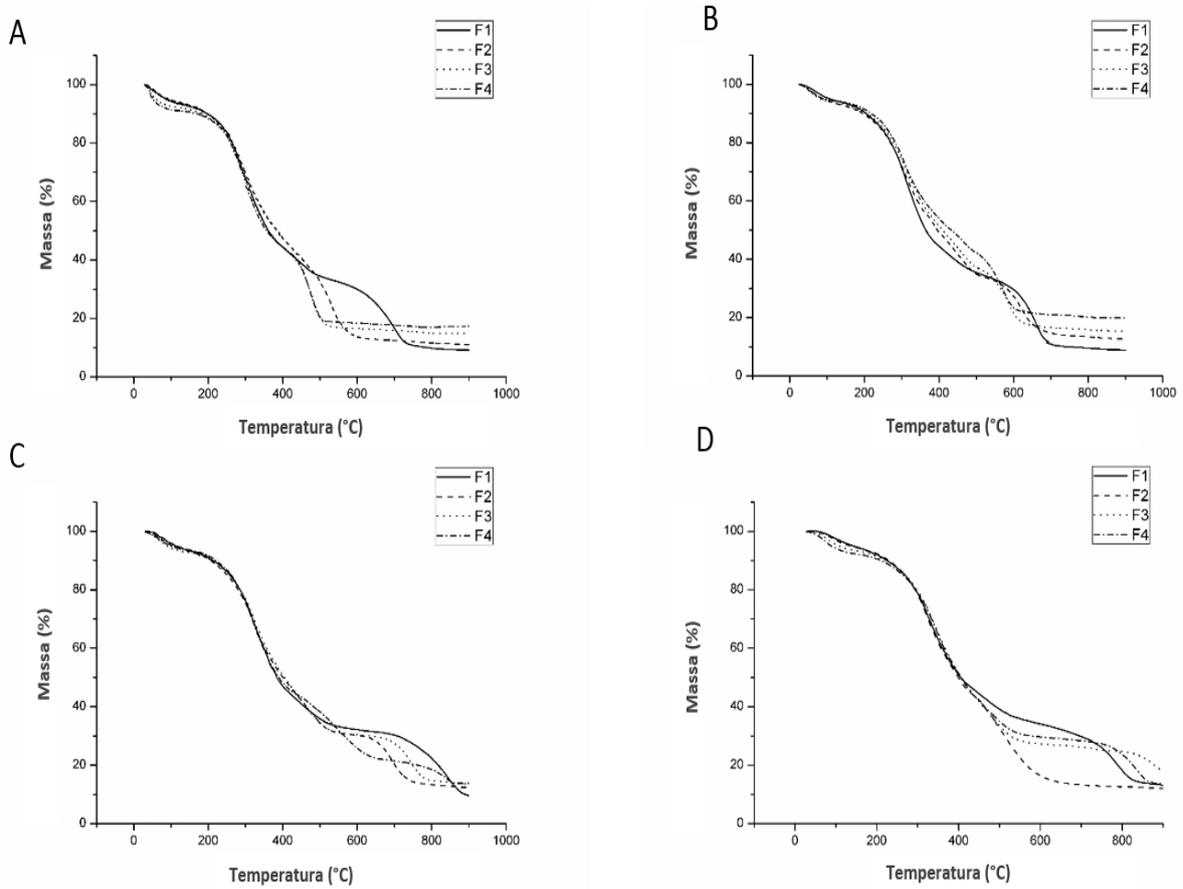


Figura 8 - Curvas TG da *M. charantia* (frutos) em diferentes tamanhos de partículas. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min.



Foi escolhida a quarta etapa onde ocorreu a maior perda de massa no processo de reação de decomposição térmica para todas as amostras para calcular os parâmetros da cinética de degradação pelo método de Ozawa. Os dados referentes a essa etapa estão descritos nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Parâmetros de decomposição da principal etapa de degradação das amostras obtidas da folhas.

<b>Amostras</b>	<b>Razão de aquecimento (°C/min.)</b>	<b>Onset (°C)</b>	<b>Endset (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
<b>P1</b>	5	247,65	342,13	29,4
	10	285,06	347,95	20,95
	20	286,29	364,07	21,099
	40	291,74	374,78	23,68
<b>P2</b>	5	246,79	345,33	27,622
	10	270,67	358,18	24,601
	20	285,68	364,43	23,33
	40	228,11	377,00	25,461
<b>P3</b>	5	258,8	341,54	23,086
	10	267,41	352,54	23,145
	20	279,68	373,59	25,48
	40	315,01	387,98	19,111
<b>P4</b>	5	262,36	350,7	22,35
	10	264,9	355,38	21,994
	20	292,08	373,47	19,082
	40	298,77	376,04	21,825

Tabela 13 - Parâmetros de decomposição da principal etapa de degradação das amostras obtidas dos frutos.

<b>Samples</b>	<b>Rate (°C/min.)</b>	<b>Onset (°C)</b>	<b>Endset (°C)</b>	<b>Weight loss (%)</b>
<b>F1</b>	5	248,19	356,07	32,764
	10	251,66	360,03	35,974
	20	263,18	364,96	29,223
	40	295,15	393,36	28,788
<b>F2</b>	5	215,86	341,84	26,699
	10	270,67	344,99	24,985
	20	251,16	362,28	27,477
	40	275,13	369,21	27,185
<b>F3</b>	5	238,7	351,89	32,449
	10	267,22	380,08	28,589
	20	401,51	586,96	18,052
	40	407,77	587,98	19,111
<b>F4</b>	5	259,77	361,88	30,83
	10	343,61	393,11	24,842
	20	362,73	425,92	10,933
	40	401,51	527,7	34,756

Com o cálculo obtido pelo método cinético de Osawa, obteve-se a mesma ordem de reação para todas as amostras como mostra a tabela 14.

Tabela 14 - Paramêtros cinéticos de degradação térmica das drogas vegetais obtidas dos frutos e das folhas da *Momordica charantia*.

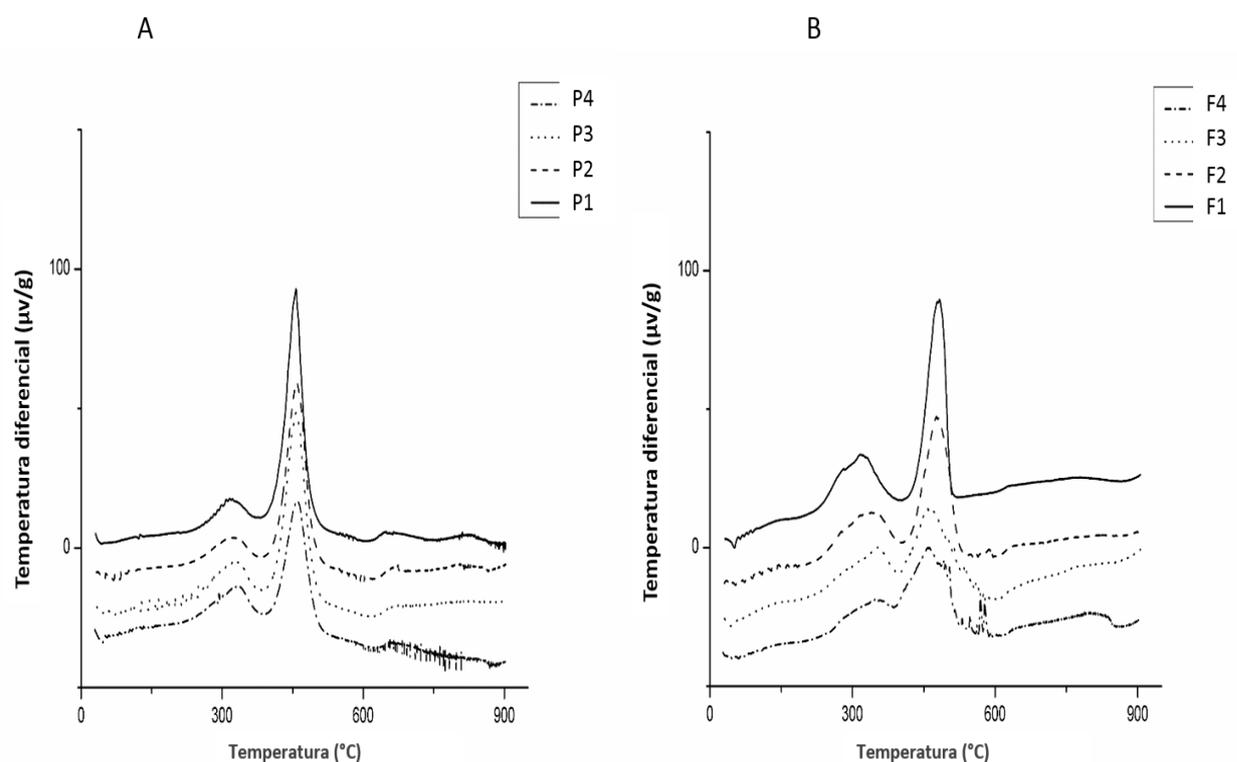
PARÂMETROS CINÉTICOS			
	Energia de ativação (Kj/mol)	Ordem de reação	Fator de frequência (min <sup>-1</sup> )
<b>F1</b>	137,23	0	2,409x10 <sup>7</sup>
<b>F2</b>	132,35	0	1,376x10 <sup>6</sup>
<b>F3</b>	79,54	0	4,227x10 <sup>3</sup>
<b>F4</b>	64,71	0	6,112x10 <sup>2</sup>
<b>P1</b>	217,38	0	1,648x10 <sup>14</sup>
<b>P2</b>	180,81	0	2,867x10 <sup>11</sup>
<b>P3</b>	168,12	0	3,426x10 <sup>10</sup>
<b>P4</b>	88,71	0	3.265x10 <sup>6</sup>

Foi observado que o valor da energia de ativação diminuiu com a diminuição do tamanho de partícula. Esse fato ocorreu tanto nas amostras obtidas dos frutos como as obtidas das folhas. Sendo assim, foi observado que a energia de ativação seguiu a seguinte ordem F1>F2>F3>F4 para os frutos de P1>P2>P3>P4 para as folhas. A energia de ativação é definida como a energia mínima necessária para que ocorra reações químicas, inclusive reações de quebra de macromoléculas (PAN et al, 2015; PUGAZHENTHI e KATIVA et al, 2014). Assim, esse resultado já seria esperado uma vez que, as amostras de pós com tamanhos de partículas menores caracterizam-se por ter uma maior área superficial além de serem amostras mais instáveis e conseqüentemente necessitam de uma menor energia de ativação para que ocorram as reações de termodecomposição (CORREIA et al., 2015).

#### 5.1.6 Análise Térmica Diferencial

As drogas vegetais obtidas das folhas de *M. charantia* quando submetidas a análise térmica diferencial evidenciaram dois eventos exotérmicos.(Figuras 9).

Figura 9 - Curvas DTA da *M. charantia* em diferentes tamanhos de partículas na razão de aquecimento de 10°C/min. (A) Folhas; (B) Frutos.



Os valores de entalpia e as temperaturas iniciais e finais de cada evento estão apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 - Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas das folhas de *M. charantia* em diferentes tamanhos de partículas.

Amostras	1º Evento		2º Evento	
	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)
<b>P1</b>	315,86	0,464	456,90	4,18
<b>P2</b>	316,28	0,433	457,74	3,78
<b>P3</b>	328,21	0,445	457,26	3,42
<b>P4</b>	333,57	0,416	458,51	2,71

Observou-se que o segundo evento apresentou uma maior liberação de energia, sugerindo-se assim que esse evento esteja relacionado com uma maior perda de massa. Essa sugestão é confirmada correlacionando os dados das curvas DTA com os das curvas TG, observando que esse evento, com liberação de maior energia, ocorre logo após a etapa de maior

perda de massa na análise termogravimétrica. Nessa faixa de temperatura é onde ocorre degradação de estruturas aromáticas e ligações saturadas em carbonos, entre outras quebras de estruturas de hidrocarbonetos, presentes em grandes quantidades em drogas vegetais (COSTA et al, 2013).

Além disso, observou-se que no segundo pico exotérmico houve uma diminuição diretamente proporcional da entalpia em função dos tamanhos de partículas, assim, a amostra P4 obteve uma menor entalpia. Essa diferença nos valores de energia pode estar associada a presença de macrocomponentes como celulose e lignanas que podem estar em maior quantidade nas amostras com tamanhos de partículas maiores, exigindo assim, uma maior energia liberada para degradação desses componentes (MA e MU, 2016; LIN, TEY e CHAN, 2014).

Para as drogas vegetais obtidas dos frutos observou-se perfis semelhantes (tabela 16) nas curvas de DTA, apresentando assim, dois picos exotérmico e o segundo evento apresentando uma maior entalpia, correlacionando com as curvas termogravimétricas onde ocorre uma maior perda de massa.

Tabela 16 - Eventos exotérmicos das DTA das drogas vegetais obtidas dos frutos de *M. Charantia* em diferentes tamanhos de partículas.

Amostras	1º Evento		2º Evento	
	Temperatura (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura (°C)	Entalpia (Kj/g)
<b>F1</b>	350,65	0,526	461,98	2,33
<b>F2</b>	353,79	0,521	462,34	2,24
<b>F3</b>	339,75	0,509	457,26	2,12
<b>F4</b>	336,96	0,505	458,51	1,46

As drogas vegetais dos frutos evidenciou uma maior variação da entalpia no segundo evento de acordo com o tamanho de partícula, assim, a amostra F4 com menor tamanho de partícula, obteve uma menor entalpia nesse segundo pico.

### 5.1.7 Pir-CG/MS

Os dados das curvas TG apresentaram perdas de massa significativa das drogas vegetais nas faixas de temperatura de 250°C a 500°C. Com o objetivo de avaliar quais os produtos de degradação estavam sendo liberados, as amostras foram submetidas ao processo de pirólise nas temperaturas de 250°C, 350°C e 450°C, representando as temperaturas iniciais e intermediárias do processo de decomposição térmica.

As tabelas 17 e 18 mostra os principais compostos liberados durante as etapas de degradação térmica, analisados pela biblioteca Willey 6ª edição para o Class-500.

Com os dados nas tabelas 17 e 18 percebeu-se que os mesmos componentes, nas determinadas temperaturas, foram liberados de todos os tamanhos de partícula, não ocorrendo assim diferenciação entre as drogas com granulometria diversas em relação aos compostos analisados, porém houve diferentes valores de intensidade e diferentes tempo de retenção nos picos cromatográficos que variaram de acordo com o tamanho de partícula. Esse mesmo fato ocorreu com as drogas vegetais obtidas das folhas. Os valores de áreas seguiram sempre a mesma sequência  $F1 > F2 > F3 > F4$  e  $P1 > P2 > P3 > P4$ . (Figuras 10 e 11).

Nas amostras provenientes das folhas a substância Neofitadieno ( $C_{20}H_{38}$ ) foi evidente nas três temperaturas, porém com diferentes áreas, apresentando valores maiores de área nas temperatura de 450°C com tempo de retenção de retenção de P1, 25.8 min, para P2, 26.8 min para P3 e P4 27.2 min. Outros compostos também apareceram em destaque nessas amostras como o Solanesol ( $C_{45}H_{74}$ ), que foi evidenciado nas temperaturas de 350°C e 450°C, o Ácido mirístico ( $C_{14}H_{28}O_2$ ) e o Limoneno ( $C_{10}H_{16}$  evidenciado nas temperaturas de 350°C e 450°C respectivamente.

Nas amostras obtidas dos frutos, submetidas na temperatura de 250°C os compostos similares que apresentaram maiores áreas foram os ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) e ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), evidenciados nos tempos de retenção, 24.7 min para F1, 25.3 min para F2, 25.4 min para F3 and 25.8 min para F4, referente ao ácido esteárico. Para o ácido palmítico os tempos de retenção foram para F1 de 26.0 min, 26.5 min. para F2, 26.6 min para F3, e 26.4 min para F4.

O ácido esteárico também foi evidenciado na temperatura de 350°C, porém com uma maior área no tempo de retenção de 22.3 para F1, 22.4 min para F2 de 22.8 min para F3 e F4 de 22.9 min Além dessa substância, o ácido mirístico também obteve intensidade considerável aparecendo no tempo de retenção de 18,5 min, 18,6 min e 18,7 min e 18,1 para as amostras F1, F2 e F3 e F4 respectivamente. Na temperatura de 450°C as substâncias que tiveram uma maior

intensidade foram o ácido oleico, o limoneno e o eugenol, com maior intensidade em F1 com tempo de retenção de 17,3 min, 10,1min e 14.1 min, respectivamente.

Para fins de análise quantitativa dos compostos liberados foi calculada a área relativa de cada substância em partículas de tamanho diferente em cada temperatura. Para calcular a área relativa dos picos similares para as três amostras foi considerada como 100% a soma das áreas de todas os compostos analisados.

Para as amostras obtidas a partir das folhas foi verificada através destas percentagens que os da amostra cujo tamanho de partícula é menor (P4) mostrou uma área cromatográfica menor considerando o composto Neofitadieno (C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>), quando relacionado com partículas de maiores tamanhos, observou este perfil nas três temperaturas analisadas.

Com amostras obtidas dos frutos também foi observada a amostra com menor tamanho de partícula (F4), obteve um pico com uma área menor quando considerados alguns compostos. Nas temperaturas de 250 ° a 350 ° C para este perfil prevaleceu compostos Ácido esterático e Ácido palmítico. Na temperatura de 450 ° C foi observado esse perfil nos compostos Ácido palmítico e Ácido oleico.

Observou-se que os compostos que apareceram nas três temperaturas tiveram áreas diferentes, aumentando essa área com o aumento da temperatura, assim os compostos em 450°C obtiveram maior intensidade (Figuras 10 e 11), possivelmente relacionado com a quebra de produtos resultantes de reações ocorridas nas outras temperaturas. Observou-se também que na temperatura de 450°C os picos cromatográficos resultantes do processo pirolítico mostrou a presença de um número maior de substâncias provenientes da degradação térmica. O que é esperado já que em temperaturas um pouco menor que essa é onde ocorre maior perda de massa análise termogravimétrica (TG) e uma maior liberação de energia na análise térmica diferencial (DTA). Assim, os produtos de degradação são detectados em maior quantidade nessa temperatura.

Tabela 17 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas (*M.charantia* folhas).

Temperatura	Substancia	Amostras											
		P1			P2			P3			P4		
		Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Área	%	Rt (min)
250°C	Neophytadiene (C20H38)	2850,342	45,87	25,8	2692,730	44,90	26,8	563,273	4,32	27,2	2383,374	43,08	27,2
	Palmitic acid (C16H32O2),	1583,093	25,47	23,2	1559,289	26,00	23,5	1539,281	26,58	24,6	1510,295	24,70	24,9
	n- Hexatriacontane (C36H74),	993,024	15,98	12,8	974,583	16,25	12,9	948,215	16,37	13,4	918,271	16,60	13,6
	Farnesol(C15H26O)	787,294	12,67	14,9	769,247	12,82	15,1	738,458	12,75	15,2	719,342	13,00	15,5
350°C	Neophytadiene (C20H38)	2903,483	24,38	26,1	2748,301	23,66	26,4	2573,293	22,78	26,7	2357,492	21,65	27,1
	Palmitic acid(C16H32O2)	1780,329	14,95	23,4	1754,382	15,10	23,8	1738,962	15,39	24,2	1712,227	15,72	24,6
	n-Hexatriacontane (C36H74),	1291,548	10,84	12,7	1267,265	10,91	13,1	1243,837	11,01	13,4	1205,381	11,07	13,8
	Farnesol(C15H26O),	782,391	6,57	15,1	763,274	6,57	15,4	740,394	6,55	15,7	714,392	6,56	15,9
	Solanesol (C45H74O)	1882,761	15,81	8,3	1862,397	16,03	8,5	1846,286	16,34	9,1	1829,265	16,80	9,3
	Myristic acid (C14H28O2),	1090,284	9,15	17,8	1074,374	9,25	18,2	1047,213	9,27	18,3	1018,537	9,35	18,7
	Pyrogallol (C6H3(OH)3),	1284,325	10,78	19,8	1265,539	10,89	20,1	1248,297	11,05	20,5	1222,389	11,22	20,8
Oleic acid (C18H34O2)	893,258	7,50	16,1	876,290	7,54	16,3	854,261	7,56	17,1	827,294	7,59	17,2	
450°C	Neophytadiene (C20H38), N-	2953,257	20,35	26,1	2725,283	19,49	26,5	2498,273	18,73	26,8	2229,038	17,60	27,3
	Oleic acid (C18H34O2)	783,221	5,39	16,5	753,938	5,39	16,7	721,883	5,41	17,1	709,216	5,60	17,6
	Chloro octadecanol (C18H37Cl)	1190,382	8,20	22,1	1174,398	8,40	22,4	1144,829	8,58	22,6	1119,503	8,84	23,1
	Carvacol (C10H14O)	984,120	6,53	3,6	963,825	6,89	3,8	932,168	6,99	4,2	911,274	7,19	4,6
	Palmitic acid (C16H32O2)	1589,251	10,95	23,5	1565,390	11,20	23,8	1534,027	11,50	24,1	1515,356	11,96	24,4
	Farnesol (C15H26O)	692,383	4,77	14,7	674,372	4,82	15,1	655,219	4,91	15,5	627,391	4,95	15,8
	Myristic acid (C14H28O2)	794,276	5,47	17,7	771,264	5,51	18,2	742,111	5,56	18,6	718,432	5,67	19,1
	Solanesol (C45H74O)	2576,324	17,76	15,6	2465,219	17,63	16,1	2298,346	17,23	16,5	2093,287	16,53	16,8
	Pyrogallol (C6H6O3)	1398,281	9,36	19,5	1372,901	9,82	19,7	1343,205	10,07	20,2	1311,361	10,35	20,1
	Limonene (C10H16)	882,298	6,08	13,2	861,295	6,16	13,7	836,273	6,27	13,9	819,375	6,47	14,1
m-cresol (C7H8O)	662,348	4,56	5,1	648,271	4,63	5,3	629,112	4,71	5,7	608,351	4,80	6,1	

**Legenda:** Rt: Tempo de retenção.

Tabela 18 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas (*M.charantia* frutos).

Temperatura	Substancia	Amostras											
		F1			F2			F3			F4		
		Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Área	%	Rt (min)
250°C	Esteratic acid (C18H36O2)	1637,234	50,8	24,7	976,990	48,70	25,3	965,899	48,51	25,4	879,422	48,27	25,8
	Propionic acid (C18H26O3)	508,234	21,7	16,,2	501,543	24,78	16,5	490,700	24,74	16,6	424,876	23,44	16,9
	Palmitic acid (C16H32O2)	346,521	16,9	26,0	323,987	16,00	26,5	310,887	15,67	26,6	299,563	15,22	26,4
350°C	3-methyl-cyclohexane (C7H14O)	233,321	10,6	16,1	221,344	10,93	16,4	215,543	10,86	16,7	208,742	21,65	16,9
	palmitic acid (C16H32O2)	1011,543	22,30	23,4	1000,257	21,45	23,8	987,213	21,37	24,2	939,458	15,72	23,9
	Phytol (C40H20O)	689,456	14,26	18,7	650,854	13,96	18,1	634,739	14,94	18,4	617,947	11,07	18,6
	Esteratic acid (C18H36O2)	1876,675	38,80	22,4	1776,946	38,12	22,8	1564,987	35,60	22,9	1482,432	6,56	22,9
	Mirístic acid (C14H28O2)	1832,456	18,5	18,3	1817,587	18,6	8,5	1806,637	18,85	18,7	1794,322	16,80	19,1
	n-eicosanol (C20H42O)	423,876	8,76	13,8	375,686	8,91	14,2	401,543	9,24	14,3	376,836	9,35	14,9
450°C	Palmític acid (C16H32O2)	1587,529	15,72	23,1	1573,478	15,56	23,5	1546,851	15,07	23,8	1515,876	14,62	24,2
	ciclohexanol-3-metyl (C7H14O)	876,934	8,07	16,5	852,129	8,16	16,7	833,990	8,39	17,1	809,231	8,39	17,3
	Guiacol(C2H2O2)	598,976	5,51	8,1	567,306	5,43	8,4	529,408	5,32	8,6	506,096	5,24	8,9
	mirístic acid (C14H28O2)	1798,903	16,57	18,5	1764,807	16,90	18,8	1749,091	17,59	4,2	1700,093	17,63	19,6
	n-eicosanol (C20H42O)	398,446	3,67	13,5	371,913	3,56	13,8	346,021	3,48	14,1	332,765	3,45	14,4
	Eugenol (C10H12O2)	786,034	7,24	11,7	772,865	7,40	12,1	743,294	7,47	12,5	722,341	7,49	12,7

Oleic acid (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	2657,897	24,48	22,7	2447,381	23,44	22,2	2166,823	21,80	22,6	2096,379	21,74	22,7
Metyl pulegenato (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O)	689,028	6,34	15,4	653,987	6,26	16,1	626,731	6,30	16,2	608,355	6,31	16,3
Limonene(C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	973,254	8,96	13,7	964,211	9,23	14,2	943,598	9,49	14,6	921,111	9,55	14,5
Solanesol (C <sub>45</sub> H <sub>74</sub> O)	487,675	4,49	10,2	471,991	4,52	10,7	452,343	4,55	10,9	427,965	4,43	10,2

**Legenda:** Rt: Tempo de retenção.

Figura 10 - Pirogramas obtidos das folhas de *M. charantia* nas temperaturas de 450, 350 e 250°C.

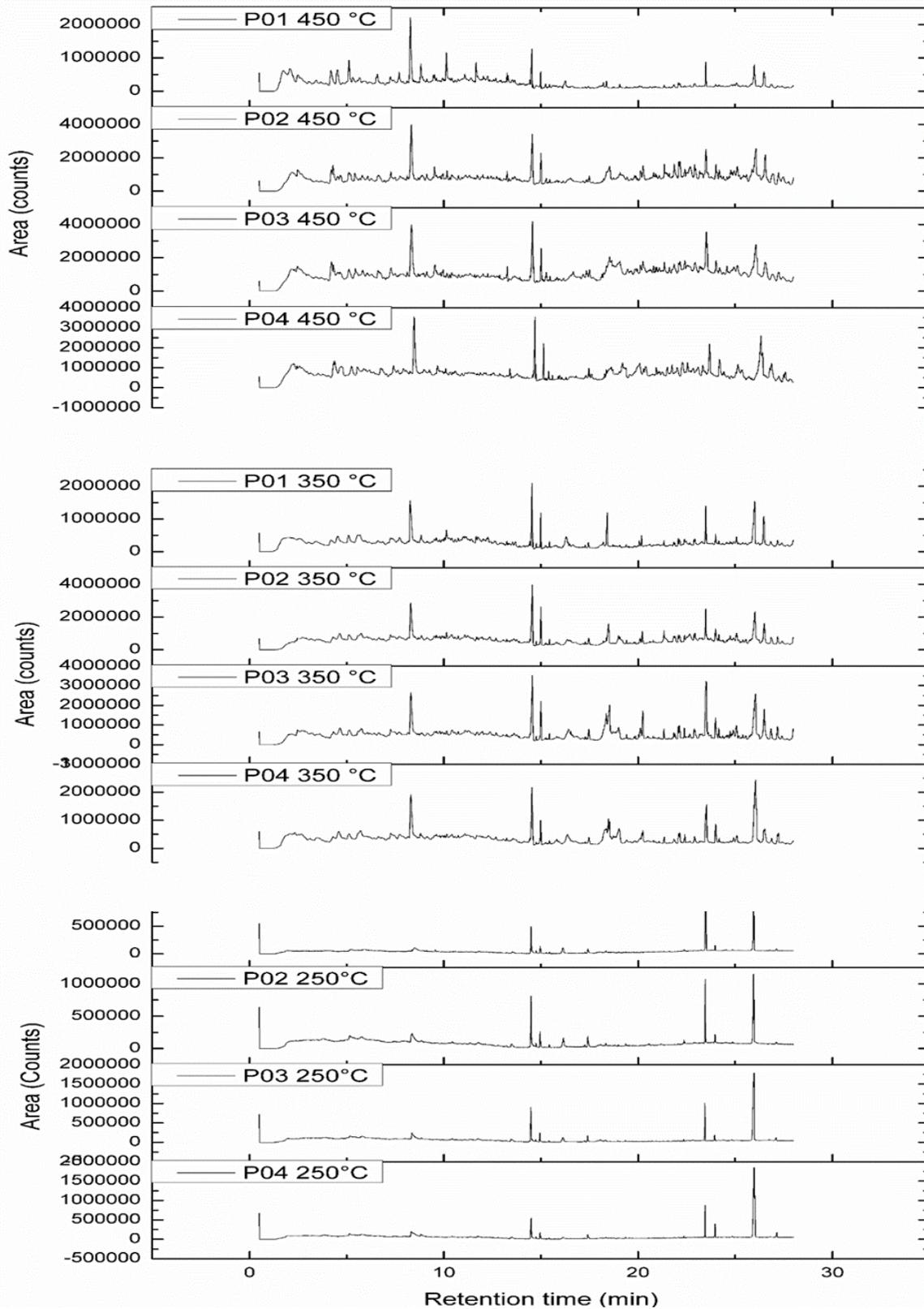
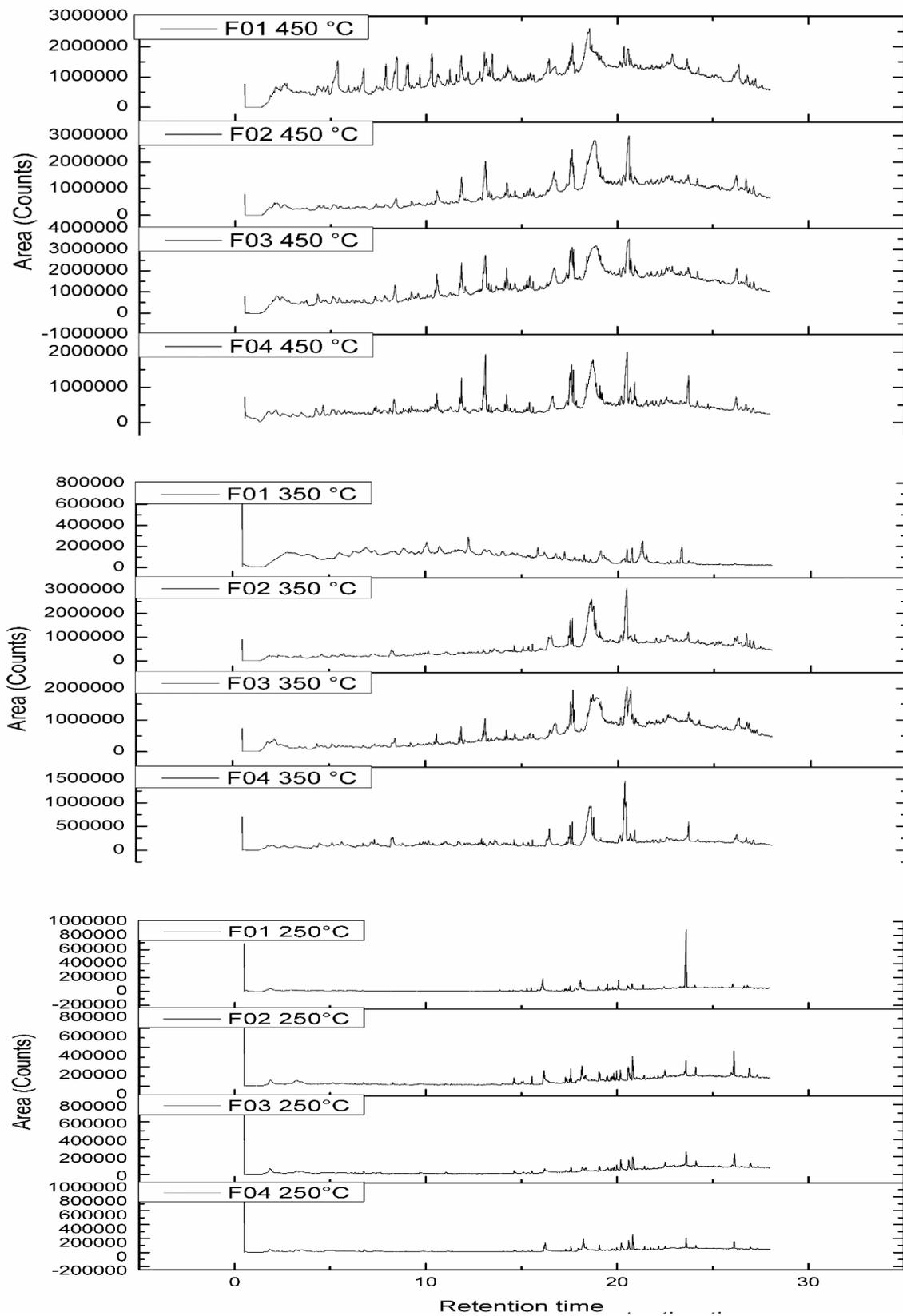


Figura 11 - Pirogramas obtidos dos frutos de *M. charantia* nas temperaturas de 450, 350 e 250°C.

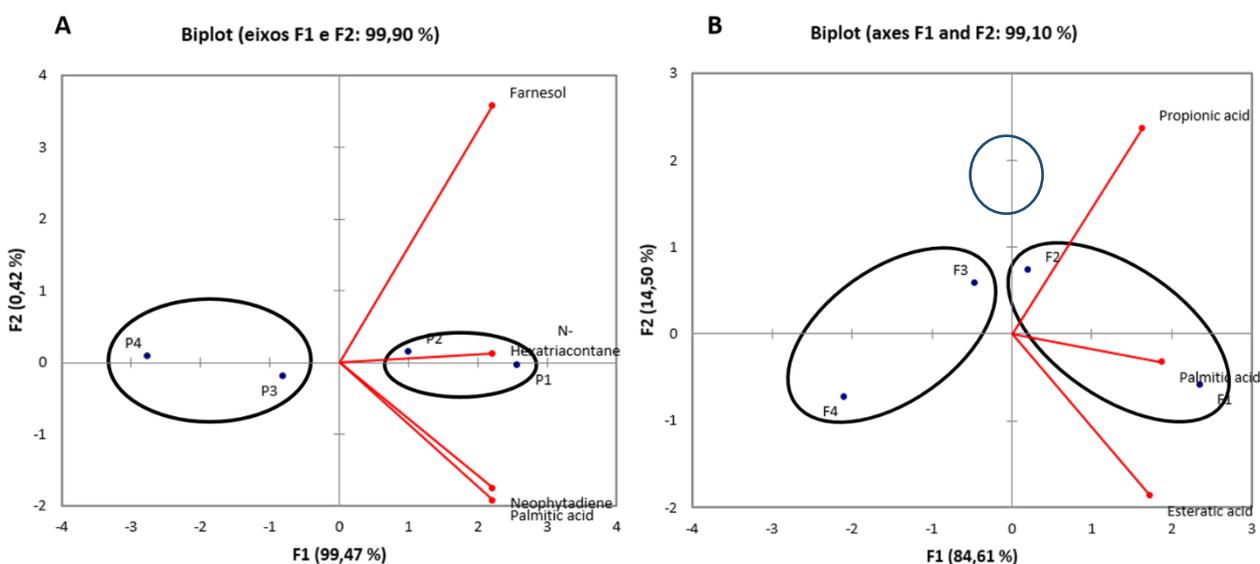


Devido a complexidade dos dados gerados durante a pirólise, a aplicação de análises multivariadas como PCA e HCA se tornam úteis por permitirem, através de gráficos, estabelecer, por exemplo, quais as variáveis analisadas são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras, podendo assim ser estabelecida uma assinatura química particular para cada grupo estudado (SANTOS, 2014).

Os dados referentes à área de pico média ( $n=2$ ) dos compostos identificados nas diferentes faixas granulométricas e temperaturas foram estudados aplicando-se PCA e HCA.

A Figura 12 apresenta a biplotagem das amostras (drogas vegetais) e de todas as variáveis (compostos) nos dois primeiros eixos de componentes principais na temperatura de 250°C, obtida através da PCA.

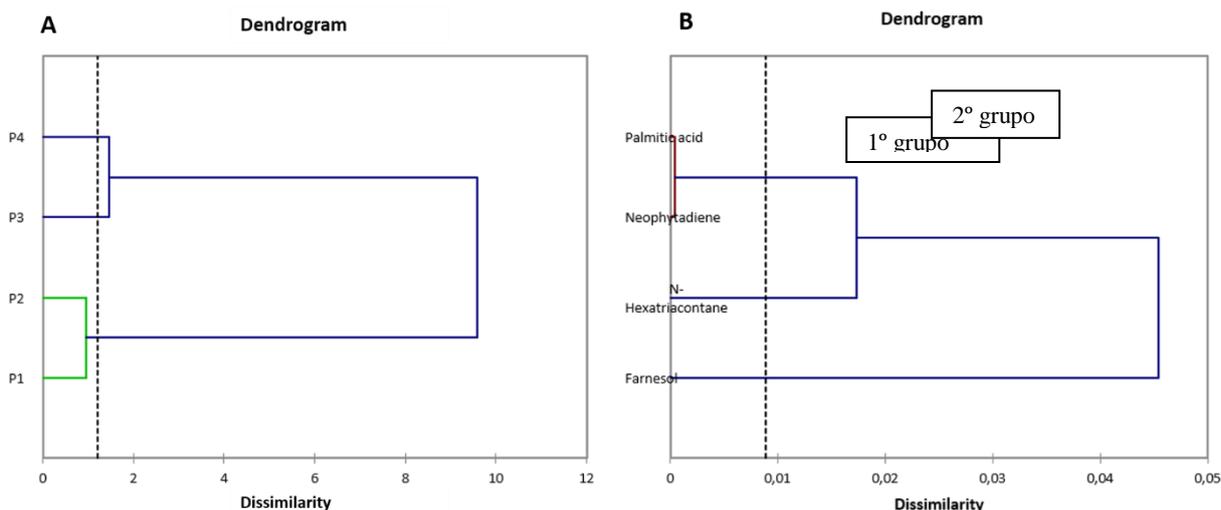
Figura 12 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 250°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.



Os dois componentes principais analisados (F1 e F2) responderam por 99,9% (folhas) e 99,10 (frutos) da variância entre as amostras, sendo considerados adequados para descrevê-las. A proximidade entre os compostos e as amostras indica que, para determinada droga vegetal, as substâncias mais próximas encontraram-se em maior concentração, sendo as mais representativas das respectivas amostras. Deste modo, para as drogas vegetais obtidas das folhas percebe-se claramente que a presença dos compostos identificados, separam as amostras P1 e P2 das amostras P3 e P4. Além disso, percebe-se também uma similaridade entre as amostras P1 e P2, assim como entre P3 e P4. Quanto as amostras obtidas dos frutos observa-se o mesmo perfil de separação, ou seja, similaridade entre as amostras F1-F2 e F3-F4 e dissimilaridade entre esses dois grupos, porém com uma certa proximidade entre as amostras F2 e F3.. Para

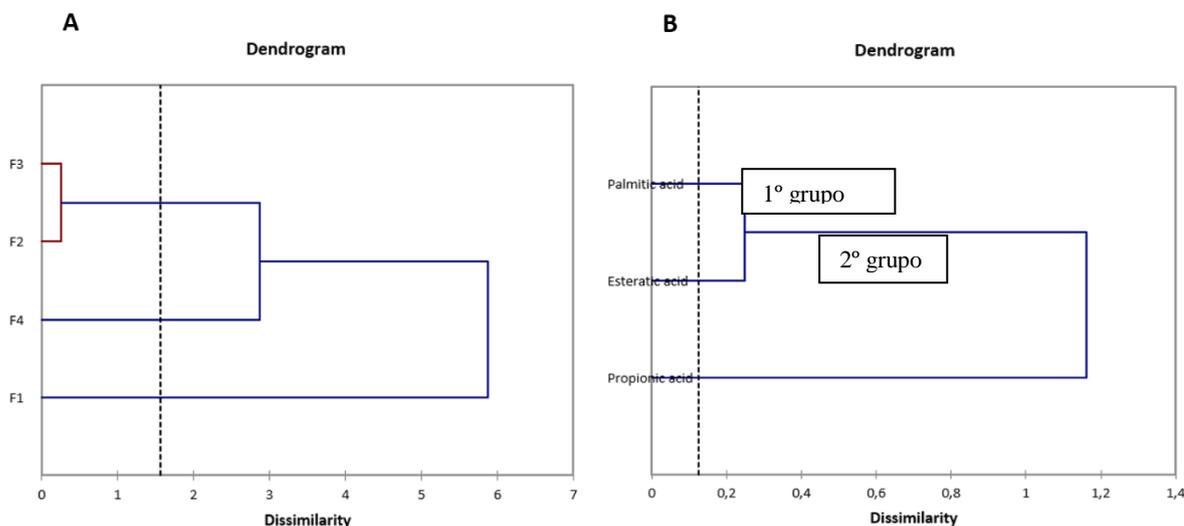
comprovar tais afirmações as drogas vegetais e os compostos foram então agrupados quanto à sua similaridade utilizando a HCA, cujos gráficos (dendrogramas) encontram-se representados nas Figura 13 e 14.

Figura 13 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C.



Na Figura 13A foi possível confirmar o agrupamento das drogas vegetais P1-P2 e P3-P4, apresentaram similaridade entre si. Na Figura 13B, percebe-se quais compostos foram mais similares em termos de concentração. Percebeu-se que no primeiro grupamento os compostos corresponderam aos componentes mais representativos das drogas vegetais. Observou-se que, dentro deste grupo, houveram compostos bastante similares entre si (neofitadieno e ácido palmítico) mas que apresentaram pouca similaridade ao hexatriacontano. Porém esse composto se apresenta como principal para diferenciação das amostras, pois quando existe proximidade entre um ponto-variável e um ponto-amostra significa que em média, essa variável tem um alto valor na diferenciação dessas amostras e isso foi visto no PCA. O segundo grupamento constituiu-se dos compostos também representativos da droga vegetal apresentando grande dissimilaridade com o primeiro grupo, salientando o que ocorreu no PCA onde esses compostos apresentaram-se distantes dos demais compostos. Assim, o composto hexatriacontano está ligado a diferenciação dos tamanhos de partículas, enquanto que os compostos neofitadieno e ácido palmítico atribui-se a separação entre dois grupamentos (P1-P2 e P3-P4), e a semelhança entre os componentes de cada grupo.

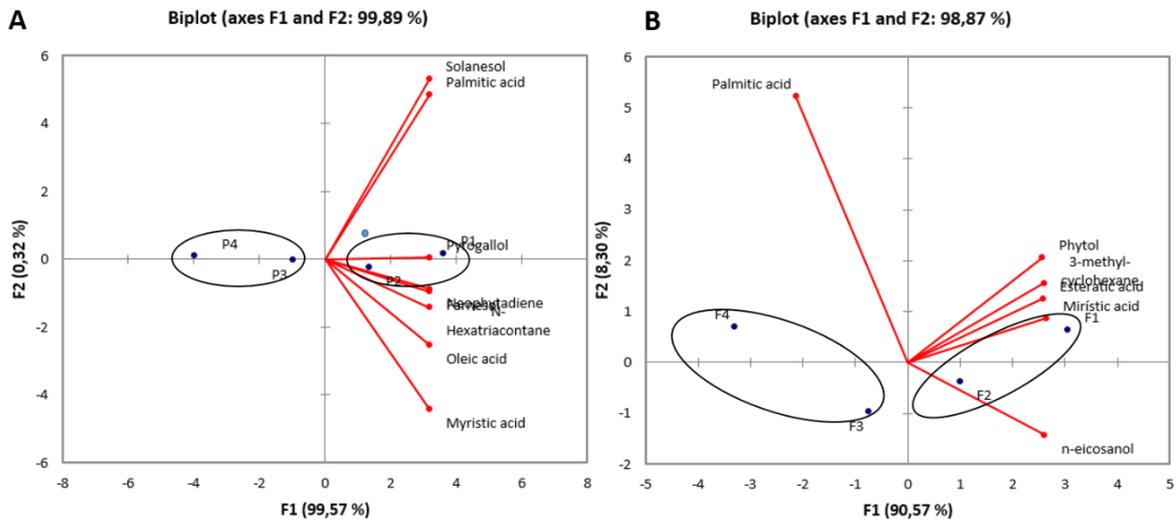
Figura 14 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos futos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 250°C.



Com os dados da figura 14A percebe-se que a similaridade entre F2 e F3 foi comprovada por HCA, assim como uma grande diferenciação entre as amostras F1 e F4. Percebeu-se na figura 14B que no primeiro grupamento os compostos corresponderam aos componentes mais representativos das drogas vegetais. Observou-se que, dentro deste grupo, houveram compostos bastante similares entre si (ácido palmítico e ácido esterático) mas que apresentaram pouca similaridade ao ácido propianóico. Observa-se ainda que ácido palmítico e ácido esterático são os compostos indicados pela diferenciação entre as amostras F1, F2 e F3.. Percebe-se ainda que o composto ácido propianóico é o composto que tem um alto valor na diferenciação das amostras F2 de F3 pela proximidade do composto com as amostras visto no PCA. Além deles, observa-se o isolamento da droga vegetal F4, fato que pode ser explicado pela presença dos compostos em percentagens que não permitam classificá-la em algum dos grupos anteriores.

Para a temperatura de 350°C (Figura 15), a análise dos dois primeiros componentes ortogonais, corresponderam a 99,89% da variância, para as amostras obtidas das folhas, e de 98,87% de variância para as amostras obtidas dos frutos. Assim como na temperatura de 250 °C, observa-se claramente que a presença dos compostos identificados nessa temperatura, separam as amostras P1 e P2 das amostras P3 e P4. Além disso, percebe-se também uma proximidade entre as amostras P1 e P2, assim como entre P3 e P4. Quanto as amostras obtidas dos frutos observa-se o mesmo perfil de separação, ou seja, similaridade entre as amostras F1-F2 e F3-F4 porém com uma certa proximidade entre as amostras F2 e F3 e uma dissimilaridade clara entre os amostras F1 e F4

Figura 15 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 350°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.



Os Dendrogramas obtidos para esta temperatura com as amostras obtidas das folhas (Figura 16) permitiram confirmar o agrupamento das drogas vegetais P1-P2 e P3-P4. Evidenciou-se também a grande dissimilaridade entre os grupos de compostos, confirmando o distanciamento dos mesmos mostrados durante a PCA. Vale salientar que, dentro do grupo representativo das drogas vegetais, P1 e P2 o n-hexatriacontano, que durante a PCA apareceu próximo dos demais compostos da classe, mostrou também alta similaridade com os mesmos. Nesse caso pode-se afirmar que a dissimilaridade dos tamanhos de partículas pode ser atribuído principalmente a esse composto e as similaridades entre as amostras P1 e P2, assim como a similaridade entre P3 e P4 deve ser atribuída principalmente ao Pirrogalol.

Figura 16 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 350°C.

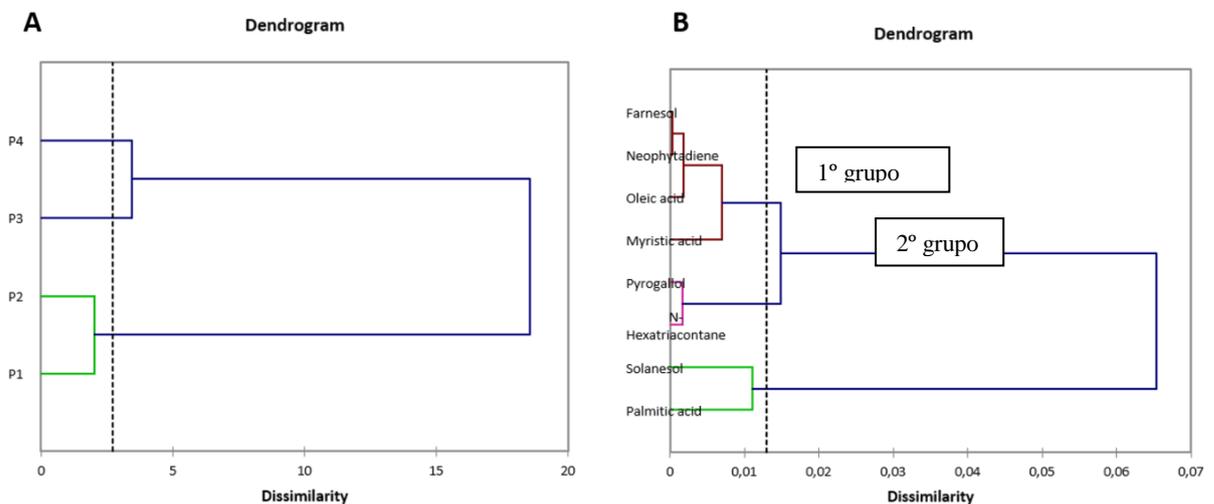
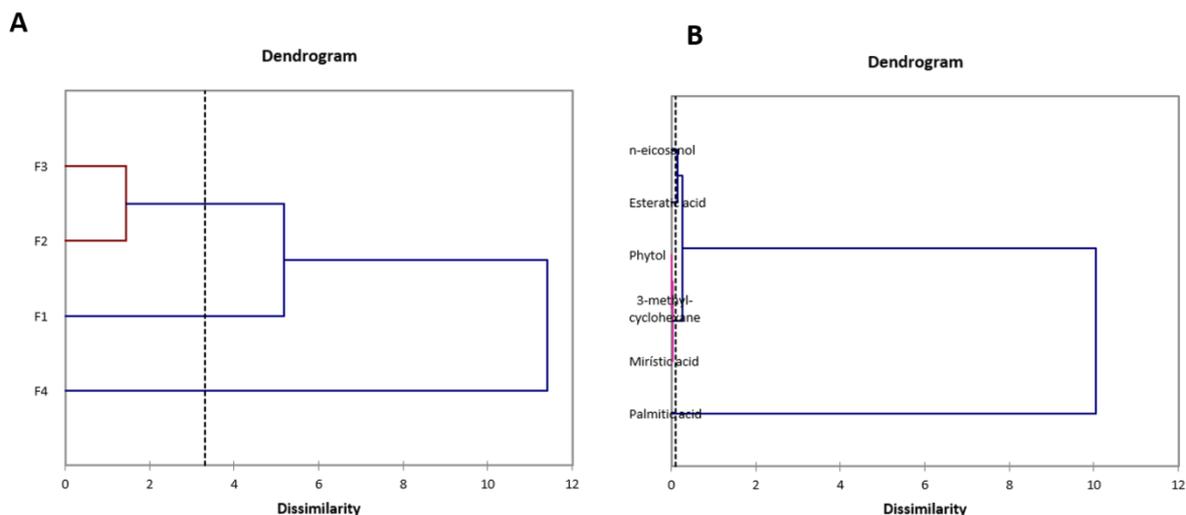


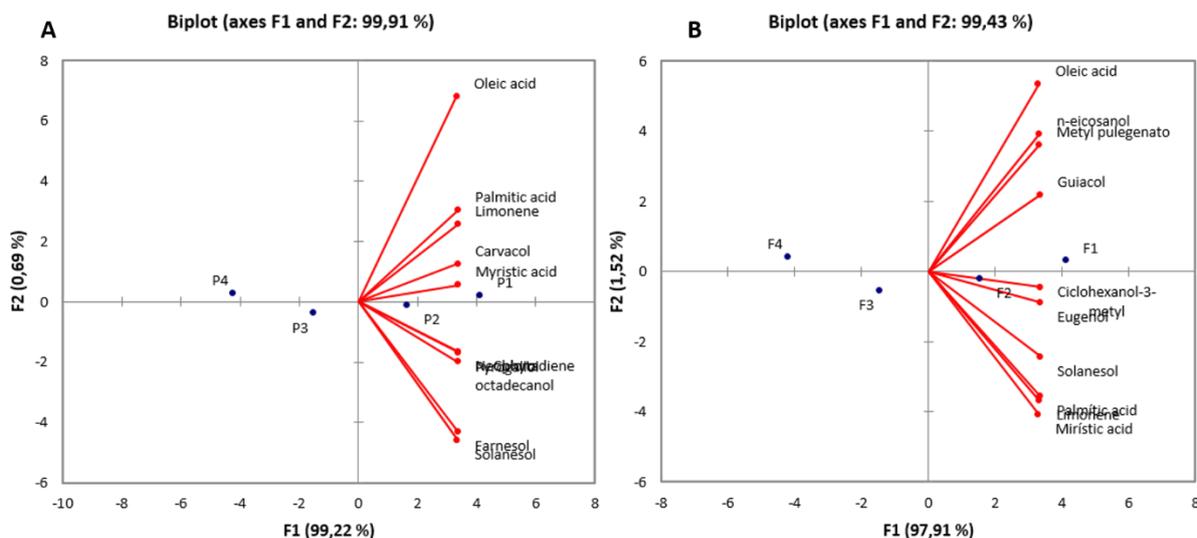
Figura 17 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos frutos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 350°C.



Com os dados da figura 17A percebe-se que a similaridade entre F2 e F3 foi comprovada por HCA, assim como uma grande diferenciação entre as amostras F1 e F4. Percebeu-se na figura 17B que, houveram compostos bastante similares entre si (n-eicosanol e ácido esterático). Observa-se ainda uma baixa dissimilaridade entre os compostos fitol, 3-metil ciclohexano, ácido mirístico e ácido esterático evidenciado pela proximidade desses compostos no PCA. Esses compostos podem estar associados a aproximação das amostras F1 e F2. Já a diferenciação das amostras F1 e F4 pode ser atribuída ao ácido palmítico, visto que esse composto apresentou uma maior diferenciação dos demais compostos identificados. Quanto a similaridade das amostras F2 e F3, essa pode ter ocorrido devido a presença do composto n-eicosanol, pois esse no PCA estava próximo dessas duas amostras e tem um certo grau de diferenciação dos demais compostos.

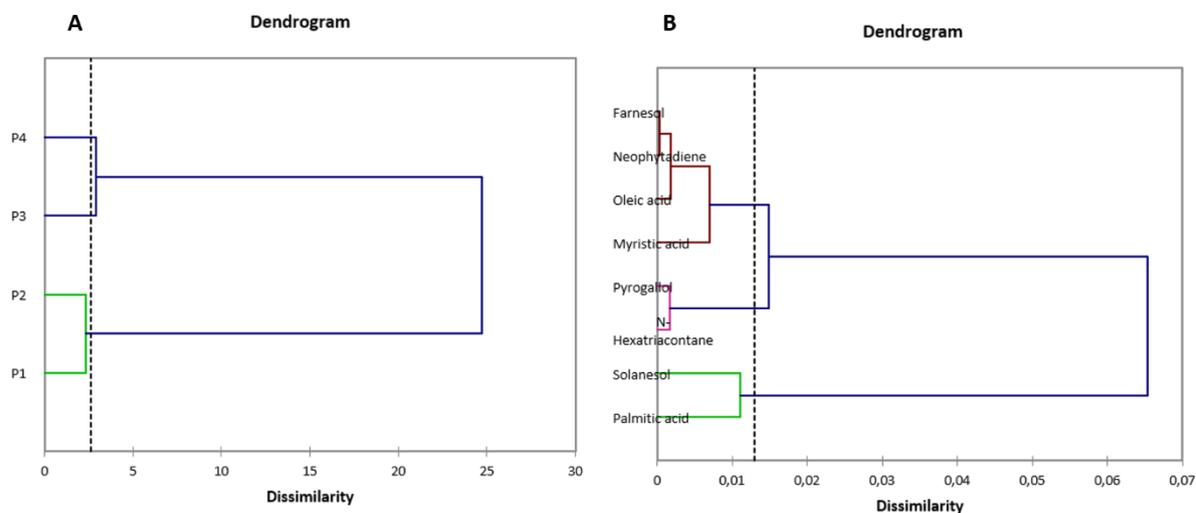
Na Figura 18 encontra-se representada a biplotagem obtida através da PCA para a temperatura de 450°C para as amostras obtidas das folhas e dos frutos. Percebe-se que para as as drogas vegetais otidas das folhas foi alcançado o mesmo perfil das temperarutas de 250°C E 350°C. Ou seja, a presença dos compostos identificados nessa temperatura, separam as amostras P1 e P2 das amostras P3 e P4. Assim como com as amostras obtidas dos frutos onde observa-se o mesmo perfil de separação, ou seja, similaridade entre as amostras F1-F2 e F3-F4 e dissimilaridade entre esses dois grupos.

Figura 18 - Biplotagem de todas as variáveis (compostos) e amostras na temperatura de 450°C. (A)- Folhas; (B)- Frutos.



Com os dados dos dendogramas na temperatura de 450°C (Figura 19) das amostras obtidas das folhas é possível confirmar o agrupamento das drogas vegetais P1-P2 e P3-P4 (Figura 19 A). Observa-se na figura 19 B que os compostos solanesol e ácido palmítico podem ser os compostos responsáveis pela diferença entre os grupos P1-P2 e P3-P4. Enquanto que mais uma vez, assim como na temperatura de 250°C o neofitadieno, assim como o farnesol e o ácido oleico pode ser os compostos que provocam a similaridade entre as amostras nos respectivos grupos.

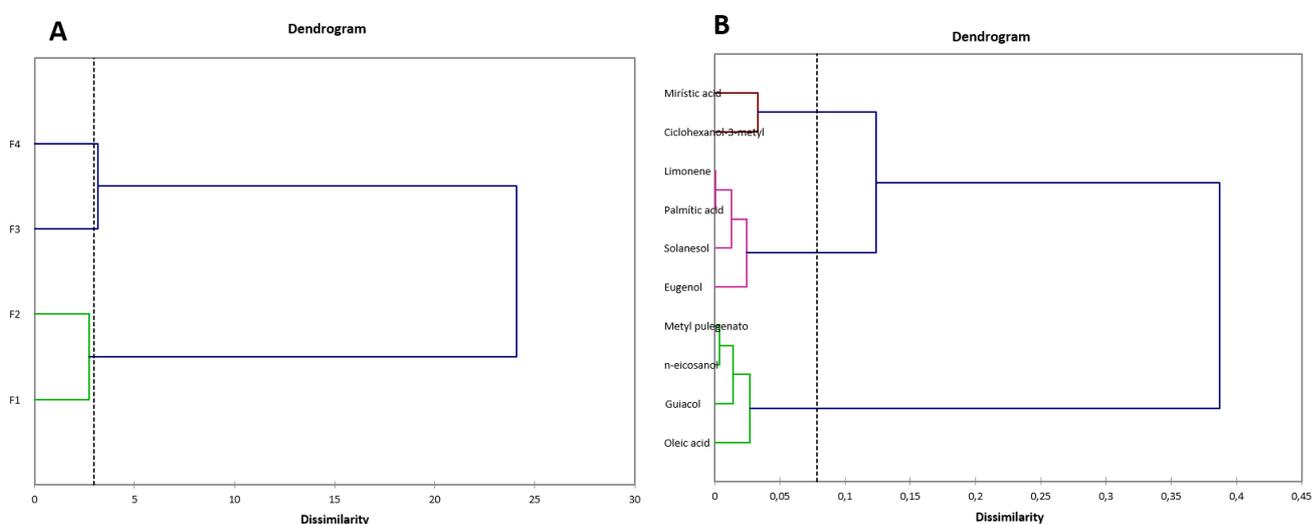
Figura 19 - Dendogramas da HCA das amostras obtidas das folhas (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C.



Quanto a HCA obtida dos frutos percebe-se com clareza (Figura 20) a separação entre dois grupos F1-F2 e F3-F4. O 3- metil ciclohexanol e o eugenol pode ser as substâncias responsáveis pela similaridade entre as amostras F1 e F2, assim como os compostos guaiacol e ácido oleico são os responsáveis pela similaridade das amostras F3 e F4.

Portanto, os resultados mostraram que as amostras de *M. charantia* em diferentes tamanhos de partículas podem ser diferenciados por pirogramas de degradação obtidos nas temperaturas de 250, 350 e 450°C com o auxílio de análises multivariadas de dados.

Figura 20 - Dendrogramas da HCA das amostras obtidas dos frutos (A) e dos compostos (B) na temperatura de 450°C.



### 5.1.8 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H)

A caracterização e elucidação estrutural, modificação química, atividade biológica e o estudo de metabolitos bioativos de mecanismo de ação foram sempre realizados após a purificação e separação de metabolitos. No entanto, os processos para a obtenção destes compostos na forma pura são muito longos e tediosos. Assim, é de grande valor o desenvolvimento de metodologias que são capazes de relacionar a informação sobre a composição química de um extrato bruto (MACHADO et al., 2014; ALI et al., 2013)

Assim, as análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) foram utilizadas na tentativa de elucidar um perfil característico das drogas vegetais obtidas de *M. charantia*, evidenciando possíveis semelhanças ou diferenças entre as amostras com relação aos tamanhos de partícula. A tabela 19 apresenta a quantidade de picos por regiões de deslocamento químico dos espectros obtidos de cada amostra.

Tabela 19 - Quantidade de picos por região dos espectros de RMN 1H das drogas vegetais em diferentes tamanhos de partículas.

Amostra	Quantidade de picos por região				Total
	0,0 – 3,0 (ppm)	3,0 – 6,0 (ppm)	6,0 – 9,0 (ppm)	9,0 – 14,0 (ppm)	
<b>F1</b>	46	69	35	15	165
<b>F2</b>	47	71	41	18	177
<b>F3</b>	51	73	52	21	197
<b>F4</b>	58	78	55	22	213
<b>P1</b>	51	57	40	19	167
<b>P2</b>	59	64	49	21	193
<b>P3</b>	62	67	42	24	195
<b>P5</b>	66	71	41	25	203

As quantidades de picos variaram de acordo com a amostra vegetal, mostrando que amostras com menores tamanhos de partículas apresentam mais picos. A variação da quantidade de pico pode ser justificada com a presença e a quantidade de compostos químicos que podem variar nas amostras, visto que amostras de menores tamanhos de partículas podem favorecer o aparecimento de uma maior quantidade de substância mais solúveis nos solventes utilizados (ETOH e DMSO deuterado) (FRANCIOSO et al , 2007).

Os picos evidenciados na área de 0,0 – 3,0 podem ser atribuídos a presença de compostos alifáticos, grupos metil e metileno, grupos carboxílicos e grupos aminicos e amidicos, os da região de 3,0 – 6,0 poder ser de aminoácidos e compostos glicosilados região 6,0 – 9,0 compostos aromáticos e fenólicos (FRANCIOSO, et al 2007).

Também foi observado que a região onde houve um maior número de picos foi a região de 3,0 – 6,0 ppm, (Figuras 21 e 22) alguns estudos realizados afirmam que nessa região podem ser identificados vários compostos químicos como triterpenos e esteroides glicosilados (CAO et al, 2011; ALVES et al, 2011; FRANCIOSO, et al 2007). Estudos relatados na literatura utilizando a mesma técnica e outras mais sensíveis e exatas identificam tais estruturas no vegetal *Momordica charantia* tanto em folhas como em frutos (ALAMA et al, 2009; BELOIN et al, 2005; CHEN et al, 2009; CAO et al, 2011; CAO et al, 2013; JABEEN e KHANUM, 2014; KAVITA et al, 2014, ZHAO,2014 ). Observou-se também uma maior quantidade de picos nessa região nas drogas obtidas dos frutos do que nas drogas obtidas das folhas, podendo ter uma maior quantidade dessas estruturas nos frutos da *Momordica charantia*.

Observa-se a importância da utilização dessa técnica na diferenciação das drogas vegetais com diferentes tamanhos de partículas, mostrando que o sinal analítico (número de picos) varia de acordo com o tamanho de partícula, indicando assim, que essa técnica pode ser utilizada no controle de qualidade dessas drogas vegetais.

A RMN  $^1\text{H}$  é de grande importância para caracterização e padronização de drogas vegetais, e tem sido aplicada com sucesso em vários trabalhos de *fingerprinting*, nos quais as impressões digitais dos espectros de misturas complexas em condições padronizadas são avaliadas, uma vez que a maior parte dos metabólitos orgânicos contém o isótopo  $^1\text{H}$  e esse apresenta uma alta abundância natural. Podendo assim, essa técnica ter novas aplicações e sendo um instrumento para caracterização de amostras brutas. (FRANCIOSO et al., 2007; ALI et al., 2013; MACHADO et al., 2014).

Figura 21 - Espectros RNMH1 *M. charantia* (folhas). (A) - Deslocamento 0-14ppm. (B) - Deslocamento 0-3 ppm. (C) - Deslocamento 3-6 ppm. (D) - Deslocamento 6-9ppm. (E) - Deslocamento 9-14ppm.

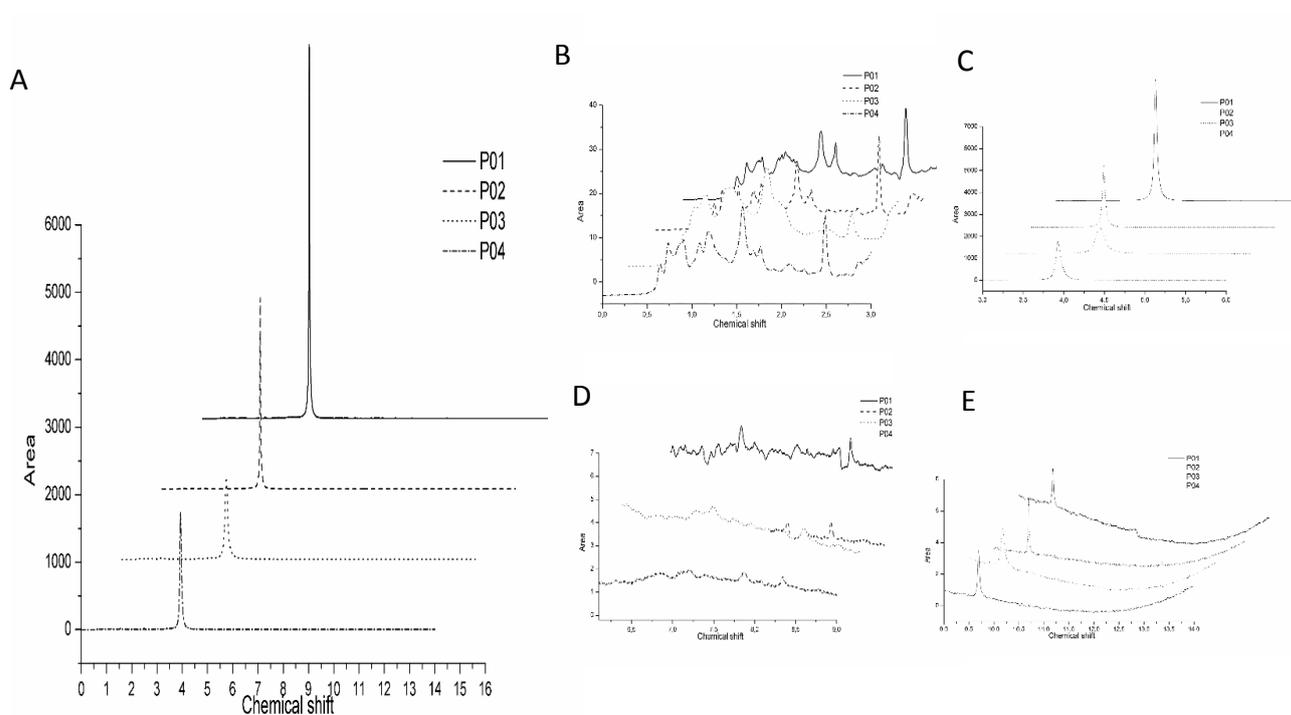
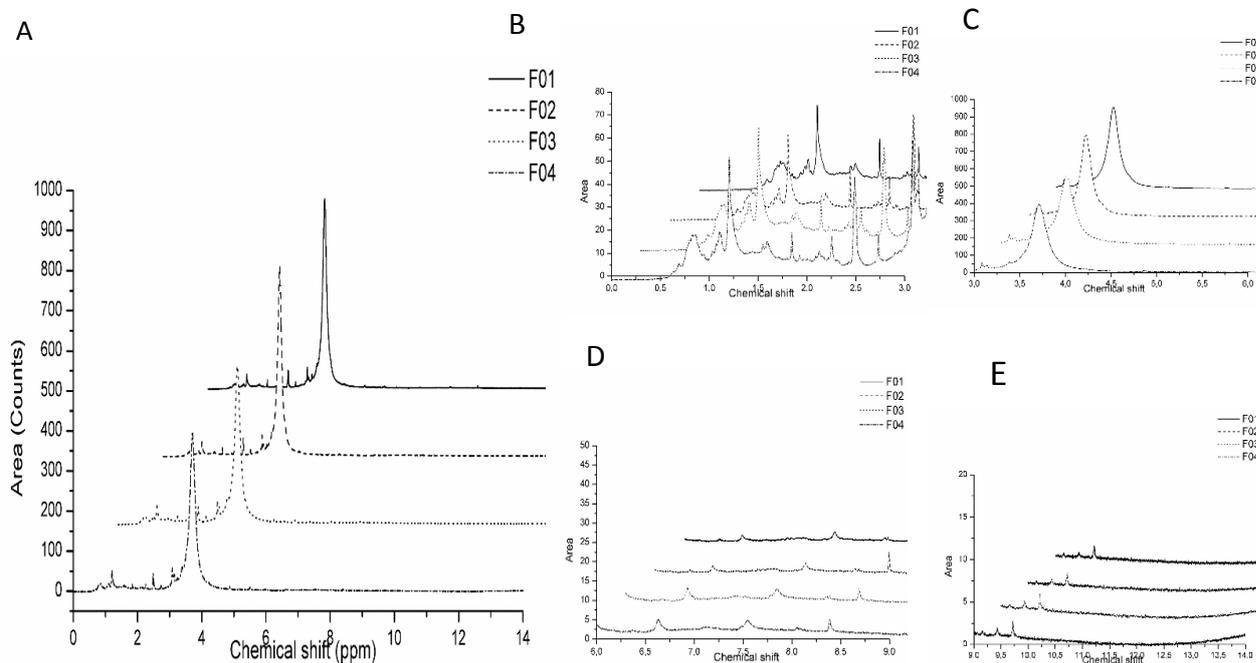


Figura 22 - Espectros RNMH1 *M. charantia* (frutos). (A) - Deslocamento 0-14ppm. (B) - Deslocamento 0-3 ppm. (C) - Deslocamento 3-6 ppm. (D) - Deslocamento 6-9ppm. (E) - Deslocamento 9-14ppm.

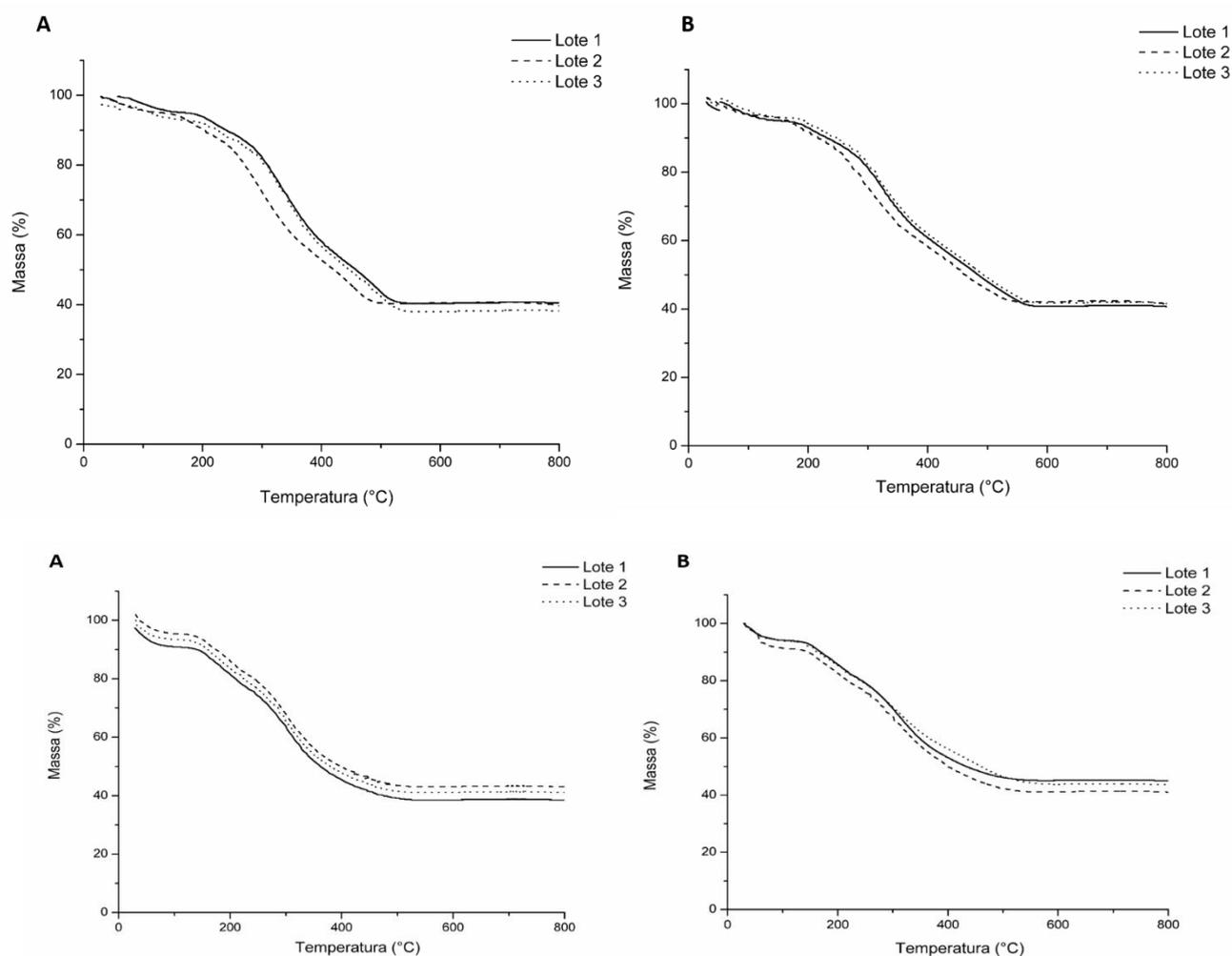


## 5.2 Caracterização dos Extratos vegetais

### 5.2.1 Análise termogravimétrica (TG)

A decomposição térmica dos extratos das folhas e do fruto ocorreu em cinco etapas quando submetidas as atmosfera de ar sintético e atmosfera inerte na razão de aquecimento de 10°C/min. Portanto, não foi observado diferença entre os lotes no número de etapas dos extratos quando submetido nas duas atmosferas (Figuras 23 e 24).

Figura 23 - Curvas TG dos extratos *M. charantia* (Folhas) em diferentes lotes na razão de 10°C/min em ar sintético (A) e Nitrogênio (B).



Percebe-se ainda que não houve variação considerável no perfil de degradação térmica entre os diferentes lotes dos extratos obtidos a partir das folhas e dos frutos de *M. charantia*. Assim, os diversos lotes obtiveram nas mesmas faixas de temperaturas perdas de massas semelhantes.

Observando a tabela 20 é possível entender que no primeiro evento de degradação não houve variação considerável em relação as temperaturas iniciais ( $T_i$ ) e finais ( $T_f$ ), assim como à perda de massa, indicando que a ocorrência dessa etapa resultou em parâmetros de temperatura e perda de massa equivalentes para todos os lotes de produção dos extratos nas duas atmosferas estudadas.

A primeira etapa de decomposição térmica tem como característica marcante a perda de produtos voláteis principalmente a água livre, já que tal evento ocorre nas faixas de fusão e

vaporização dessa substância. Estes valores de perda de massa referente a água estão de acordo com o nível recomendado de água na amostra que é inferior a 14% (BRANDÃO et al, 2016).

A segunda etapa de degradação térmica está relacionada com a perda de água ligada em amostras de origem vegetal (GUIMARÃES et al, 2016). Assim como ocorreu no primeiro evento, também não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de ocorrência desse evento nos diferentes lotes produzidos, assim como entre as duas atmosferas, como demonstram os dados da tabela 21.

Tabela 20 - Parâmetros obtidos durante a primeira etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.

Extrato	Lote	Atmosfera oxidativa			Atmosfera inerte		
		Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
Folha	1	35	104	3.2	35	101	3.3
	2	35	102	3.4	35	106	2.9
	3	35	108	3.3	35	103	3.4
Fruto	1	35	102	4.1	35	104	3.9
	2	35	106	4.3	35	108	4.3
	3	35	109	4.6	35	105	4.3

Tabela 21 - Parâmetros obtidos durante a segunda etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.

Extrato	Lote	Atmosfera oxidativa			Atmosfera inerte		
		Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
Folha	1	104	150	2.6	101	156	2.3
	2	102	147	2.5	106	152	2.1
	3	108	151	2.2	103	158	2.2
Fruto	1	102	153	3.5	104	149	2.9
	2	106	151	3.7	108	154	3.3
	3	109	150	3.6	105	155	3.2

De acordo com os parâmetros obtidos durante a terceira etapa de degradação (tabela 22) possivelmente não deve ter ocorrido decomposição pela degradação dos componentes da matriz do vegetal, mas apenas saída de constituintes das amostras, podendo ter ocorrido uma transição de fase, como uma volatilização (BRANDÃO et al., 2016). Durante esse evento foram obtidos perfis de temperatura e perda de massa semelhantes entre os lotes obtidos das duas partes de *M. charantia*, assim como nas duas atmosferas utilizadas. Observa-se que os extratos obtidos do fruto obtiveram uma maior perda de massa durante esse evento, essa pequena diferença pode estar relacionada com a variação de compostos químicos presentes nesses extratos quando relacionados com os extratos obtidos das folhas.

Tabela 22 - Parâmetros obtidos durante a terceira etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.

Extrato	Lote	Atmosfera oxidativa			Atmosfera inerte		
		Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
Folha	1	150	249	15.3	156	250	16.0
	2	147	245	15.5	152	251	16.3
	3	151	248	15.2	158	254	16.3
Fruto	1	153	253	18.5	149	263	19.9
	2	151	252	18.7	154	265	19.6
	3	150	250	18.4	155	260	19.8

A quarta etapa foi onde obteve-se uma maior perda de massa, sugerindo assim que houve decomposição pela degradação dos componentes da matriz do vegetal, caracterizando a etapa mais importante durante o processo termogravimétrico (CORREIA et al, 2013). Como visto na tabela 23, durante esse evento foram obtidos perfis de temperatura e perda de massa semelhantes entre os lotes obtidos das duas partes de *M. charantia* assim como nas duas atmosferas utilizadas. Porém, assim como na terceira etapa os extratos produzidos com o fruto de *M. charantia* obteve uma maior perda de massa.

Tabela 23 - Parâmetros obtidos durante a quarta etapa termogravimétrica dos extratos produzido nas atmosferas oxidativa e inerte.

Extrato	Lote	Atmosfera oxidativa			Atmosfera inerte		
		Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)
<b>Folha</b>	1	249	368	25.6	250	362	26.0
	2	245	370	25.4	251	359	26.1
	3	248	372	25.5	254	365	26.3
<b>Fruto</b>	1	253	370	33.4	263	374	33.1
	2	252	369	33.3	265	377	33.1
	3	250	371	33.6	260	375	33.2

A etapa seguinte representou a continuidade do processo de degradação com formação de resíduo mineral no final. Entre os extratos produzidos nos diferentes lotes com a folha de *M. charantia* (tabela 24) percebe-se que não houve variação significativa em relação a quantidade de resíduo mineral, confirmando que os três lotes obtiveram os mesmos perfis de degradação. Essa mesma característica foi observada nos três lotes de produção dos extratos obtidos a partir do fruto (tabela 25).

Tabela 24 - Valores de resíduos mineral obtidos no perfil termogravimétrico dos extratos produzidos das folhas.

LOTE	RESÍDUO MINERAL (%)	
	Atmosfera oxidativa	Atmosfera inerte
<b>1</b>	43.94	44.39
<b>2</b>	44.23	43.98
<b>3</b>	44.34	44.56
<b>Desvio padrão</b>	0.20	0.29
<b>Coefficiente de variação</b>	0.46	0.67

Tabela 25 - Valores de resíduos mineral obtidos no perfil termogravimétrico dos extratos produzidos dos frutos.

LOTE	RESÍDUO MINERAL (%)	
	Atmosfera oxidativa	Atmosfera inerte
1	39.25	39.19
2	38.83	38.98
3	38.74	39.26
<b>Desvio padrão</b>	0.27	0.14
<b>Coefficiente de variação</b>	0.69	0.37

A análise termogravimétrica pode ser utilizada para observar a diferença de substâncias obtidas através de diversos processos metodológicos assim como pode avaliar a reprodutibilidade de um determinado processamento de obtenção de substâncias, avaliando a degradação térmica dos produtos em lotes diferenciados resultantes de um mesmo método de produção (OLIVEIRA e GOMES, 2011; ZHANG, ZHU, ZHANG, 2017).

Portanto, de acordo com os dados obtidos através dessa técnica termoanalítica é perceptível que não houve variação no perfil de degradação térmica dos componentes entre os diferentes lotes, sugerindo a presença dos mesmos componentes químicos nos lotes produzidos dos obtidos dos extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia* nas mesmas condições de processamento (SLAVOV et al., 2016). Desta forma, sugere-se que os intermediários de cada etapa do processo de decomposição térmica, assim como os resíduos finais de degradação foram os mesmos nos três lotes, apontando uma boa utilização da termogravimetria para avaliar a reprodutibilidade lote a lote de extratos vegetais.

### 5.2.2 Determinação da Cinética de degradação

Foram obtidas curvas termogravimétricas de todas as amostras nas seguintes razões de aquecimento 40, 20, 10 e 5°C/min. Todas as curvas foram obtidas utilizando atmosfera oxidativa (Figuras 24 e 25 ).

Todas as amostras apresentaram cinco eventos de decomposição térmica. Foi observado um aumento da temperatura inicial de cada evento em função da razão de aquecimento.

Observa-se que em todas as razões de aquecimento estudada houve uma reprodutibilidade das curvas dos diferentes lotes, esse fato pode ser demonstrado nos extratos

produzidos a partir das folhas e dos frutos. Portanto, sugere-se que houve o mesmo deslocamento térmico entre as curvas, existindo semelhantes taxas de transferência de calor e de energia de ativação para degradação termogravimétrica em cada lote de produção, indicando assim, que os mesmos componentes químicos da matriz dos vegetais então presentes nas mesmas quantidades nos três lotes de produção (TITTA et al, 2011).

A degradação termogravimétrica que ocorreu na razão de 40°C/min obteve uma menor valor de resíduo mineral em todos os extratos produzidos. Isso pode ter ocorrido devido a uma degradação incompleta e abrupta do estabilizante farmacotécnico utilizado (Aerosil), considerando que a degradação foi mais rápida nessa razão de aquecimento. A sílica gel é um polímero inorgânico inerte, resistente, amorfo, com grande estabilidade térmica, mecânica e química, de extensa área específica e alta porosidade, de fácil moagem e altamente reativa, conferindo aos extratos vegetais uma maior estabilidade e conseqüentemente uma menor perda de massa em altas razões de aquecimento (REBELO, NASCIMENTO e CORRÊA, 2015).

Figura 24 - Curvas TG dos extratos obtidos da *M. charantia* (folha) em diferentes lotes de produção. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min.

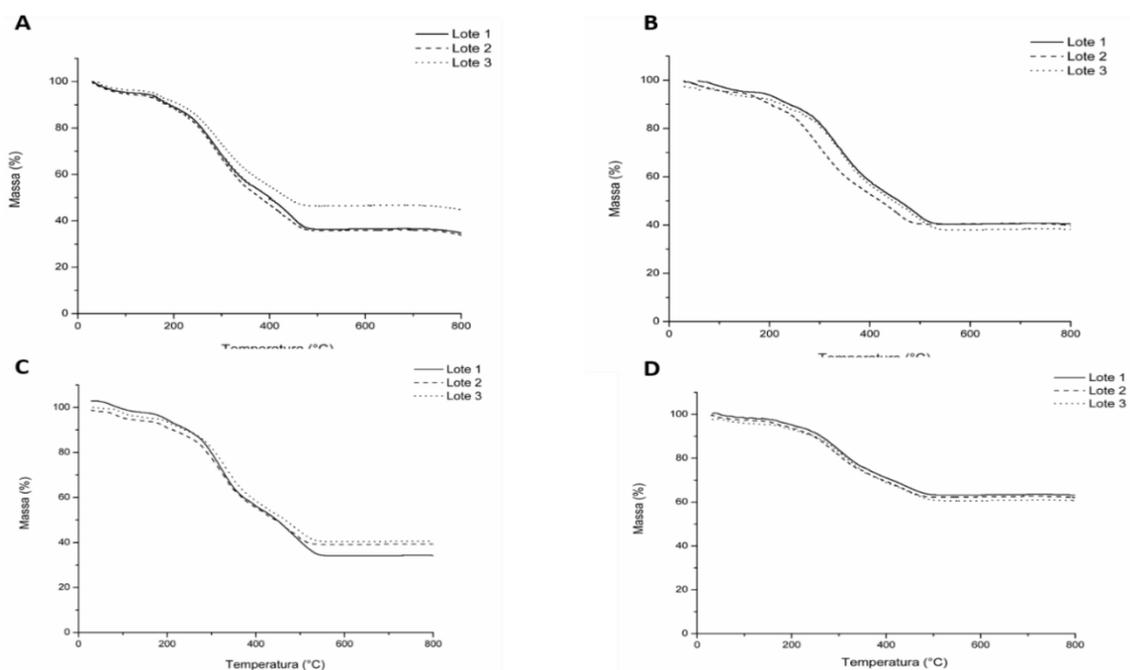
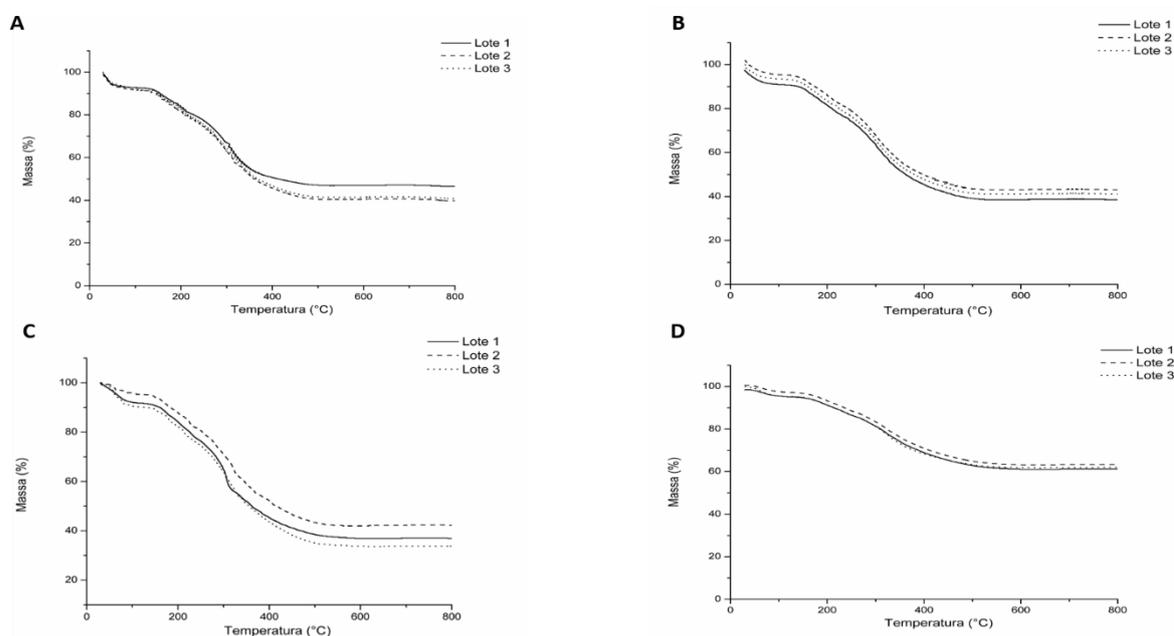


Figura 25 - Curvas TG dos extratos obtidos da *M. charantia* (fruto) em diferentes lotes de produção. (A) Razão de 5°C/min. (B) Razão de 10°C/min. (C) Razão de 20°C/min. (D) Razão de 40°C/min.



Foi escolhida a quarta etapa onde ocorreu a maior perda de massa no processo de reação de decomposição térmica em todas as amostras para calcular os parâmetros da cinética de degradação pelo método de Ozawa.

Com o cálculo obtidos pelo método cinético de Osawa, obteve-se a mesma ordem de reação para todas as amostras como visto nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos de degradação térmica dos extratos vegetais obtidos das folhas da *Momordica charantia*.

PARÂMETROS CINÉTICOS			
	Energia de ativação (Kj/mol)	Ordem de reação	Fator de frequência (min <sup>-1</sup> )
<b>LOTE 1</b>	115.980	0	3,012x10 <sup>7</sup>
<b>LOTE 2</b>	116.100	0	3,018x10 <sup>7</sup>
<b>LOTE 3</b>	115.870	0	3,020x10 <sup>7</sup>
<b>Desvio padrão</b>	0.119	----	----
<b>Coefficiente de variação</b>	0.091	----	----

Tabela 27- Paramêtros cinéticos de degradação térmica dos extratos vegetais obtidos dos frutos da *Momordica charantia*.

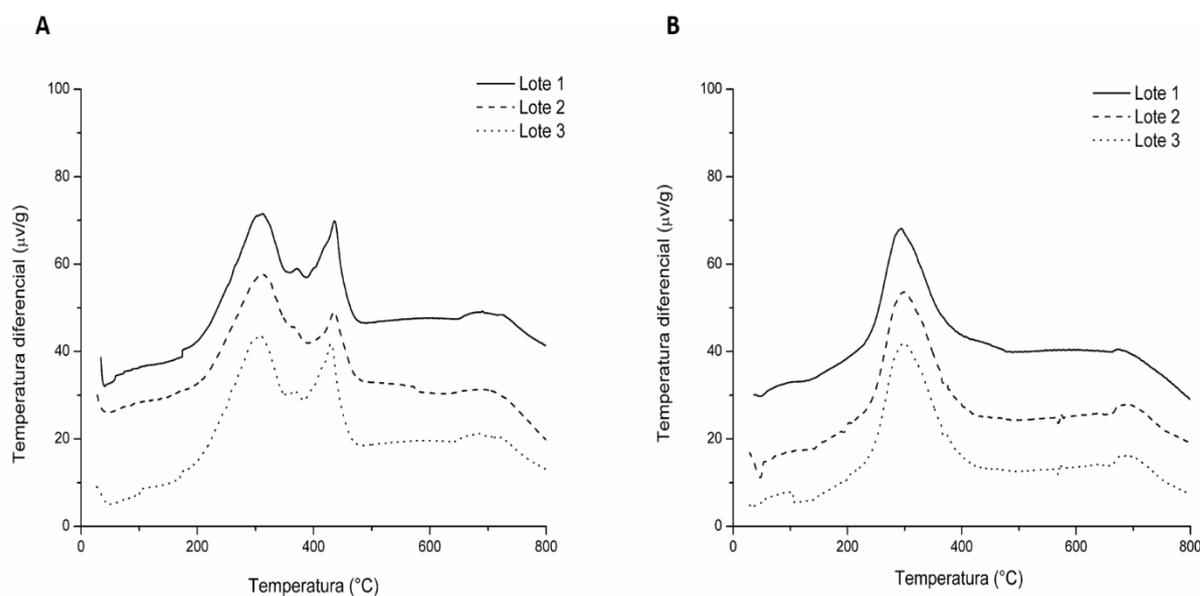
<b>PARÂMETROS CINÉTICOS</b>			
	<b>Energia de ativação (Kj/mol)</b>	<b>Ordem de reação</b>	<b>Fator de frequência (min<sup>-1</sup>)</b>
<b>LOTE 1</b>	112.150	0	2.661x10 <sup>7</sup>
<b>LOTE 2</b>	112.144	0	2.680x10 <sup>7</sup>
<b>LOTE 3</b>	112.138	0	2.731x10 <sup>7</sup>
<b>Desvio padrão</b>	0.006	----	----
<b>Coefficiente de variação</b>	0.005	----	----

Foi observado que o valor da energia de ativação não variou entre os lotes. Esse fato ocorreu tanto nos extratos produzidos a partir da folha e do fruto. A energia de ativação é definida como a energia mínima necessária para que ocorra reações químicas, inclusive reações de quebra de macromoléculas (PAN et al, 2015; PUGAZHENTHI e KATIVA et al, 2014). Portanto, percebe-se a presença dos mesmos componentes químicos nos lotes produzidos em cada linha de produção (folha e fruto), já que as quebras desses componentes da matriz dos vegetais resultaram em similares valores de energias de ativação e fator de frequência.

### 5.2.3 Análise Térmica diferencial (DTA)

Os extratos obtidos das folhas de *M. charantia* quando submetidas a análise térmica diferencial evidenciaram três eventos exotérmicos (figura 25 A). Enquanto que os extratos produzidos dos frutos a partir dos frutos de *M. charantia* apresentaram dois eventos exotérmicos (figura 25 B).

Figura 26 - Curvas DTA da *M. charantia* em diferentes lotes de produção na razão de aquecimento de 10°C/min. (A) Folhas; (B) Frutos.



Os valores de entalpia e as temperaturas iniciais e finais de cada evento estão apresentados nas tabelas 28 e 29.

Tabela 28 - Eventos exotérmicos dos extratos nebulizados obtidos das folhas de *M. charantia* em diferentes lotes.

Lote	1º Evento		2º Evento		3º Evento	
	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)
<b>L1</b>	312.55	1.28	435.96	0.742	700.25	0.136
<b>L2</b>	311.63	1.33	435.91	0.738	710.56	0.142
<b>L3</b>	312.29	1.26	435.99	0.752	690.54	0.131
<b>Desvio padrão</b>	0.47	0.015	0.04	0.08	0.02	0.05
<b>Coefficiente de variação</b>	0.15	0.18	0.09	0.16	0.14	0.3

Tabela 29 - Eventos exotérmicos dos extratos nebulizados obtidos dos frutos de *M. charantia* em diferentes lotes.

Lote	1º Evento		2º Evento	
	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)	Temperatura de pico (°C)	Entalpia (Kj/g)
<b>L1</b>	302.53	2.38	708.59	0.216
<b>L2</b>	305.71	2.35	709.23	0.221
<b>L3</b>	306.24	2.36	707.88	0.234
<b>Desvio padrão</b>	0.06	0.01	0.09	0.09
<b>Coefficiente de variação</b>	0.68	0.64	0.67	0.14

Em relação aos extratos obtidos das folhas e dos frutos observou-se que o primeiro evento apresentou uma maior liberação de energia, sugerindo-se assim que esse evento esteja relacionado com uma maior perda de massa. Essa sugestão é confirmada correlacionando os dados das curvas DTA com os das curvas TG, observando que esse evento, com liberação de maior energia, ocorre entre as temperaturas da etapa de maior perda de massa na análise termogravimétrica. Nessa faixa de temperatura é onde ocorre degradação de estruturas aromáticas e ligações saturadas em carbonos, entre outras quebras de estruturas de hidrocarbonetos, presentes em grandes quantidades em drogas vegetais (COSTA et al, 2013). Portanto, como não houve variação significativa nas temperaturas de pico e nas entalpias, sugere-se a presença desses mesmos componentes em quantidades equivalentes nos lotes produzidos nos respectivos extratos.

O segundo pico exotérmico pode estar associado a presença de macrocomponentes como celulose e lignanas que podem estar em quantidades equivalentes em todos os lotes produzidos das folhas e dos frutos, exigindo assim, a mesma energia liberada para degradação desses componentes (MA e MU, 2016).

Com base no que foi demonstrado percebe-se que através dos parâmetros fornecidos pela Análise Térmica diferencial (temperatura de pico e entalpia) é possível demonstrar a reprodutibilidade na produção de lotes diferenciados de extratos vegetais.

#### 5.2.4 Pir-CG/MS

Os dados das curvas Tgs apresentaram perdas de massa significativa dos extratos nas faixas de temperatura de 250°C a 500°C. Com o objetivo de avaliar quais os produtos de degradação estavam sendo liberados, as amostras foram submetidas ao processo de pirólise nas temperaturas de 250°C, 350°C e 450°C, representando as temperaturas iniciais e intermediárias do processo de decomposição térmica.

Nas tabelas 30 e 31 estão descritos os principais compostos liberados durante as etapas de degradação térmica, analisados pela biblioteca Willey 6ª edição para o Class-500.

Em relação aos extratos obtidos das folhas, percebeu-se que os mesmos componentes, nas determinadas temperaturas, foram liberados de todos os lotes, não ocorrendo assim distinção entre os extratos obtidos de diferentes lotes em relação aos compostos analisados, além disso, não houve diferentes valores de intensidade e diferentes tempo de retenção nos picos cromatográficos, esses mesmo fenômeno foi observado nos extratos produzidos a partir dos frutos (Figuras 26 e 27).

Porém é visto também que nos extratos obtidos das folhas existe uma maior quantidade de compostos identificados por similaridade. Esse fato pode estar relacionado com a diferença na composição química dessas duas partes, visto que na triagem fitoquímica a folha apresentou uma maior concentração de metabólitos secundários.

É possível perceber que com o aumento da temperatura mais moléculas são degradadas nos extratos das folhas e dos frutos, confirmando o perfil da perda de massa observada na análise termogravimétrica. Estas moléculas permanecem intactas em temperaturas mais baixas (250 °C) e em temperaturas superiores (450°C) se degradam, o que pode estar relacionado com a perda por volatilização, estabelecida na etapa principal de decomposição térmica mostradas nas curvas termogravimétricas.

Relacionando esses dados com o estudo cinético relatado anteriormente, é possível observar que todas as reações de degradação e liberação de energia obtiveram ordem zero, confirmando a presença de moléculas que não se degradaram, mas passaram por uma transição de fase do sólido para o estado gasoso, ocorrendo uma vaporização (CUINICA e MACEDO, 2017).

Nos extratos provenientes das folhas a substância caracterizada por similaridade ao Farnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O) foi evidente nas três temperaturas em todos os lotes, porém com diferentes áreas e tempos de retenção quando submetidos a temperaturas distintas, apresentando uma maior área quando submetido a temperatura de 450°C.

Em relação aos extratos obtidos dos frutos observou-se o Farnesol também foi identificado por similaridade nas três temperaturas estudadas, porém foi observado que na temperatura de 350°C foi onde obteve uma maior área.

O farnesol é um álcool sesquiterpeno que consiste de três unidades de isopreno, está presente também em muitos óleos essenciais e foi amplamente estudada a sua interação com as células de mamíferos devido a sua propriedade de induzir preferencialmente apoptose ou a parada do ciclo celular em células cancerígenas. Foi demonstrado que esta molécula inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* (JABRA-RIZK, MEILLER et al., 2009), e *Saccharomyces cerevisiae* (MACHIDA et al., 2009), podendo esse composto está relacionado quando presente com as atividades biológica de muitos vegetais.

Para fins de análise quantitativa dos compostos liberados foi calculada a área relativa de cada substância em lotes diferentes em cada temperatura. Para calcular a área relativa dos picos similares para as três amostras foi considerada como 100% a soma das áreas de todas os compostos analisados.

Para as amostras obtidas a partir das folhas foi verificada através destas percentagens que todos os compostos identificados por similaridade apresentaram áreas relativas equivalentes. O mesmo fenômeno foi observado com extratos obtidos dos frutos. Assim, com a utilização dessa técnica foi possível observar a reprodutibilidade na produção de extratos vegetais lote a lote e na caracterização termiquímica desses compostos.

Figura 27 - Pirogramas obtidos os extratos das folhas de *M. charantia* nas temperaturas de 250 (A), 350 (B) e 450°C (C).

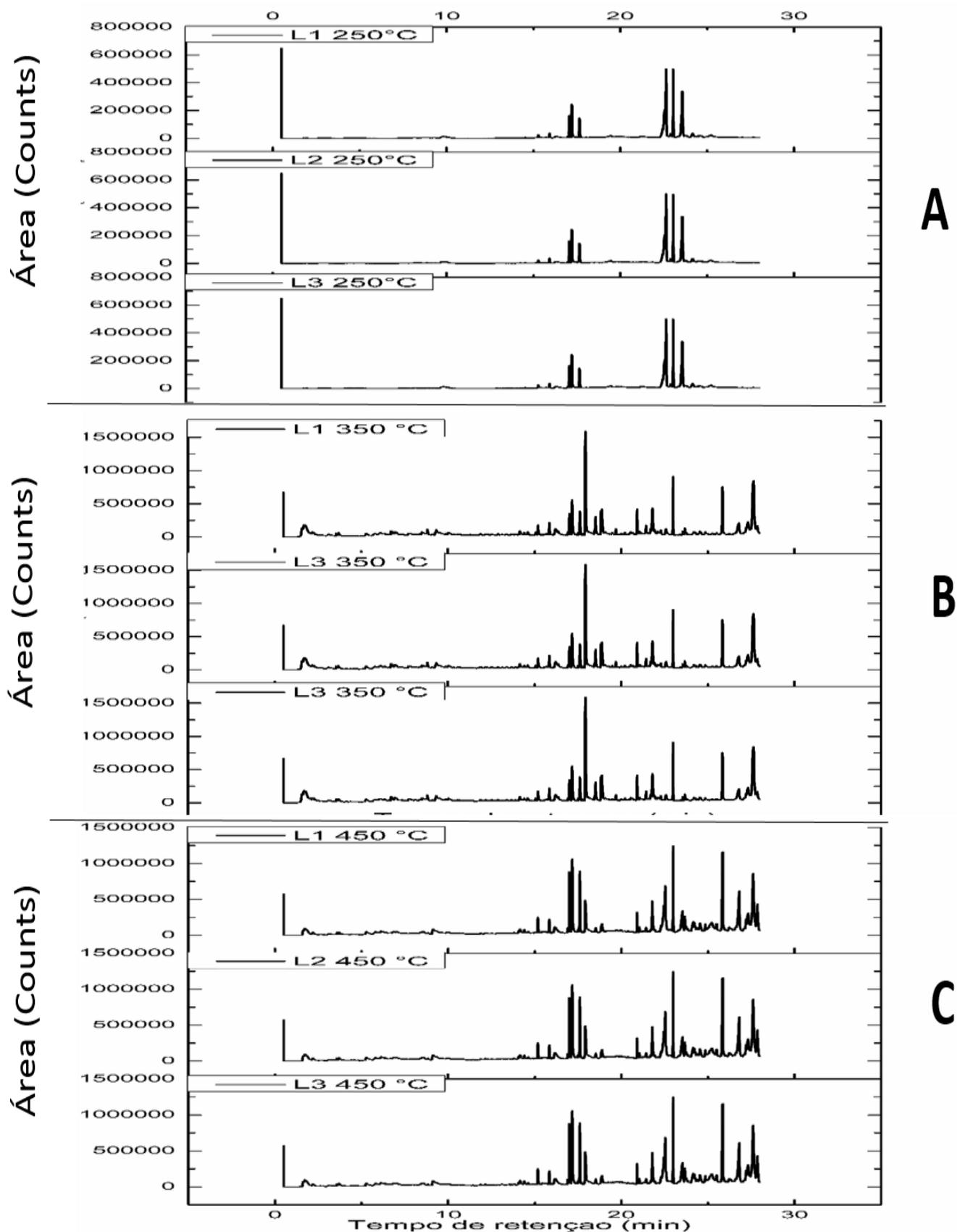


Figura 28 - Pirogramas obtidos os extratos dos frutos de *M. charantia* nas temperaturas de 250 (A), 350 (B) e 450°C (C).

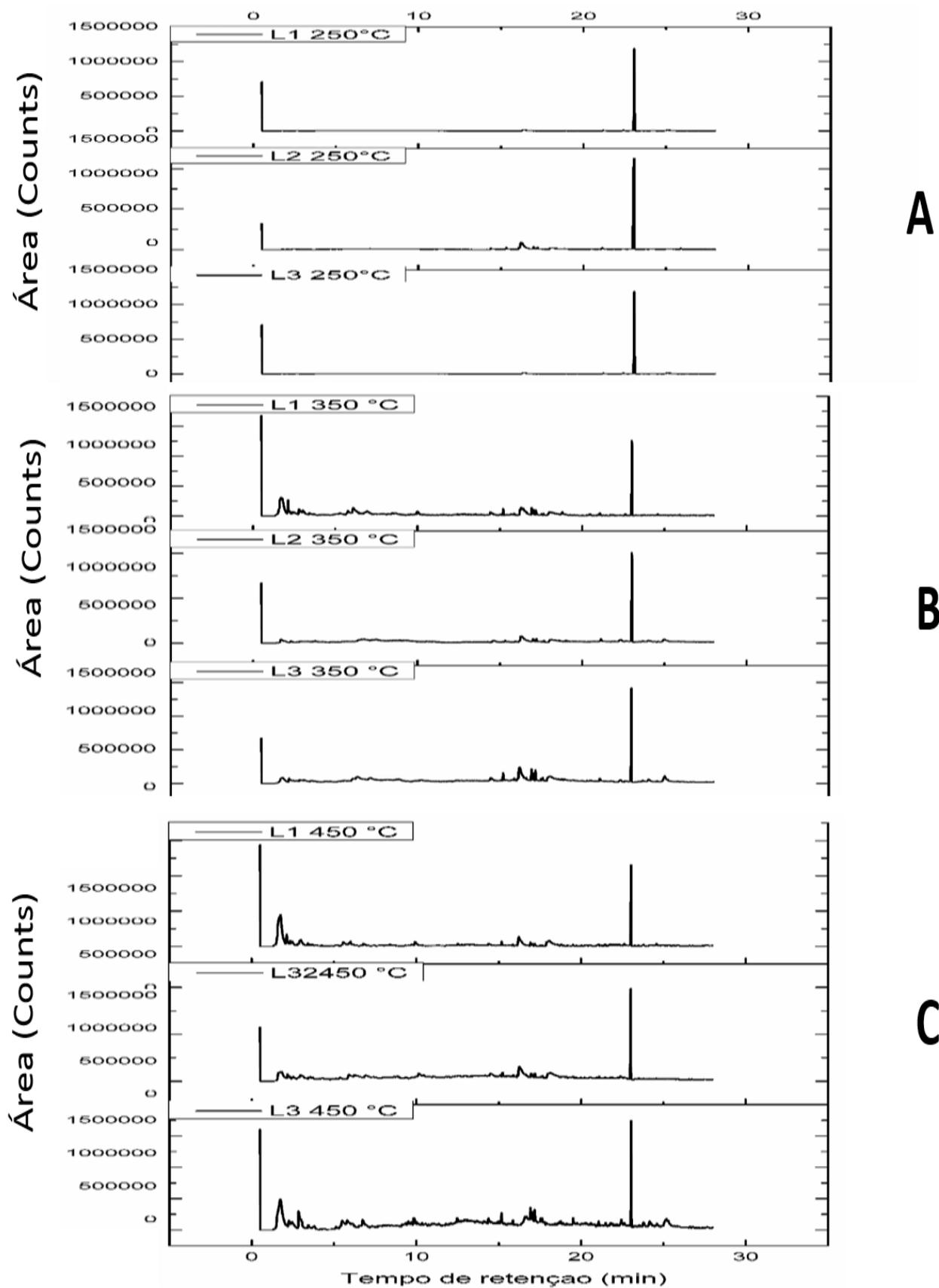


Tabela 30 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas dos extratos obtidos das folhas.

Temperatura	Substancia	L1			L2			L3		
		Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)
250°C	Ácido Cicloentanodecanóico (C10H20O2)	2222,900	11.70	16.37	2285,200	11.97	16,20	2256,273	11.89	16,42
	Ácido oleico ( C18H34O2)	2472,812	13.02	17.11	2459,280	12.88	17.35	2439,210	12.86	17.21
	Fitol ( C20H40O)	1745,015	9.19	17.83	1744,501	9.14	17.91	1748,190	9.21	17.94
	Etil linoleato ( C20H36O2)	4787,294	25.21	21.50	4769,247	24.99	21.10	4738,450	24.98	21.40
	Farnesol ((C15H26O)	4235,231	22.30	22.30	4287,453	22.46	22.50	4263,230	22.48	22.45
	Butenamida (C4H11N)	3524,129	18.56	23.56	3535,291	18.52	23,61	3518,926	18.55	23.64
350°C	Butenamida (C4H11N)	7221,300	13.78	16.90	7248,301	13.66	16.40	7273,293	13.71	16.70
	Palmitic acid(C16H32O2)	14730,215	28.14	17.90	14756,276	27.82	17.80	14738,321	27.79	17.20
	Farnesol(C15H26O)	4322,100	8.16	20.60	4351,712	8.20	20.45	4332,543	8.17	20.54
	Solenasol( C45H74O )	4235,291	8.00	21.10	4276,311	8.06	21.40	4234,288	7.98	21.70
	Fitol ( C20H40O)	8765,288	16.55	23.06	8763,275	16.52	23.10	8754,269	16.51	23.07
	1,4 Hexadieno (C4H10)	6123,254	11.56	25.80	6117,266	11.53	25.67	6124,273	11.55	25.66
Ácido Ciclooctano (C8H16)	7542,371	14.24	16,1	7525, 651	14.18	16.30	7566,228	14.26	17.10	
450°C	2 hexil-2 decenal ( C16H30O)	10846,300	13.20	17.28	10832,297	13.18	17.33	10829,765	13.19	17.38
	Chloro octadecanol (C18H37Cl)	11872,287	14.44	17.80	11876,320	14.45	17.60	11876,010	14.47	17.77
	Palmitic acid (C16H32O2)	6656,342	8.10	18.45	6649,213	8.09	18.39	6645,265	8.09	18.53
	Ácido Ciclooctano (C8H16)	3979,221	4.84	20.90	3963,202	4.82	20.67	3947,187	4.80	20.72
	Carvacrol ( C10H14O)	4533,127	5.51	21.80	4542,298	5.52	21.77	4533,256	5.52	21.95
	Farnesol (C15H26O)	7688,346	9.35	23.20	7674,321	9.34	23.12	7665,382	9.34	23.32
	Fitol ( C20H40O)	14735,288	17.93	24.70	14754,271	17.95	24.44	14749,301	17.97	24.66
	Ácido enântico ( C7H14O2)	2398,281	2.91	25.71	2372,901	2.88	25.55	2343,205	2.85	25.29
	Óxido de Cariófileno ( C15H24O)	12832,336	15.61	26.88	12822,221	15.60	26.67	12836,291	15.64	26.91
Butenamida (C4H11N)	6623,522	8.06	27.29	6665,210	8.11	27.17	6642,328	8.09	27.22	

*Rt= Tempo de retenção*

Tabela 31 - Identificação de substâncias obtidas em diferentes temperaturas dos extratos obtidos dos frutos.

Temperatura	Substancia	L1			L2			L3		
		Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)	Area	%	Rt (min)
250°C	Ácido Cicloentanodecanóico (C10H20O2)	1232,126	9.11	16.20	3218,385	19.21	16.33	1216,324	8.25	16.24
	Farnesol ((C15H26O)	13524,129	90.80	23.11	13535,291	80.78	23.07	13518,926	91.74	23.21
350°C	Ácido Ciclooctano (C8H16)	721,300	4.50	13.90	728,301	4.49	13.70	723,293	4.49	13.63
	Ácido ciclopentanóico ( C4H8O2)	1110,349	6.94	16.30	1156,188	7.13	16.20	1138,113	7.07	16.24
	Farnesol(C15H26O)	14155,029	88.54	23.09	14232,011	87.89	23.11	14218,112	88.42	23.12
450°C	Ácido ciclopentanóico ( C4H8O2)	1111,126	6.57	3.70	1132,232	6.18	3.76	1125,154	6.09	3.58
	Ácido esteárico (C18H36O2)	1816,321	10.75	15.10	1855,349	10.69	15.20	1913,410	10.36	15.37
	Carvacrol ( C10H14O)	2421,342	14.33	15.41	2426,301	13.24	16.47	2562,219	13.87	16.44
	Farnesol (C15H26O)	12544,262	74.25	23.67	12901,287	70.44	23.58	12861,321	69.66	23.55

*Rt= Tempo de retenção*

### 5.2.5 Ensaio fitoquímicos

Foi utilizado a concentração de 0,5 mg/mL para todas os extratos, visto que concentrações mais altas a absorvância foi ultrapassada dos valores equivalentes a cada um dos padrões utilizados, não obtendo linearidade na curva de calibração.

Com os resultados das tabelas 32, 33 e 34 é possível perceber que os taninos são os metabólitos secundários que se apresentam em maior quantidade nos extratos das folhas e dos frutos assim como observado nas drogas vegetais de *M. charantia*. A presença de taninos em *M. charantia* já foi relatado em alguns estudos atribuindo a sua alta concentração a capacidade farmacológica desse vegetal, incluindo a atividade antimicrobiana (ZHANG, CHEN e BAI, 2018; NATRAJAN et al., 2017; QUIAO et al, 2017; JOSEPH & JINI, 2013).

Tabela 32 - Teor de Taninos equivalente a Catequina obtidos por espectroscopia na região do visível.

Extratos	Lotes	Concentração µg/mL	Valores de p (5%)		
			Tukey	Fisher	Bonferroni
FOLHAS	L1	250.29±0.02	0.032	0.031	0.026
	L2	250.76±0.01			
	L3	250.13±0.04			
	<b>Desvio padrão</b>	0.32			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.13			
FRUTOS	L1	185.32±0.01	0.31	0.033	0.030
	L2	185.56±0.01			
	L3	185.74±0.02			
	<b>Desvio padrão</b>	0.21			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.11			

Os polifenóis totais também se apresentaram em quantidades significantes em todos os extratos obtidos. Os compostos que apresentaram em menor quantidade foram os flavonoides totais, porem com quantidades também significativa, visto que vários estudos comprovam a presença desses metabólitos na *M. charantia* (QUIAO et al, 2017; JOSEPH & JINI, 2013; GOMES et al, 2011). Svobodova et al, 2017 realizou um estudo cujo objetivo era avaliar as atividades biológicas do extrato etanólico de partes aéreas e dos frutos de *Momordica charantia* e correlacionar essas atividades com a presença de compostos fenólicos, com isso, três ácidos fenólicos e onze derivados de glicosídeos de flavonóis foram identificados, sendo a quercetina-

3- O- pentosil – hexosídeo o composto mais abundante. Lin et al., 2011 desenvolveram um trabalho onde avaliaram os constituintes antioxidantes dos caules e frutos de *Momordica charantia*, nesse estudo os autores isolaram dos seus extratos etanólicos vários compostos fenólicos. As estruturas dos novos constituintes isolados foram elucidadas por métodos espectroscópicos.

Tabela 33 - Teor de Polifenóis totais equivalente a Ácido gálico obtidos por espectroscopia na região do visível.

Amostras	Lotes	Concentração µg/mL	Valores de p (5%)		
			Tukey	Fisher	Bonferroni
FOLHAS	L1	190.81±0.02	0.031	0.039	0.029
	L2	190.61±0.01			
	L3	190.13±0.03			
	<b>Desvio padrão</b>	±0.34			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.18			
FRUTOS	L1	108.28±0.01	0.28	0.030	0.028
	L2	108.69±0.01			
	L3	108.96±0.02			
	<b>Desvio padrão</b>	±0.36			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.15			

Tabela 34 - Teor de Flavonóides equivalente a Quercetina obtidos por espectroscopia na região do visível.

Extratos	Lotes	Concentração µg/mL	Valores de p (5%)		
			Tukey	Fisher	Bonferroni
FOLHAS	L1	83.31±0.02	0.033	0.039	0.030
	L2	83.26±0.01			
	L3	83.48±0.04			
	<b>Desvio padrão</b>	0.11			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.13			
FRUTOS	L1	35.55±0.01	0.030	0.034	0.029
	L2	35.47±0.01			
	L3	35.62±0.02			
	<b>Desvio padrão</b>	0.07			
	<b>Coefficiente de variação</b>	0.21			

Observando os valores do desvio padrão e coeficiente de variação percebe-se e que não houve variação significativa na quantificação desses metabólitos entre os lotes de extratos

obtidos da mesma amostra (folha ou fruto). Com a aplicação dos testes estatísticos a hipótese nula de que haveria diferença estatística entre os metabólitos quantificados nos lotes diferenciados foi rejeitada, visto que em todos os testes o valor de **p** apresentou-se abaixo de 0.05. Assim, a hipótese alternativa foi confirmada, ou seja, não existe diferença entre os lotes de extratos obtidos da mesma matéria prima quando considerada a quantificação dos metabólitos secundários Taninos, polifenóis totais e flavonoides.

Esses dados estão correlacionados com aqueles obtidos das técnicas termoanalíticas, na cinética de degradação e na análise pirólise acoplada a CG/MS.

#### 5.2.6 Citotoxicidade

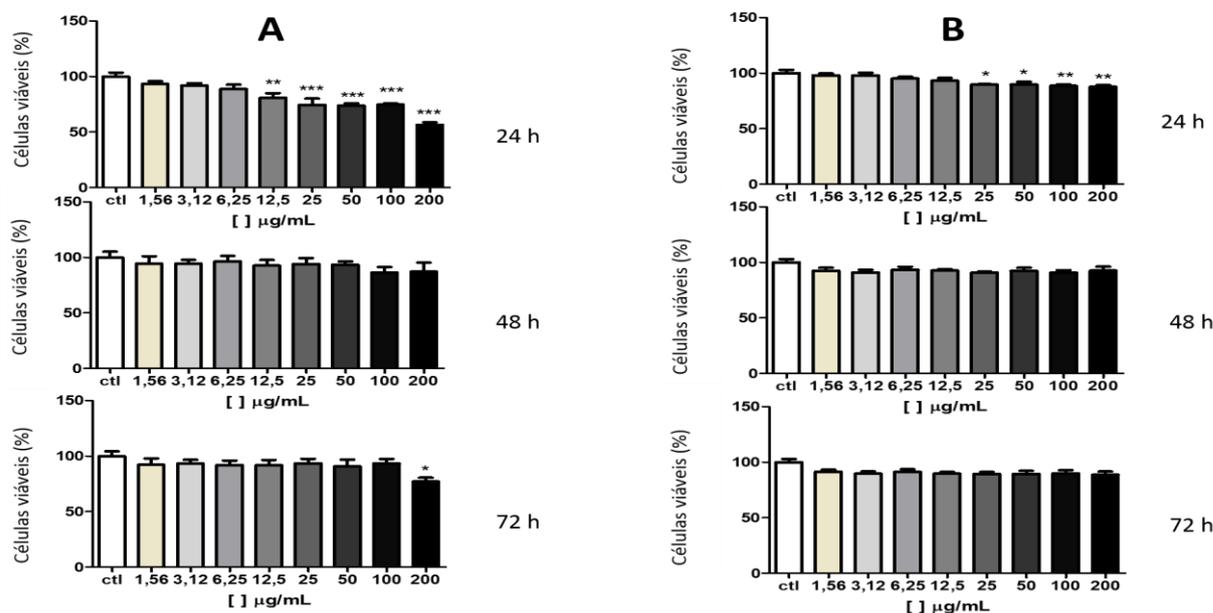
Como nas análises anteriores todos os lotes de extratos mostraram as mesmas propriedades biológicas, físicas e químicas utilizou-se uma mistura dos três lotes de cada parte da planta (Folhas e Frutos).

Inicialmente foi realizado o ensaio de MTT com os extratos obtidos das folhas e dos frutos da espécie *Momordica charantia* por um período de 24h, 48h e 72h de incubação. Os resultados podem ser observados nas figuras 5.8 e 5.9, onde é possível perceber que sobre a linhagem de fibroblasto L929 no tempo de 24 horas o extrato da folha inibiu a viabilidade dessa cultura a partir da concentração de 50 µg/mL de maneira concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração maior será a redução de células viáveis. Porém, observa-se que na concentração de 200 µg/mL houve uma maior redução.

Nos tempos de 48 horas e 72 horas observa-se que não houve redução dependente da concentração podendo não ter ocorrido alteração no metabolismo dessas células (FAHEINA-MARTINS, 2009), assim como nas células das linhagens de mastócitos P815, onde nos tempos de 24, 48 e 72 horas houve redução de células viáveis independente da concentração dos extratos (Figuras 28 e 29). Percebe-se que frente as duas linhagens testadas o extrato da folha obteve uma  $CI_{50}$  (Concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) maior que 200µg/mL.

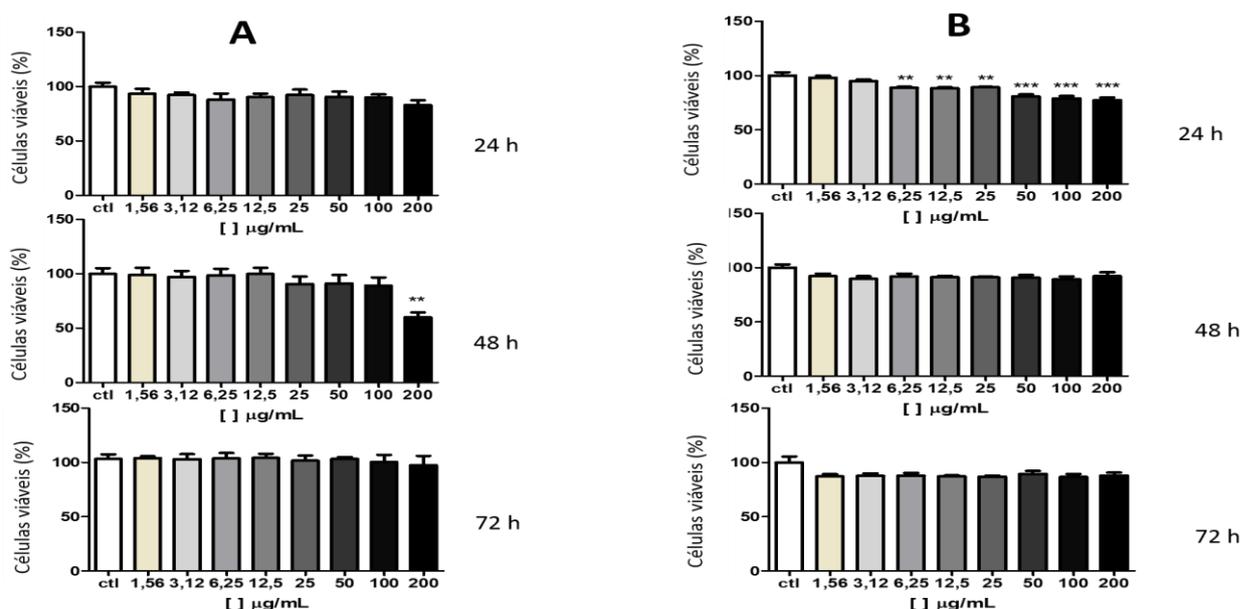
Em relação ao extrato obtido dos frutos de *M. charantia* observa-se que sobre as células da linhagem de fibroblasto L929 houve redução da viabilidade celular independente da concentração em todos os tempos avaliados. Percebe-se também que com a concentração de 200 µg/mL no tempo de 48 horas, obteve a maior redução de células viáveis. Sobre as células da linhagem de mastócitos P815 observou-se também que a redução da viabilidade celular ocorreu de maneira independente da concentração. Frente as duas linhagens estudadas percebe-se que a  $CI_{50}$  foi maior que 200 µg/mL, assim como no extrato obtido das folhas.

Figura 29 - Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.



**Legenda:** Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

Figura 30 - Efeito citotóxico do extrato do fruto da espécie *Momordica charantia* sobre a linhagem de fibroblasto L929 (A) e de mastócitos P815 (B), após 48h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT.



**Legenda:** Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

Alguns estudos obtiveram resultados semelhantes ao utilizar o extrato hidroalcolico (50%) das folhas e dos frutos. Cao, et al, 2011 avaliou o efeito citotóxico de extratos dos frutos de *M charantia* contra células da linhagem de fibroblastos, onde não obteve efeito citotóxico, apresentando uma  $CI_{50}$  maior que 200  $\mu\text{g/mL}$ .

Gupta, et al., 2010, Wu et al., 2009 e Zhang, et al, 2014, avaliaram o efeito citotóxico de extratos hidroalcolicos das folhas e dos frutos de *M charantia*, frente a mastócitos onde os mesmos obtiveram efeitos citotóxicos apenas em concentrações maiores que 200  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, quando utilizados extratos metanólicos e etanólicos obtiveram uma maior citotoxicidade.

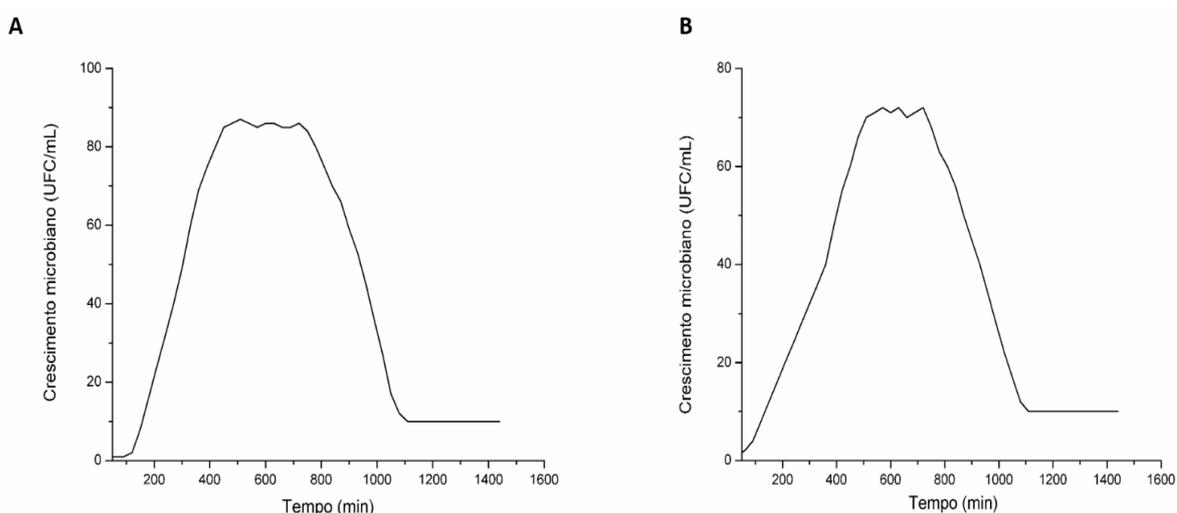
### 5.3 Estudo de Potência microbiológica

#### 5.3.1 Curva de crescimento

O estudo da curva de crescimento microbiano é um aspecto fundamental da microbiologia preditiva e é indispensável em diversos campos da biotecnologia, genética, e área farmacêutica. A microbiologia preditiva é uma combinação de princípios estatísticos, matemáticos e microbiológicos para quantificar o comportamento de um microrganismo particular, sendo a modelagem da cinética de crescimento bacteriano permite descrever o comportamento de um microrganismo específico em diferentes condições ambientais e, portanto, o seu conhecimento é importante para aplicar modelos que inibam esse crescimento eficazmente (SALIH, et al., 2012).

Para *S. aureus* (Figura 30A) e *E. coli* (Figura 30B) a curva de crescimento foi obtida no tempo de 24 horas.

Figura 31 - Curva de crescimento dos microrganismos *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) no tempo de 24 horas.



A primeira fase, caracteriza-se a fase de adaptação dos microrganismos (fase LAG), onde o mesmo está se adaptando ao meio de cultura e as condições do ambiente essa fase foi até o tempo de 120 minutos, observando a partir desse tempo o início da fase de crescimento exponencial (LOG) que se estendeu até 450 minutos. A partir desse ponto houve uma constância relativa no número de unidades formadora de colônias, caracterizando assim, a fase estacionária. Em seguida, a fase de declínio ou morte começou no tempo de 780 minutos e no tempo de 1080 minutos já havia  $10 \times 10$  UFC/mL, caracterizando o fim dessa fase, assim como da curva de crescimento.

Em relação a *E. coli*, observa-se que a fase de adaptação (LAG), foi mais curta do que de *S. aureus*, quando analisado nas mesmas condições. A modificação entre a fase de adaptação entre essas duas bactérias é devido a variação nas características de crescimento entre esses dois microrganismos, principalmente considerando a diferença na composição da parede celular de gram positivos (*S.aureus*) e gram negativos (*E. coli*) (MADIGAN et al, 2016). Assim, a fase de crescimento iniciou no tempo de 60 minutos, persistindo o crescimento até o tempo de 500 minutos. Outra diferença entre a curva dos dois microrganismos foi em relação a fase estacionária. Observou-se assim, que *E. coli* obteve um fase estacionária mais curta em relação a obtida por *S. aureus* que ocorreu entre os tempos de 500 a 720 minutos. A fase de declínio ou morte ocorreu no tempo de 720 a 1040 minutos, a partir desse ponto a quantidade de unidades formadoras de colônias de *E. coli* reduziram até  $10 \times 10$ UFC/mL, caracterizando assim, o fim da curva de crescimento microbiano dessa bactéria.

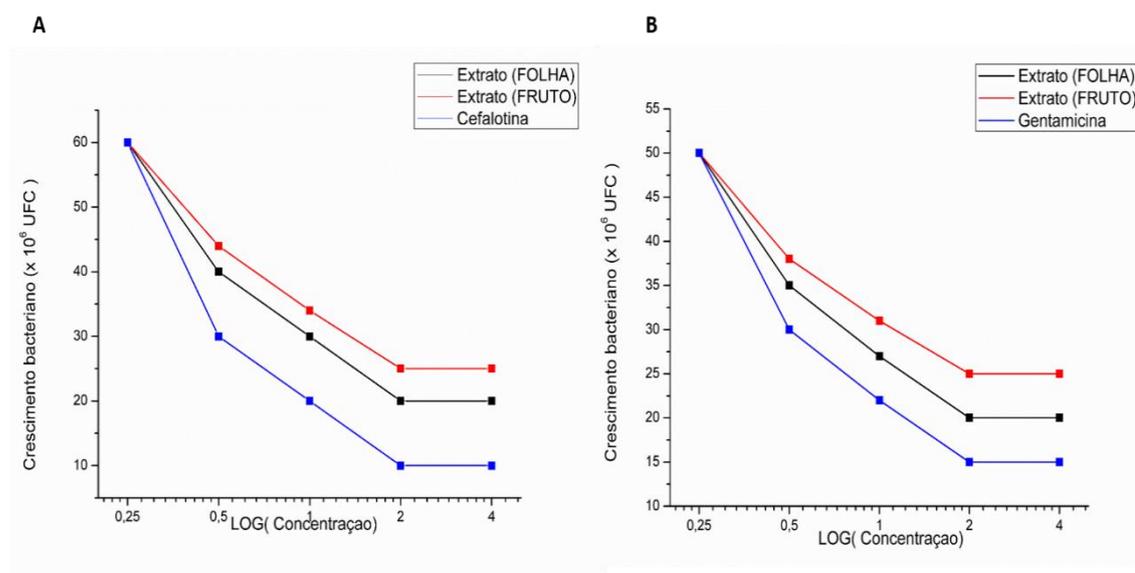
Padrões de crescimento similares foram observados pra os dois microrganismos em um estudo relaizado por Chatterjee et al., (2015) onde avaliou o efeito de nanopartículas de prata na modulação da curva de crescimento de *Echerichia coli* e *S.aureus*. Nesse estudo, foi observado que *E. Coli* foi mais susptível a essas nanopartículas, e que atividade antimicrobiana dessas nanopartículas de prata é atribuída a alteração da permeabilidade da membrana celular dessas bactérias provocando um atraso na fase de adaptação do crescimento microbiano desses microrganismos.

Com isso *Staphylococcus aureus* o tempo estabelecido para inserção das amostras testes e do padrão foi de 6 horas enquanto que para *Escherichia coli* foi de 5 horas após a incubação do inóculo ( $10^6$  UFC/mL) em caldo Mullher Hinton á  $37^\circ$  C. Esses momentos de iserção das amostras foram escolhidos por se encontrarem dentro da fase exponencial de crescimento das bactérias em questão.

### 5.3.2 Obtenção das curvas Taxa de crescimento x Concentração

Observando a figura 31 percebe-se que os dois extratos obtiveram atividade antimicrobiana em função da concentração reduzindo o número de Unidades Formadoras de Colônias das duas bactérias em relação ao número de UFC do inóculo no momento da inserção dessas amostras. As inclinações das curvas de crescimento dos microrganismos na fase *log*, permitem concluir que em concentrações mais altas dos extratos e do padrão a velocidade de crescimento é menor, de acordo com os princípios de ensaio turbidimétrico (CAZEDEY e SALGADO, 2013).

Figura 32 - Curva quantidade de unidades formadoras de colônias nos inóculos bacterianos em função da concentração da substância de referência e das amostras testes frente a *S. Aureus* (A) e *E.coli* (B).



Observa-se ainda que os extratos obtiveram o mesmo perfil dos antimicrobianos utilizados frente as duas bactérias. Esse fato já é esperado, uma vez que os dois extratos são ricos em taninos (GROVER & YADAV, 2004; JOSEPH & JINI, 2013) e que de acordo com Machado, et al, 2010 possuem atividade antimicrobiana devido a dois mecanismos de ação principais: em gram positivos eles se agregam a parede celular destruindo a camada de peptidoglicana, esse mecanismo é semelhante ao utilizado pelo betalactâmicos como a Cefalotina na atividade antimicrobiana. O segundo mecanismo de ação está relacionado a inibição de síntese proteica, semelhante a ação da Gentamicina na inibição bacteriana em gram

negativos (BENUCCI, et al., 2016; SANTOS, et al., 2017; GUO, et al., 2018; KHARCHOUFI et al., 2018).

Assim, por essa suposição de similaridade nos mecanismos de ação dos antimicrobianos e dos extratos utilizados os microrganismos foram inibidos nas mesmas proporções de concentração, obtendo paralelismo em 3 pontos (níveis 50%, 100% e 200%) das retas UFC X Concentração dos extratos em relação as substâncias de referência, conforme demonstrados os dados das tabelas 35 e 36.

Tabela 35 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e dos extratos frente a *S. aureus*.

<b>Extrato/ antimicrobiano</b>	<b>Coefficiente angular (a)</b>	<b>Coefficiente Linear (b)</b>	<b>Coefficiente de correlação (r<sup>2</sup>)</b>
Cefalotina	0,550	70,010	0,997
Folha	0,550	75,070	0,996
Fruto	0,550	80,070	0,994

Tabela 36 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos antimicrobianos e dos extratos frente a *E. coli*.

<b>Extrato/ antimicrobiano</b>	<b>Coefficiente angular (a)</b>	<b>Coefficiente Linear (b)</b>	<b>Coefficiente de correlação (r<sup>2</sup>)</b>
Gentamicina	0,370	59,160	0,995
Folha	0,370	63,160	0,996
Fruto	0,370	65,200	0,995

O paralelismo das retas das amostras em relação aos antimicrobianos foi confirmado, visto que todas as retas possuíam o mesmo coeficiente angular (a) na equação da reta ( $y = ax+b$ ), sendo possível fazer uma relação de doseamento entre as concentrações dos padrões (antimicrobianos) e amostras (extratos), calculando assim a potência antimicrobiana dos extratos em relação aos antimicrobianos (ERMER, JOHN e MILLER, 2008; FRANCISCO et al., 2016).

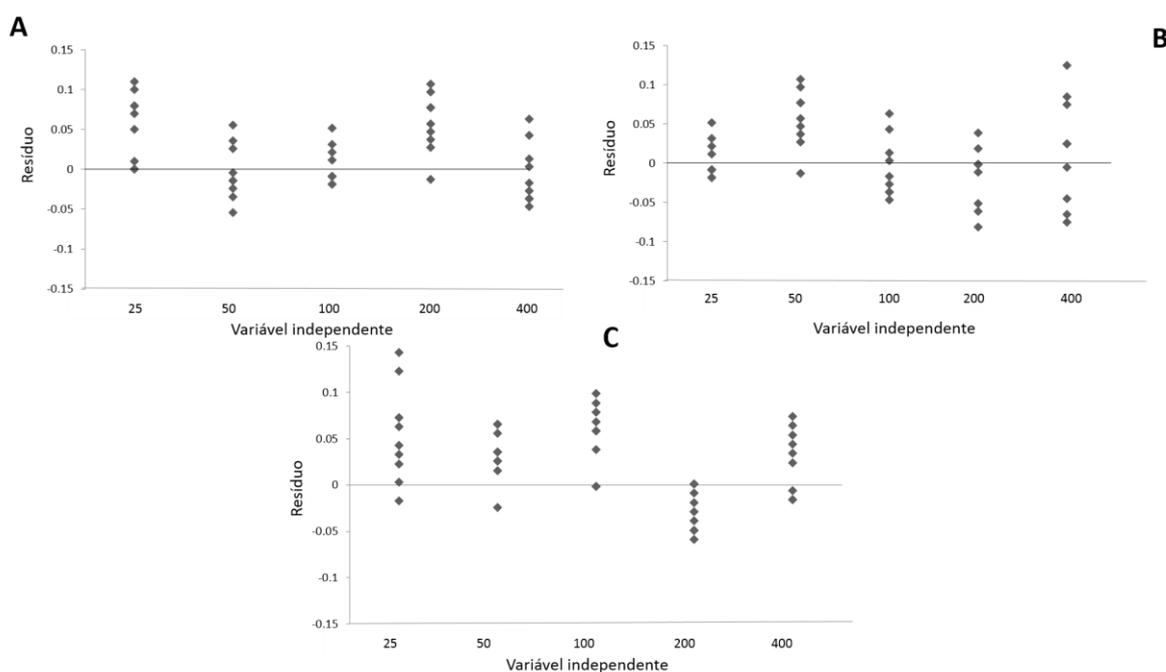
### 5.3.3 Determinação da potência antimicrobiana e validação do método analítico

#### 5.3.3.1 Análise da Curva de Calibração e verificação da linearidade

Para verificação da linearidade foram obtidas cinco curvas analíticas (UFC X Concentração) dos padrões e das amostras, sendo duas no mesmo dia (avaliação intradia) e as demais em dias diferentes (avaliação interdias). O modelo linear foi adequado para as cinco curvas apresentando normalidade, independência dos resíduos (homoscedasticidade) significativos e desvio de linearidade (regressão) não significativa (ERMER, JOHN e MILLER, 2008). A normalidade e independência de resíduos (homoscedasticidade) são requisitos necessários para que o método dos mínimos quadrados seja empregado na análise de regressão linear (SOLANO, 2011). Portanto, se algum deles estiverem fora dos limites de controle limita o método de ajuste.

Dessa forma, os resultados do estudo dos parâmetros do modelo linear construído apresentaram para os resíduos uma distribuição normal e sem dependência entre os mesmos (Figuras 32 e 33), a regressão foi adequada para representar a atividade inibitória dos antimicrobianos assim como dos extratos frente as bactérias escolhidas.

Figura 33 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de *M. charantia* obtido das folhas (A) e do fruto (B) e das análises realizada com Cefalotina (C) frente a *S. aureus*.



O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) é a fração da variância total de  $y$  que é explicada pela variação em  $x$ , ou seja, a proporção da variação total na quantidade de unidades formadoras de colônias que é explicada pela variação da concentração da substância antimicrobiana. As cinco retas apresentaram coeficiente de correlação ( $r$ ) superior ou igual a 0,98 (Tabela 37 e 38) conforme critério estabelecido pela resolução brasileira (BRASIL, 2003). Esses valores foram observados nas análises com as duas bactérias.

Figura 34 - Gráficos dos Resíduos das análises do extrato de *M. charantia* obtido das folhas (A) e do fruto (B) e das análises realizadas com Gentamicina (C) frente a *E. coli*.

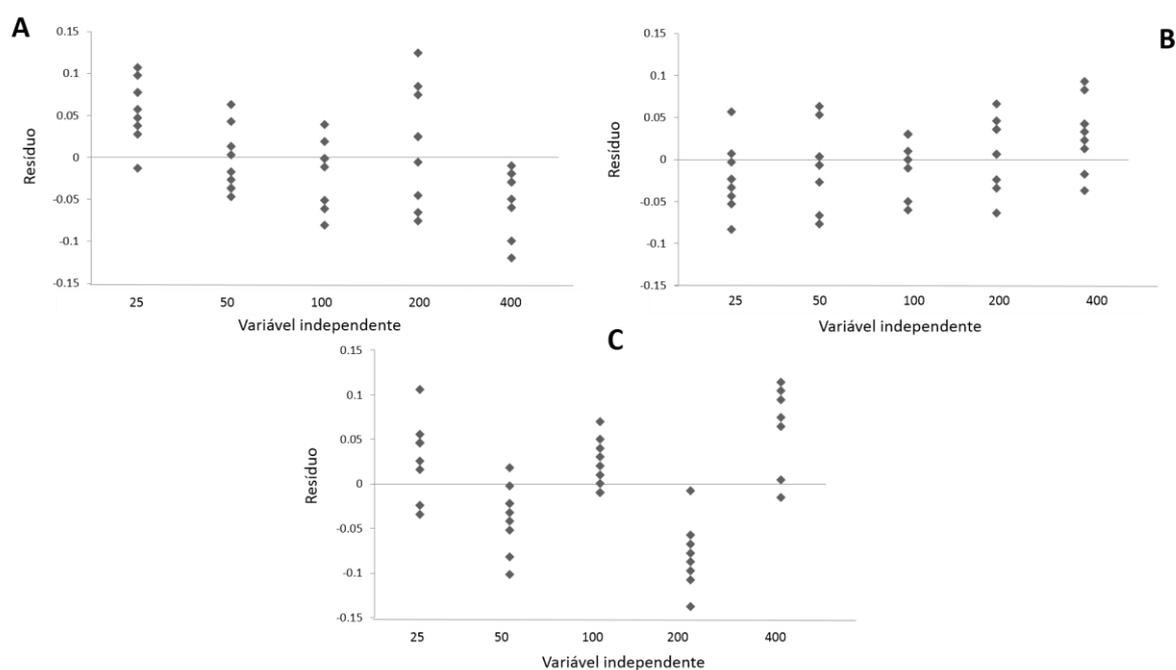


Tabela 37 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação -  $r^2$ ) para o padrão cefalotina e o os extratos obtidos da folha e fruto nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a *S. aureus*.

<b>Amostra</b>	<b>Retas</b>	<b>Coefficiente linear (a)</b>	<b>Coefficiente angular (b)</b>	<b>Coefficiente de correlação (<math>r^2</math>)</b>
<b>Folha</b>	1º Dia A	0,550	75,071	0,9996
	1º Dia B	0,550	75,073	0,9996
	2º Dia	0,550	75,072	0,9995
	3º Dia	0,550	75,071	0,9997
	4º Dia	0,550	75,074	0,9997
<b>Fruto</b>	1º Dia A	0,550	80,072	0,9996
	1º Dia B	0,550	80,076	0,9996
	2º Dia	0,550	80,073	0,9995
	3º Dia	0,550	80,078	0,9997
	4º Dia	0,550	80,075	0,9997
<b>Cefalotina</b>	1º Dia A	0,550	70,018	0,9996
	1º Dia B	0,550	70,012	0,9996
	2º Dia	0,550	70,011	0,9995
	3º Dia	0,550	70,013	0,9997
	4º Dia	0,550	70,016	0,9997

Tabela 38 - Parâmetros de curva analítica (intercepto - a, inclinação - b, e coeficiente de correlação -  $r^2$ ) para o padrão Gentamicina e o os extratos obtidos da folha e fruto nos níveis de 50%, 100% e 200% frente a *E. coli*.

<b>Amostra</b>	<b>Retas</b>	<b>Coefficiente linear (a)</b>	<b>Coefficiente angular (b)</b>	<b>Coefficiente de correlação (<math>r^2</math>)</b>
<b>Folha</b>	1º Dia A	0,370	63,166	0,9993
	1º Dia B	0,370	63,163	0,9995
	2º Dia	0,370	63,164	0,9994
	3º Dia	0,370	63,167	0,9992
	4º Dia	0,370	63,162	0,9992
<b>Fruto</b>	1º Dia A	0,370	65,203	0,9995
	1º Dia B	0,370	65,207	0,9997
	2º Dia	0,370	65,204	0,9993
	3º Dia	0,370	65,205	0,9996
	4º Dia	0,370	65,201	0,9992
<b>Gentamicina</b>	1º Dia A	0,370	59,165	0,9998
	1º Dia B	0,370	59,163	0,9998
	2º Dia	0,370	59,164	0,9997
	3º Dia	0,370	59,167	0,9996
	4º Dia	0,370	59,165	0,9995

Desta forma, um valor de  $r^2$  igual a 0,9996 e 0,9988 dos padrões no primeiro dia, significa que 99,96 % e 99,88% da variabilidade do número de UFC é explicada pela concentração da Cefalotina e Gentamicina, respectivamente (MONTGOMERY et. al., 2001).

#### 5.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada quanto à repetitividade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdias), assim como a exatidão. A exatidão pode ser vista como composta pela veracidade (trueness)-(bias) e pela precisão (desvio padrão) como demonstrados nas tabelas 39 e 40. Desta forma, pode ser considerada como a estimativa do erro total do processo analítico. A veracidade está relacionada com os erros sistemáticos do procedimento analítico e em alguns casos é referenciada como exatidão (SAVIANO et al, 2014; HUBERT 2007).

É recomendável desvio padrão menor do que 5 % em relação à potência calculada, indicando que o método desenvolvido apresenta precisão. Em relação à exatidão intradia e interdias, os valores médios de potência estão de acordo com o critério de validade: valor médio da potência entre 85 e 115 % do valor teórico do padrão (Tabelas 39 e 40), de acordo com a Farmacopéia Brasileira, V edição. Dessa forma, o método foi considerado exato, uma vez que o intervalo de tolerância para a concentração da amostra no nível em questão estava inserido no limite de  $\pm 15$  % (variação máxima permitida para avaliação da exatidão segundo resolução brasileira e guia do FDA) (BRASIL, 2003; U.S. FOOD., 2001).

Tabela 39 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra *S.aureus*.

Amostra	Análises	Potência e intervalo de confiança a 95 % (%)		
		50 %	100 %	200 %
Folha	1º dia A	45.80	91.72	183.58
	1º dia B	45.83	91.80	183.55
	2º dia	45.82	91.71	183.56
	3º dia	45.79	91.73	183.53
	4º dia	45.78	91.73	183.55
	<b>Média</b>	45.80	91.74	183.55
	<b>Desvio padrão</b>	0.021	0.036	0.018
	<b>Coef. de variação</b>	0.045	0.039	0.013
Fruto	1º dia A	44.40	88.74	177.18
	1º dia B	44.37	88.72	177.11
	2º dia	44.42	88.75	177.16
	3º dia	44.39	88.69	177.17
	4º dia	44.38	88.73	177.15
	<b>Média</b>	44.39	88.73	177.15
	<b>Desvio padrão</b>	0.019	0.023	0.027
	<b>Coef. de variação</b>	0.043	0.026	0.020

Tabela 40 - Valores de potências percentuais, intervalo de confiança a 95%, potências médias e desvio padrão para precisão e exatidão intra e inter-dias da amostra em três diferentes níveis de concentração contra *E. coli*.

Amostra	Análises	Potência e intervalo de confiança a 95 % (%)		
		50 %	100 %	200 %
Folha	1º dia A	45.73	91.55	183.28
	1º dia B	45.70	91.51	183.35
	2º dia	45.72	91.58	183.36
	3º dia	45.73	91.47	183.29
	4º dia	45.77	91.53	183.32
	<b>Média</b>	45.73	91.53	183.32
	<b>Desvio padrão</b>	0.025	0.041	0.035
	<b>Coef. de variação</b>	0.057	0.045	0.026
Fruto	1º dia A	44.72	89.45	178.17
	1º dia B	44.69	89.39	178.15
	2º dia	44.73	89.42	178.19
	3º dia	44.70	89.39	178.21
	4º dia	44.68	89.36	178.23
	<b>Média</b>	44.70	89.40	178.19
	<b>Desvio padrão</b>	0.021	0.034	0.032
	<b>Coef. de variação</b>	0.046	0.038	0.024

### 5.3.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Verificou-se então que a menor concentração dos extratos capaz de inibir o que crescimento microbiano de forma maior que o solvente, isto é, apresentou atividade antimicrobiana detectável pelo método foi igual a 0.125 mg/mL visto que o diluente não apresentou atividade antimicrobiana. Portanto, a concentração de 0.125 mg/mL foi determinada como limite de detecção do método desenvolvido. Com o cálculo obtido pela curva de calibração, o limite de detecção foi de 0.250 mg/mL para os extratos analisados contra os dois microrganismos. Para os antimicrobianos os limites de quantificação encontrados foram de 0.250 µg/mL.

O limite de quantificação foi calculado a partir das curvas de calibração intradia e interdia. Observando assim, nas tabelas 41 e 42 as menores concentrações que foram detectadas com linearidade do método (LOUSADA, et al., 2012).

Tabela 41 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com *S.aureus*.

<b>Análises</b>	<b>Extrato da folha (mg/mL)</b>	<b>Extrato do fruto (mg/mL)</b>	<b>Cefalotina (µg/mL)</b>
1º dia A	0.502	0.503	0.501
1º dia B	0.505	0.506	0.502
2º dia	0.504	0.509	0.504
3º dia	0.503	0.503	0.504
4º dia	0.502	0.505	0.503
<b>Desvio padrão</b>	0.001	0.002	0.001
<b>Coeficiente de variação</b>	0.259	0.493	0.259

Tabela 42 - Valores do limite de quantificação, desvio padrão e coeficiente de variação calculado intradia e interdias nas análises com *E. coli*.

<b>Análises</b>	<b>Extrato da folha (mg/mL)</b>	<b>Extrato do fruto (mg/mL)</b>	<b>Cefalotina (µg/mL)</b>
1º dia A	0.503	0.502	0.504
1º dia B	0.502	0.507	0.506
2º dia	0.505	0.503	0.502
3º dia	0.504	0.504	0.505
4º dia	0.503	0.506	0.503
<b>Desvio padrão</b>	0.001	0.002	0.002
<b>Coeficiente de variação</b>	0.226	0.411	0.314

### 5.3.6 Robustez

Os resultados dos métodos analíticos podem variar por uma série de fatores, o que afetaria a sua reprodutibilidade. Assim, deve-se avaliar a robustez do método, isto é, a sua capacidade em resistir a pequenas variações (SAVIANO et al., 2014).

Não ocorreu variação na potência quando variado o comprimento de onda de leitura das absorbâncias e os diluentes das amostras (tabelas 43 e 44). Portanto, com a alteração do pH, observou-se uma redução do crescimento microbiano nas variações ácidas e alcalina. Com isso ocorreu mudança das absorbâncias e consequentemente alteração nos cálculos das potências dos extratos em relação aos antimicrobianos, diminuindo esses valores, todavia obedecendo a variação permitida pela RDC de 2003.

Tabela 43 - Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a *S. aureus* em diversas condições.

Amostra	Comprimento de onda (nm)			DP	CV	Solvente			DP	CV	pH			DP	CV
	600	625	650			DMSO (10%)	Glicose (5%)	S.salina (0.9%)			Ácido	Básico	Neutro		
Folha	91.67	91.72	91.78	<b>0.055</b>	<b>0.600</b>	91.74	91.70	91.76	<b>0.028</b>	<b>0.310</b>	88.54	88.62	88.57	<b>0.040</b>	<b>0.460</b>
Fruto	88.72	88.76	88.69	<b>0.035</b>	<b>0.400</b>	88.74	88.76	88.70	<b>0.031</b>	<b>0.340</b>	86.41	86.39	86.45	<b>0.031</b>	<b>0.350</b>

**Legenda:** DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Tabela 44 - Valores de potência relativa dos extratos aos antimicrobianos frente a *E. coli* em diversas condições.

Amostra	Comprimento de onda (nm)			DP	CV	Solvente			DP	CV	pH			DP	CV
	600	625	650			DMSO (10%)	Glicose (5%)	S.salina (0.9%)			Ácido	Básico	Neutro		
Folha	91.52	91.49	91.48	<b>0.021</b>	<b>0.230</b>	91.54	91.50	91.55	<b>0.026</b>	<b>0.290</b>	87.72	87.69	87.67	<b>0.025</b>	<b>0.260</b>
Fruto	89.42	89.41	89.36	<b>0.032</b>	<b>0.360</b>	89.42	89.46	89.44	<b>0.031</b>	<b>0.340</b>	85.39	85.46	85.44	<b>0.036</b>	<b>0.420</b>

**Legenda:** DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

De acordo com Dafalle, 2015 a alteração de pH influencia na fase lag de crescimento microbiano, prolongando essa fase e consequentemente retardando a fase de crescimento, justificando assim a diferença das potências calculadas quando ocorre variação desse parâmetro.

Durante a fase log (ou de crescimento exponencial) o crescimento microbiano ocorre de forma rápida. As bactérias, quando em condições adequadas, dividem-se num determinado

intervalo de tempo (tempo de geração) de forma que a população microbiana aumenta em progressão geométrica. O tempo de geração é inerente ao microrganismo e depende de vários fatores, inclusive do pH. A turbidez resultante do crescimento microbiano e decorrente da interação entre antibiótico e microrganismo-teste é influenciada pelas fases lag e log de crescimento (AKKERMANS E IMPE, 2018). Conseqüentemente, se o pH do meio de cultura varia de forma significativa durante o período de incubação do ensaio, a atividade do antibiótico avaliado frente ao microrganismo teste pode ser alterada como observada nos dados obtidos por esse estudo.

## 5.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações

### 5.4.1 Estudo de compatibilidade

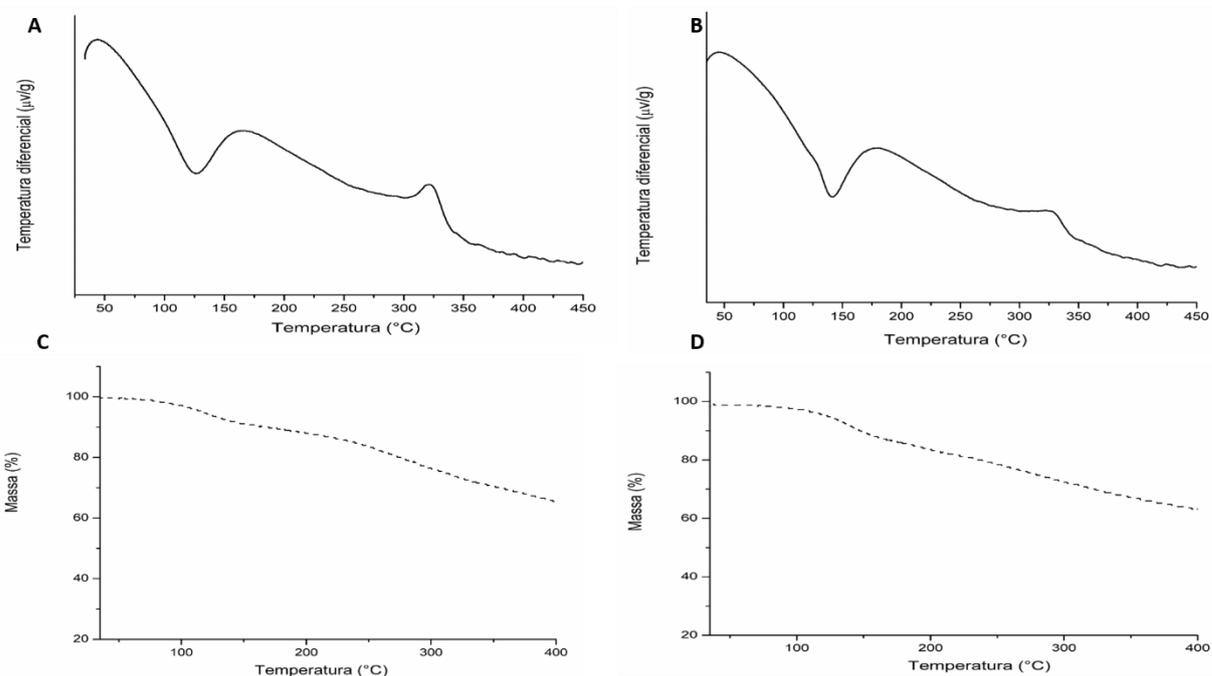
Os dados térmicos dos extratos nebulizado de *M. charantia* são apresentados na figura 34 Os dados de DTA dos extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*. (Figuras 34A e 34B) demonstraram a presença de um pico endotérmico à temperatura de 112,60 °C ( $\Delta H = -320,50 \text{ J g}^{-1}$ ) para folha e 118,55 °C ( $\Delta H = -116,50 \text{ J g}^{-1}$ ) para os frutos provavelmente relacionado com a perda de constituintes voláteis da amostra, tais como etanol e água.

Este evento, mostrado na curva termogravimétrica (Figura 34 C e 34 D), corresponde à perda de 9,23% da massa da amostra. O processo de decomposição dos compostos orgânicos começa em 197,58 °C no extrato das folhas e 186,56 °C nos extratos obtidos dos frutos, e continua até ao fim do intervalo analisado, o que representa uma perda de 41,28% da massa da amostra para o extrato obtido da folha e para o extrato obtido do fruto uma massa de 41,78%, resultando num resíduo de 59,78% em relação ao extrato das folhas e de 59,28% em relação aos extratos dos frutos.

Este resíduo é significativo, provavelmente devido ao conteúdo do adjuvante de secagem Aerosil® 200 (20,00%), que além de aumentar a estabilidade do extrato, é muito estável (p. f.: 1600,00 °C) (ROWE, SHESKEY E QUINN, 2009).

De acordo com os resultados, a maior parte das misturas entre extrato e excipientes apresentam variações significativas nos perfis térmicos esperados. Os valores de entalpia variaram em cada mistura com o excipiente específico. Algumas alterações relativas a entalpia são esperadas nesses experimentos, devido a problemas na uniformidade de conteúdo de pequenas amostras utilizadas nas análises DTA (SANTANA et al, 2017).

Figura 35 - Curvas DTA (A- folha, B- fruto) e TG (C-folha, D-fruto) dos extratos obtidos de *M. charantia*.



#### 5.4.1.1 Gelificantes

O carbopol apresenta um total de cinco eventos térmicos, sendo o primeiro compreendendo a faixa de 55,23-114,42 °C ( $\Delta H$  -73,82 J/g), provavelmente decorrente de perda de umidade, uma vez que o processo de decomposição ocorre apenas a partir dos 260 °C (SHAHZAD et al., 2011), correspondendo ao terceiro evento encontrado, que compreende a faixa de 262,33-281,52 °C ( $\Delta H$  -93,29 J/g). A análise por DTA da mistura binária entre os extratos e o carbopol (Figura 35A e 36A) demonstra que a mistura assume as características de interação entre o excipiente e os extratos das folhas e dos frutos, isso foi evidenciado na tabela 7.3 quando as entalpias por região das misturas apresentaram valores reais menores que as entalpias teóricas. Isto sugere incompatibilidade entre o extrato e o excipiente. O carbopol (Figuras 35D e 36D) apresenta apenas dois eventos de perda de massa em sua curva termogravimétrica, sendo que o primeiro inicia em 242,24 e vai até 281,14 °C, com perda de massa de 22,44% e o segundo inicia-se em 281,14 °C se estendendo até 400°C, perdendo 31,54% de massa. Já a mistura binária com o extrato da folha apresenta dois eventos de perda de massa, sendo que o primeiro é antecipado, em relação ao excipiente isolado, partindo de 203,22 até 276,1 °C, com perda de 15,94%. Em relação a mistura binária com o extrato do fruto, não houve nenhuma perda considerável de massa, confirmando mais uma vez a

incompatibilidade entre o extrato e o excipiente, já que ocorreu alteração do perfil termogravimétrico do extrato e do excipiente.

Em sua curva DTA, a trietanolamina (Figura 35B e 36B) apresenta dois eventos significativos, um endotérmico e um exotérmico, sendo o primeiro iniciando em 107,93 e indo até 163,54 °C ( $\Delta H$  -265,98 J/g), o segundo compreendendo a faixa de 310,10-341,23 °C ( $\Delta H$  112,32 J/g). Nas curvas da mistura binária, é observado um perfil diferente do extrato e do excipiente quando tratados isolados. Assim, o primeiro evento é retardado, acontecendo na faixa de temperatura de 164,36-185,47 °C ( $\Delta H$  -186,62 J/g), assim como o desaparecimento do segundo evento no extrato do futo e o surgimento de um novo pico endotérmico no extrato obtido da folha, sugerindo incompatibilidade física, pois mudança, desaparecimento dos picos, surgimentos de outros além de variações endotérmicas ou exotérmicas são consideradas interações físicas entre dois compostos (DANIEL et al., 2013). Além das misturas das misturas apresentarem valores de entalpias reais menores que as entalpias teóricas (tabela 45).

Em relação a análise termogravimétrica a trietanolamina (Figura 35E e 36E) apresenta dois eventos de perda de massa, o primeiro a partir de 115,68 °C, com perda de 11,03% e o segundo evento a partir de 312,07 °C, com perda de 40,21%. As misturas binárias apresentam apenas um evento de perda de massa, que apresentou-se retardado, acontecendo em 172,31 °C, com perda de massa de 27,24% para o extrato obtido das folhas já para o extrato obtido dos frutos essa etapa correu em 168,31°C apresentando uma perda de massa de 22,21%.

A curva DTA do Natrosol (Figura 35C E 36C) revela um evento endotérmico largo devido à perda de água adsorvida, esse evento ocorreu na temperatura de 98,56°C com  $\Delta H = -106,57$  J/g. Um evento exotérmico também foi observado a partir da temperatura 343,28°C ( $\Delta H$  -262,15J/g). Tal comportamento também foi observado por Maximiano e colaboradores (2010). A curva TG do Natrosol, apresentada nas figura 35F e 36F, evidencia uma primeira perda de massa de 10% na temperatura de 96,34°C devido à perda de água. A partir de 289,76 °C tem início a perda de massa significativa levando a um resíduo final de cerca de 20%. As misturas binárias não apresentaram indícios de interação com os extratos e o Natrosol. Nos perfis térmicos das misturas, observou-se que estas mantiveram as características do extrato, ao mesmo tempo que também expressaram o pico endotérmico do excipiente. Para estas misturas, tanto o primeiro, quanto o segundo pico do excipiente são expressos à mesma temperatura, sem qualquer alteração significativa na faixa de temperatura de início do evento, apresentando valores reais de entalpia por região próximos aos valores teóricos (Tabela 45).

Ainda percebe-se que não houve nenhuma alteração na perda de umidade, na primeira fase, do extrato ou do excipiente. Foi detectada nas misturas, que a principal fase de perda de

massa do natrosol tem seu início no intervalo de temperatura a partir de 285,22°C, na mistura com o extrato da folha e 285, 26 na mistura com o extrato dos frutos, sendo apenas ligeiramente deslocada para temperaturas mais elevadas, se estendendo até 379, 23 °C e 376,22 nos extratos das folhas e dos frutos resectivamente.

O Natrosol é um polímero não iônico, solúvel em água, que apresenta a capacidade de espessar, suspender, aglutinar, emulsificar, formar películas, estabilizar, dispersar e reter água. Essa compatibilidade pode está relacionado com o alto valor de temperatura vítrea do Natrosol que é explicado pela presença de ligações de hidrogênio intermoleculares que envolvem longas cadeias, as quais dificultam o movimento rotacional dos átomos em torno das ligações simples e faz com que a temperatura de transição vítrea desse polissacarídeo tenha valores acima de 100°C, não interferindo nos processos térmicos dos extratos e não permitindo a alterações no seu perfil devido a presença desses (PIRES, MUSSEL, YOSHIDA, 2017).

Figura 36 - Curvas DTA (A-Carbopol, B-Trietanolamina e C- Natrosol) e TG (D-Carbopol, E- Trietanolamina e F- Natrosol) do extrato obtido das folhas de *M. charantia* com os agentes gelificantes.

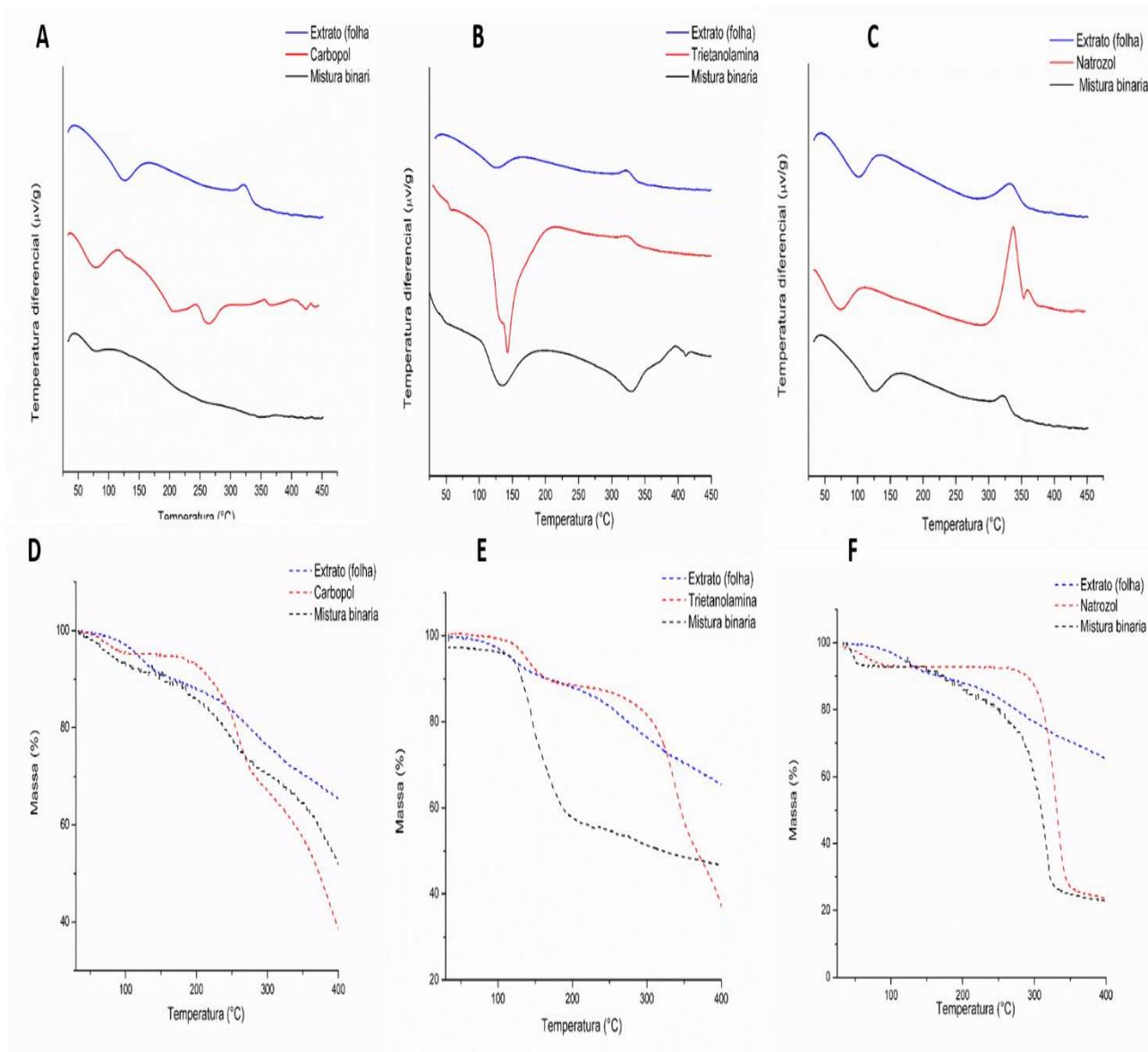


Figura 37 - Curvas DTA (A-Carbopol, B-Trietanolamina e C- Natrosol) e TG (D-Carbopol, E-Trietanolamina e G- Natrosol) do extrato obtido dos frutos de *M. charantia* com os agentes gelificantes.

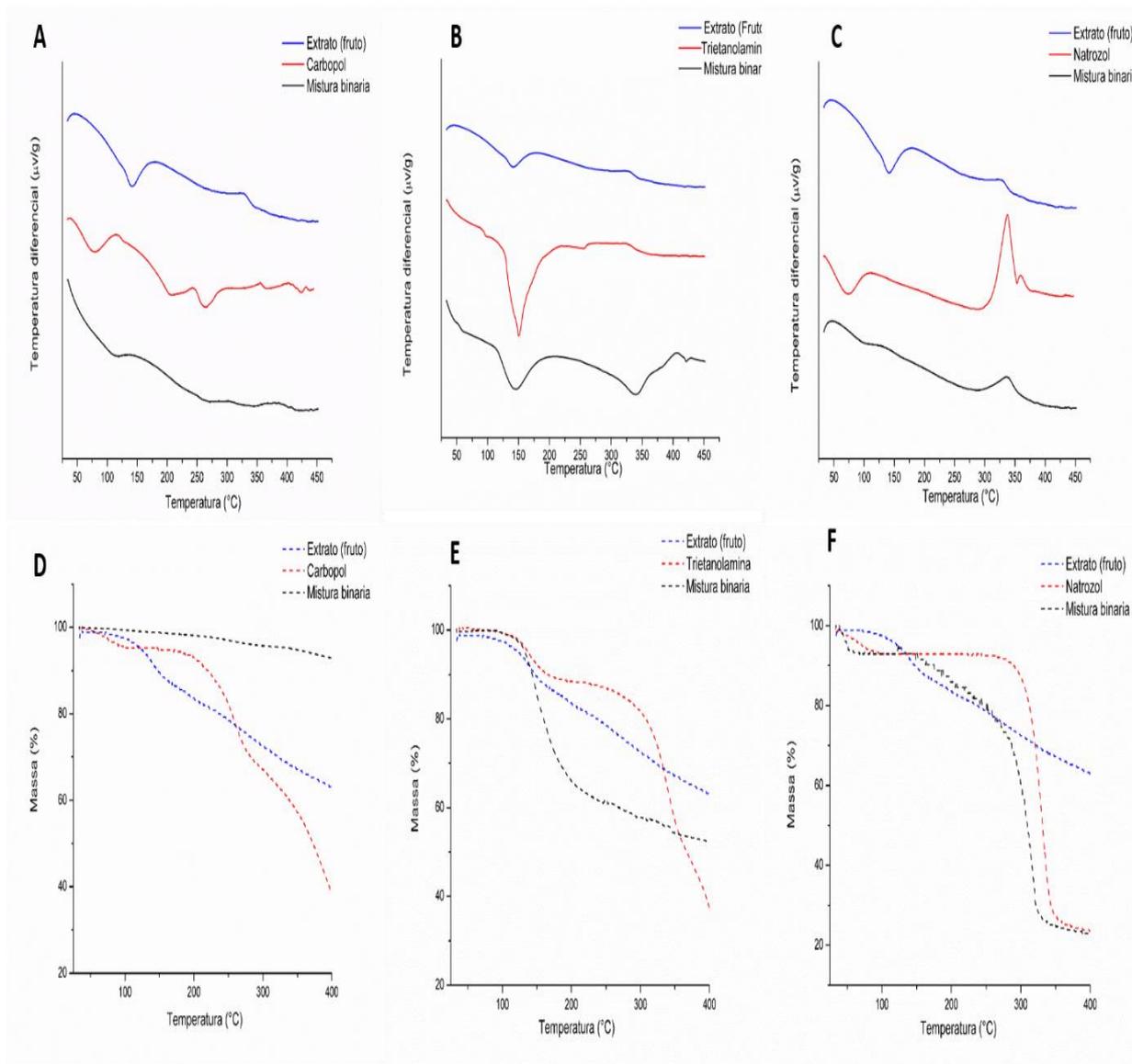


Tabela 45 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes geifificantes com os extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*.

Amostra	Misturas	Entalpia (J/g)/35-250°C		Entalpia (J/g)/250-450°C	
		Valor teórico	Valor real	Valor teórico	Valor real
Folhas	Extrato + Carbopol	-169,21	-27,18	-103,46	-20,27
	Extrato + Trietanolamina	-527,14	-85,21	-127,70	25,96
	Extrato + Natrosol	-259,46	-298,37	359,92	364,50
Frutos	Extrato + Carbopol	-149,96	-98,71	-136,55	-13,02
	Extrato + Trietanolamina	-507,89	-79,78	-160,15	51,58
	Extrato + Natrosol	-240,21	-251,01	326,83	334,76

#### 5.4.1.2 Umectantes

Foram analisados os agentes umectantes glicerina e propilenoglicol, no intuito de avaliar qual destes é o mais compatível termicamente junto aos extratos. Nas figuras 37 e 38 encontram-se as curvas de TG e DTA correspondentes aos excipientes isolados e a mistura binária destes com os extratos.

A curva DTA da glicerina (Figura 37 A e 38A) apresentou dois picos endotérmicos referentes aos processos de transições de fase da amostra, sendo assim, um ocorreu em 146,23°C ( $\Delta = 20,77$  J/g) e outro em 269,59°C ( $\Delta = 337,8$  J/g).

Nas curvas das misturas binárias foi possível observar que um forte evento endotérmico do excipiente foi suprimido na mistura com os extratos, sendo indicativo de interação física e conseqüentemente incompatibilidade (MENDONÇA et al., 2014). As energias por região obtiveram valores de entalpia real distantes dos valores teóricos, caracterizando assim, uma possível incompatibilidade entre os extratos e o excipiente.

Na curva termogravimétrica da glicerina (Figura 37C e 38C) foi possível detectar duas etapas de decomposição, com o primeiro evento ocorrendo entre 139,86 e 163,42 °C com perda de massa de 14,76%. A segunda etapa de decomposição teve início em 274,43 °C com perda de 59,23% de massa. As misturas binárias apresentaram um perfil térmico característico da glicerina e dos extratos, com um pequeno retardo no processo inicial de degradação, quando comparado as amostras isoladas. Como houve uma incompatibilidade demonstrada de forma mais intensa na análise DTA, sugere-se que houve uma interação de natureza física como alteração na mudança de estado físico, por exemplo (SANTANA et al, 2017).

Em relação ao propilenoglicol a curva DTA (Figura 37B e 38B) apresentou um pico endotérmico em 124,2F°C, ( $\Delta H = -31,21$  J/g) possivelmente relacionado à mudança de estado da amostra e o outro pico endotérmico em 219,00°C ( $\Delta = -21,67$  J/g) relacionado a decomposição dos componentes principais do excipiente, ou ainda a possíveis reações secundárias ocorridas durante o processo de termólise. A curva termogravimétrica do propilenoglicol apresentou três etapas de decomposição térmica. A primeira refere-se a uma faixa de temperatura que foi de 25,96 a 132,60°C, com perda de massa de 6,94 %, provavelmente essa perda está relacionada com a saída de água e outras substâncias voláteis associadas ao seu processo de fabricação, o segundo evento ocorreu entre as temperaturas de 132,60-151,65. Na temperatura de 151,60 a 208,58°C ocorreu a maior perda de massa do componente, provavelmente relacionada à decomposição de seus principais constituintes (ANDRADE et al., 2007) (Figuras 37D e 38D).

As curvas das misturas binárias dos extratos com o excipiente mostraram indícios de compatibilidade térmica com o extrato, uma vez que não foram detectadas alterações no perfil térmico, exceto uma ligeira retardamento do evento de perda de umidade a partir das misturas, que agora ocorre em cerca de 145,12 °C para os extratos das folhas e 151,21 para os extratos dos frutos. Na figura (37E e 38E), não se observaram alterações nos eventos de maneira a sugerir comprometimento da estabilidade dos extratos. A perda de massa na faixa de temperatura entre 150 e 210 °C, característica da degradação do excipiente, não foi alterada, nem a perda de água.

A conservação da estabilidade dos extratos e o seu perfil de degradação confirmam a compatibilidade entre propilenoglicol e os extratos, indicando que este umectante possivelmente pode ser utilizado na formulação semissólida desses extratos. Além disso os valores reais nas energias por região apresentaram-se próximo ao valor teórico (Tabela 46).

Tabela 46 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes umectantes com os extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*.

Amostra	Misturas	Entalpia (J/g)/35-250°C		Entalpia (J/g)/250-450°C	
		Valor teórico	Valor real	Valor teórico	Valor real
Folhas	Extrato + Glicerina	-633,31	141,15	-1066,08	-286,86
	Extrato + Propilenoglicol	-1676,41	-1708,44	-87,84	-87,98
Frutos	Extrato + Glicerina	-666,40	305,80	-1049,83	-144,31
	Extrato + Propilenoglicol	-1657,16	-1708,44	-120,93	-127,98

Figura 38 - Curvas DTA (A-Glicerina e B-Propilenoglicol) e TG (C-Glicerina e D-Propilenoglicol) do extrato obtido das folhas de *M. charantia* com os agentes umectantes.

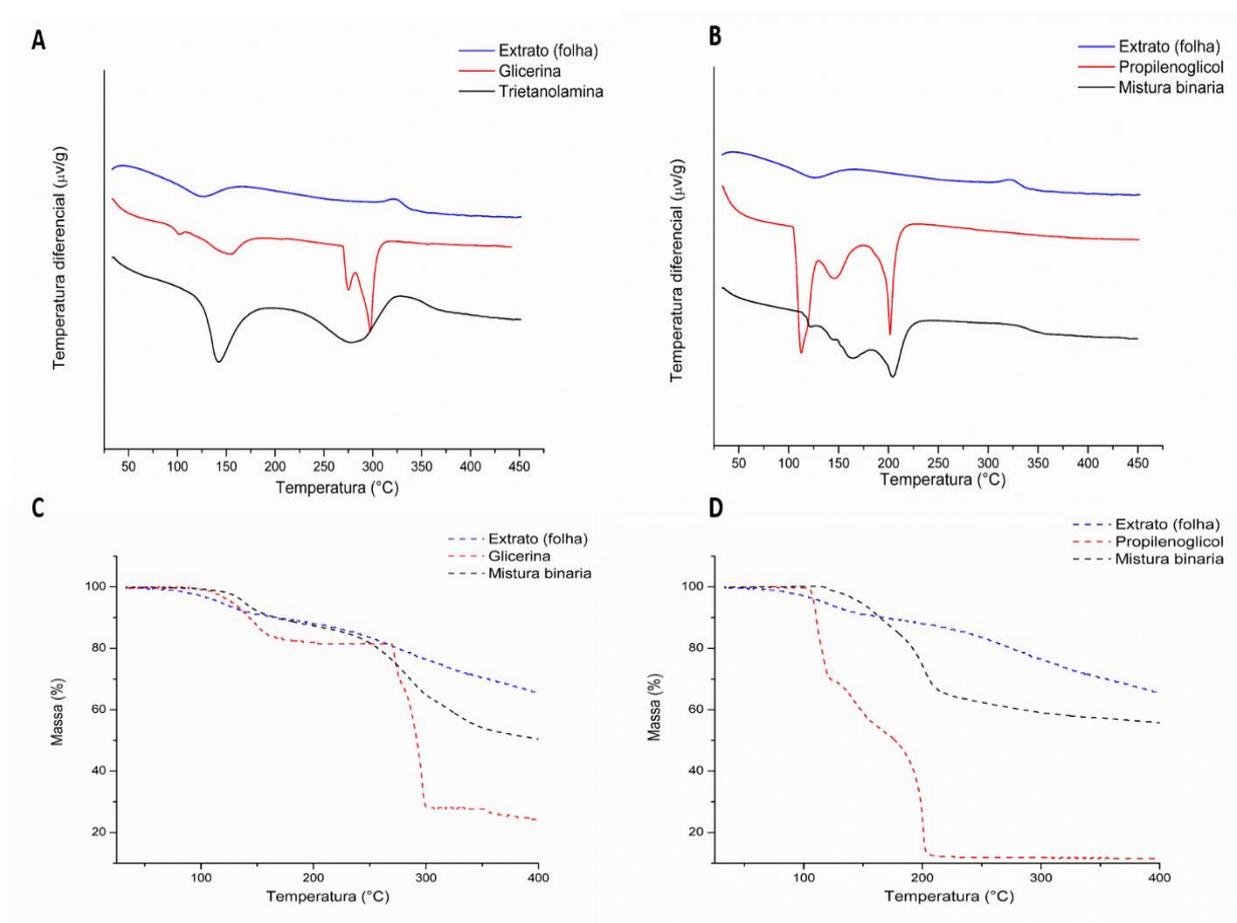
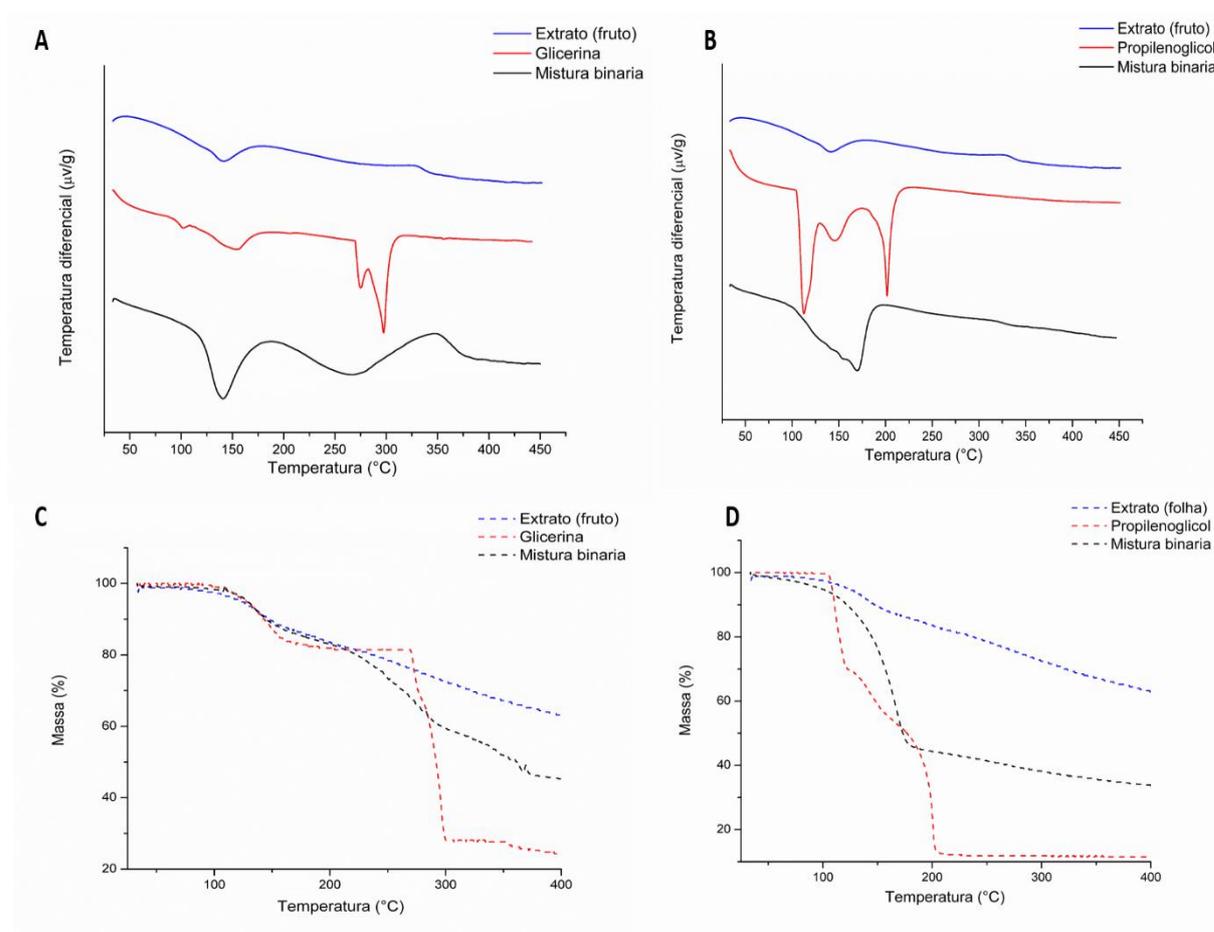


Figura 39 - Curvas DTA (A-Glicerina e B-Propilenoglicol) e TG (C-Glicerina e D-Propilenoglicol) do extrato obtido dos frutos de *M. charantia* com os agentes umectantes.



#### 5.4.1.3 Conservantes

A curva DTA do metilparabeno (Figura 39A e 40A) apresenta três eventos térmicos significativos, sendo o último deles exotérmico. O primeiro evento decorrente da fusão do excipiente compreendendo a faixa de 127,32-131,98 °C ( $\Delta H$  -257,16 J/g), no entanto, observando as misturas binárias, é possível observar apenas dois eventos endotérmicos, sendo e um perfil térmico semelhante ao observado nos extratos, levando a crer que houve uma interação entre os extratos e os excipientes que causou uma diminuição da entalpia na faixa de fusão do excipiente (NETO, 2009). Portanto, há um indício de incompatibilidade que foi confirmado ao observar os valores reais das energias or região, que se distinguiram muito dos valores teóricos de entalpia (Tabela 47). Na curva TG do excipiente com os extratos binária (Figura 39C e 40C) houve uma antecipação considerável da temperatura de degradação variando de 301,27 °C do excipiente isolado para 147,54°C quando em mistura binária com o

extrato da folha com resíduo de 40,32% e para 162,38°C quando associado ao extrato dos frutos de *M. charantia* com resíduo de 23,01%.

O perfil DTA do Imidazolidinil uréia mostrou um evento endotérmico na temperatura de 162,21°C ( $\Delta H$  -199,96 J/g) e um evento exotérmico que ocorreu em 260,60°C ( $\Delta H$  351,79 J/g). Esses dois eventos se mantiveram nas misturas binárias, sem deslocamento nos intervalos característicos de temperatura e com valores reais de entalpia próximos aos valores teóricos, quando avaliados por região (Tabela 47). As curvas TG do Imidazolidinil uréia isolada mostra três etapas de decomposição térmica nas seguintes temperaturas: 41-153 °C; 153-237 °C; 237-331 °C; respectivamente. A perda de massa total foi em torno de 38%. Nos perfis TG das misturas do excipiente com o extratos, é possível identificar que os eventos de decomposição ocorrem nos mesmos intervalos de temperatura, com apenas pequenas diferenças na perda de massa em cada evento.

Tabela 47 - Valores de energia decorrente dos processos térmicos gerados no perfil DTA dos excipientes conservantes com os extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*.

Extratos	Misturas	Entalpia (J/g)/35-250°C		Entalpia (J/g)/250-450°C	
		Valor teórico	Valor real	Valor teórico	Valor real
Folhas	Extrato + Metilparabeno	-636,84	-195,36	-239,67	-210,92
	Extrato + Imi. uréia	-1436,61	-1395,56	1059,87	1126,18
Frutos	Extrato + Metilparabeno	-617,59	-271,15	-272,76	-348,86
	Extrato + Imi. uréia	-1417,36	-1490,74	1092,96	1056,86

Figura 40 - Curvas DTA (A-Metilparabeno e B-Imidazolinidil uréia) e TG (C-Metilparabeno e D-Imidazolinidil uréia) do extrato obtido das folhas de *M. charantia* com os agentes conservantes.

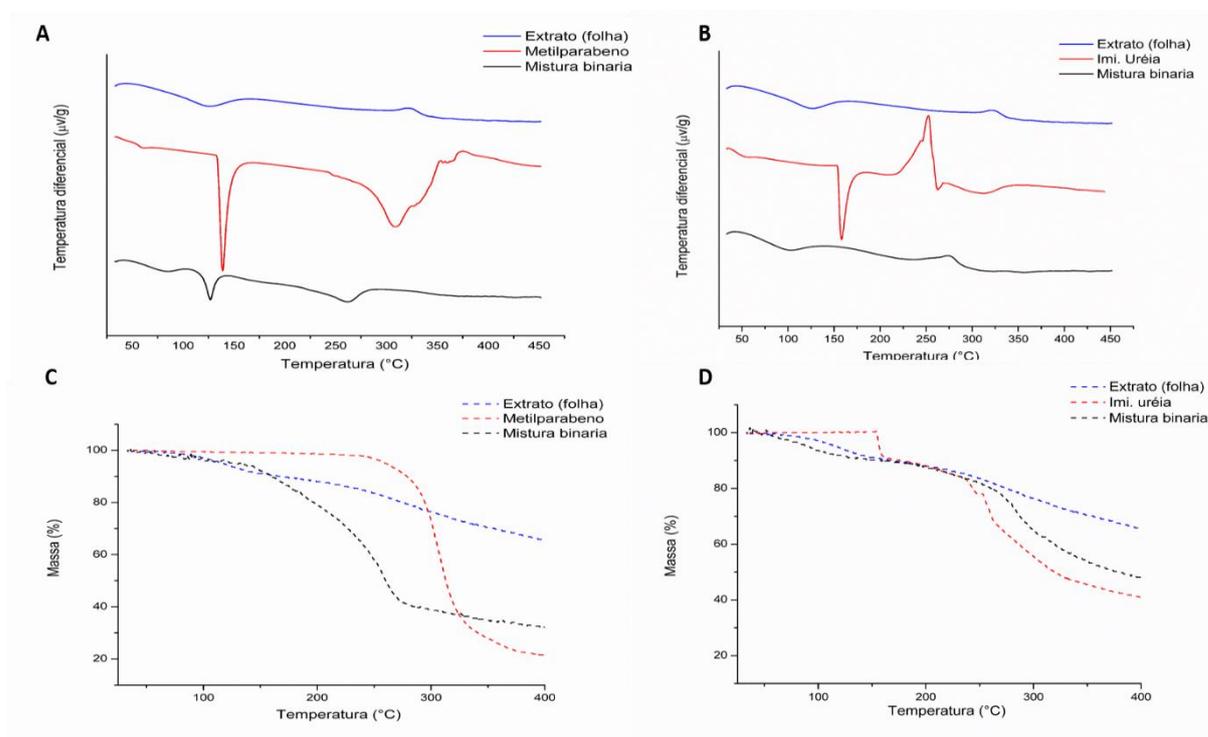
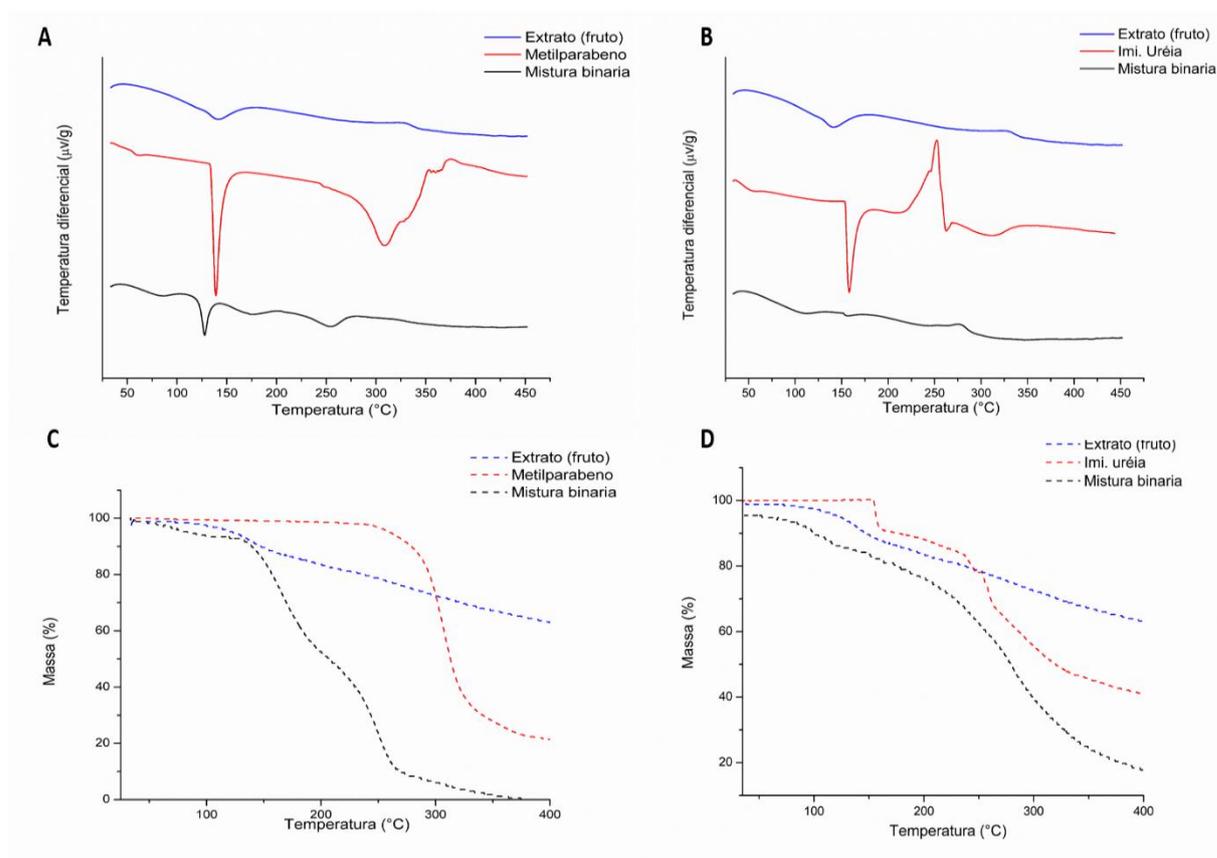


Figura 41 - Curvas DTA (A-Metilparabeno e B-Imidazolinidil uréia) e TG (C-Metilparabeno e D-Imidazolinidil uréia) do extrato obtido dos frutos de *M. charantia* com os agentes conservantes.



#### 5.4.2 Caracterização das formulações

Com a definição descrita pelo estudo de compatibilidade desenvolveu-se duas formulações para uso tópico em forma de gel. Na primeira formulação utilizou-se como ingrediente ativo o extrato obtido das folhas e na segunda formulação o extrato obtido dos frutos, sendo denominadas de FEP e FEF, respectivamente.

##### 5.4.2.1 Características organolépticas, determinação do pH, estresse térmico e centrifugação

A formulação FEP apresentou coloração verde escura (figura 41A) com odor característico do extrato das folhas de *M. charantia* não havendo ocorrência de separação de fases. Após o período de 24 horas o gel mostrou-se estável macroscopicamente, sem ocorrência de precipitação, turvação ou separação de fases, com coloração e odor dentro da normalidade (tabela 48).

A coloração marrom clara foi observada na formulação FEF (figura 41B), com odor característico do extrato dos frutos de *M. charantia*. Nessa formulação também não ocorreu separação de fases e o gel mostrou-se em análise macroscópica, com ausência de precipitação turvação ou separação de fases e permanência da coloração (tabela 49).

Figura 42 - Aspectos Macroscópicos dos géis produzidos com os extratos das folhas (A) e do fruto (B).



**A**



**B**

Tabela 48 - Resultados dos parâmetros avaliados após 24 horas, estresse térmico e após centrifugação do gel obtido com os extratos das folhas. Os resultados de pH e condutividade das amostras estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros	Após 24 horas	Após centrifugação	40°C	50°C	60°C
Aspecto	SA	SA	SA	AS	SA
Cor	SA	SA	SA	AS	SA
Odor	SA	SA	SA	AS	SA
pH	6,02 $\pm$ 0,01	5,99 $\pm$ 0,02	6,01 $\pm$ 0,10	6,03 $\pm$ 0,14	6,00 $\pm$ 0,05

**Legenda:**SA: sem alteração.

Tabela 49 - Resultados dos parâmetros avaliados após 24 horas, estresse térmico e após centrifugação do gel obtido com os extratos dos frutos. Os resultados de pH e condutividade das amostras estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros	Após 24 horas	Após centrifugação	40°C	50°C	60°C
Aspecto	SA	SA	SA	AS	SA
Cor	SA	SA	SA	AS	SA
Odor	SA	SA	SA	AS	SA
pH	6,05 $\pm$ 0,06	6,04 $\pm$ 0,03	6,01 $\pm$ 0,02	6,03 $\pm$ 0,04	6,04 $\pm$ 0,05

**Legenda:**SA: sem alteração.

Para a determinação de pH do branco foi preparado uma amostra de gel sem adição dos extratos, apresentando pH de 5.5. Nas amostras de gel com os extratos incorporado, o pH da formulação ficou em torno de  $6,0 \pm 0,0330$  permanecendo em conformidade com o preconizado no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012), pois a faixa de pH ideal para géis é de 5,5 a 6,5 compatíveis com o pH cutâneo e devem ser usados como critério de estabilidade de formulações tópicas (SILVA et al, 2013). Na análise de variância estatística aplicada as leituras de pH após 24 horas, considerando  $P < 0,05$ , foi verificado que o F calculado (0,1) foi menor que o F crítico (6,50) sugerindo que não houve diferença significativa estatística e que as médias são equivalentes. Os resultados de pH estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão nas tabela 48 e 49

Com relação a estabilidade após a centrifugação e estresse térmico, foi possível avaliar que não houveram mudanças na aparência dos géis, permanecendo homogêneos, sem separação

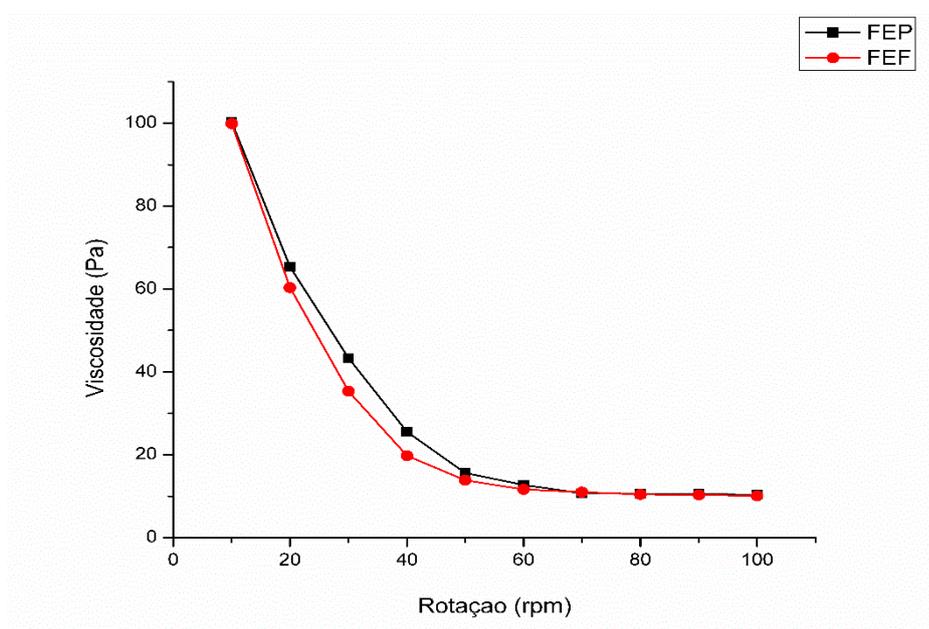
de fases ou precipitação, com cor e odor dentro da normalidade. As leituras de pH após o processo de centrifugação não apresentaram variações significativas ( $P < 0,05$ ). Os valores de pH após estresse térmico mantiveram-se dentro da faixa recomendada, nas temperaturas avaliadas.

O pH cutâneo é um parâmetro muito importante envolvido na eficácia de um sistema de liberação de fármacos em nível de utilização tópica, apresentando uma significativa associação. O valor do pH influencia, ainda, a carga elétrica na superfície da pele e do polímero, logo pode afetar a interação entre o gel e a pele. Sendo assim o ajuste do pH é válido no sentido de garantir uma boa adesão da formulação ao local desejado. Portanto, de acordo com os valores de pH evidenciados as formulações apresentam-se coerentes com a utilização tópica (EDSMAN E HAGERSTROM, 2015).

#### 5.4.2.2 Viscosidade

A viscosidade dos géis pode ser observada na figura 42 o reograma apresentou uma variação da viscosidade com o aumento progressivo e regressivo da velocidade de rotação do spindle, podendo ser observado que os géis estudados apresentaram comportamento pseudoplástico. Com os dados coletados é possível determinar a relação de estado reológico, indicando que os géis mostraram um comportamento característico de fluxo não newtoniano do tipo pseudoplástico, pois quanto maior a taxa de cisalhamento imposta, menor foi a viscosidade dinâmica aparente (NUNES, et al., 2012).

Figura 43 - Perfis das viscosidades obtidas nas formulações produzidas.



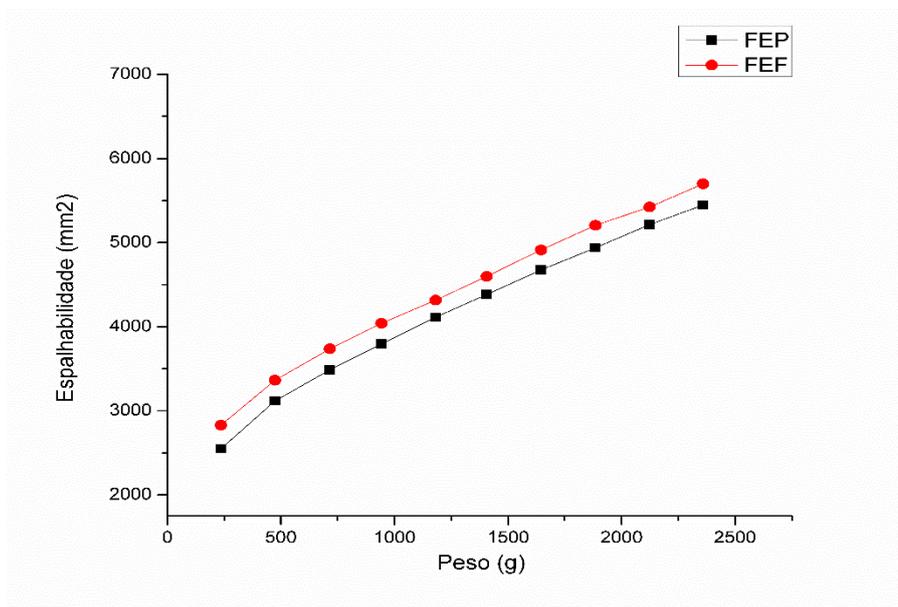
Além de se apresentarem como pseudoplástico as formulações apresentaram caráter tixotrópico. De acordo com Corrêa et al, 2005 o produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira ("shelf-life"), pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, tornando-se mais fluídas facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Por outro lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele.

#### 5.4.2.3 Espalhabilidade

O teste de espalhabilidade alicado é um teste que se baseia na resistência ao movimento forçado. Os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade (CORDEIRO et al., 2013).

Os testes de espalhabilidade realizados mostraram que a relação entre as áreas e o esforço-limite duas formulações foram estatisticamente iguais (Figura 43). Ou seja, os tipos de extratos utilizados não foram determinantes para a espalhabilidade da forma farmacêutica.

Figura 44 - Espalhabilidade dos géis em função do peso adicionado.



Os dados referentes à espalhabilidade são importantes pois determinam modificações na área de abrangência do produto, podendo facilitar ou dificultar aplicação do mesmo. Assim se a formulação produzida tiver melhores características reológicas, ela poderá ser utilizada com maior aceitabilidade no momento de sua aplicação sobre a pele lesada e em menor quantidade, levando a uma redução do consumo dessa preparação com a mesma eficácia terapêutica (BORELLA et al., 2010).

#### 5.4.3 Avaliação preliminar da estabilidade

Antes de iniciar o estudo de estabilidade preliminar os produtos foram submetidos ao teste de centrifugação, estresse térmico, análise das características organolépticas, avaliação da viscosidade e determinação da espalhabilidade, onde os resultados são demonstrados nos itens anteriores, correspondendo aos dados do início (T0) do ciclo.

Em relação as características organolépticas não houve alteração nos aspectos macroscópicos das duas formulações, assim como as duas formulações mantiveram ao fim dos 12 dias as colorações e o odor característicos dos extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*.

Os resultados correspondente a pH não apresentaram alterações significativas como pode-se observar na tabela 50.

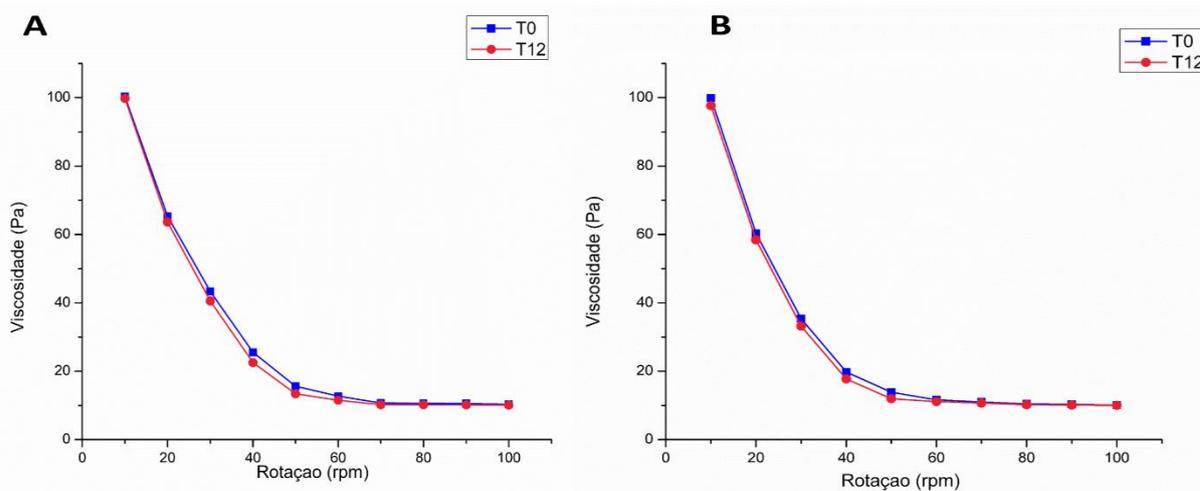
Tabela 50 - Determinação do pH e densidade, no início e término do ciclo de 12 dias.

<b>Formulações</b>	<b>T0 (Início)</b>	<b>T12 (Final)</b>
FEP	6,02 ±0,01	5,99 ±0,04
FEF	6,05 ±0,03	6,02 ±0,03

**P<0,05.**

Em relação a viscosidade observou-se que não houve variação significativa desse parâmetro nas duas formulações apenas uma pequena diminuição dos valores no final do 12º dia. Porém, o perfil de viscosidade permaneceu o mesmo do T0 (figura 44).

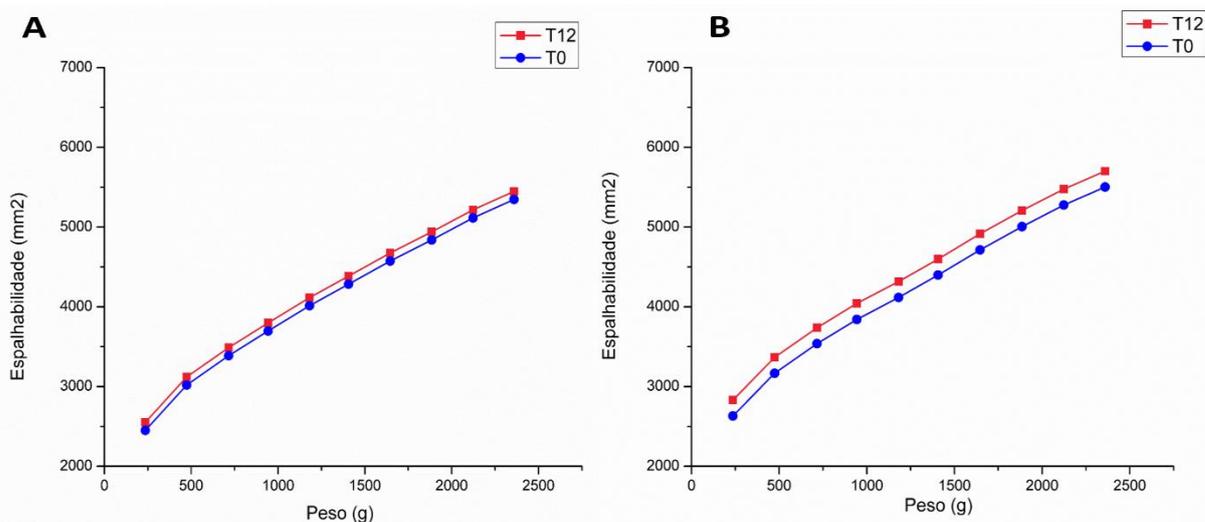
Figura 45 - Perfis das viscosidades obtidas nas formulações produzidas no início e fim do ciclo de 12 dias. A- FEP; B-FEF.



Os resultados apresentados corroboram com o que afirma Cordeiro, 2013, pois o produto tixotrópico tende a ter maior prazo de validade, pois durante o período no qual o produto permanece em repouso, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação, garantindo a eficácia do umectante utilizado na formulação.

Os resultados de espalhabilidade apresentados nas formulações mostram a manutenção da espalhabilidade sem proporcionar escorrimento do produto no momento da aplicação, frente às condições de armazenamento no fim do ciclo de 12 dias (Figura 45).

Figura 46 - Espalhabilidade dos géis em função do peso adicionado no início e fim do ciclo de 12 dias. A- FEP; B-FEF.



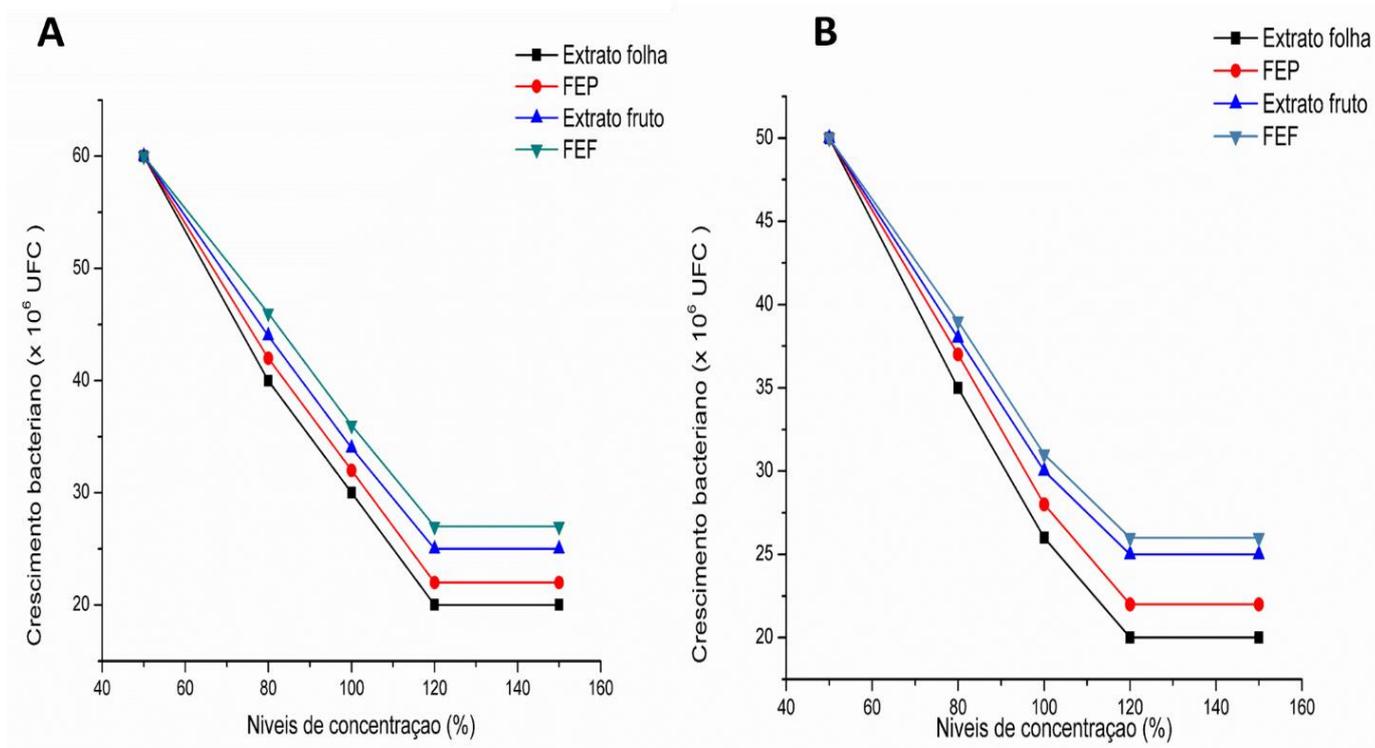
Ainda observou-se que na formulação FEF, houve um aumento da espalhabilidade maior do que o ocorrido na formulação FEP, todavia, não alterou as características reológicas da formulação, indicando boa estabilidade física das formulações no período estudado.

#### 5.4.4 Análise da eficácia da formulação

##### 5.4.4.1 Doseamento microbiológico

Observando a figura 46 percebe-se que as duas formulações obtiveram atividade antimicrobiana em função da concentração reduzindo o número de Unidades Formadoras de Colônias das duas bactérias em relação ao número de UFC do inóculo no momento da inserção dessas amostras. As formulações sem adição dos extratos (branco) não obteve atividade inibitória sobre os microrganismos.

Figura 47 - Curva quantidade de unidades formadoras de colônias nos inóculos bacterianos em função da concentração da substância de referência (extratos) e das amostras testes (formulações) frente a *S. Aureus* (A) e *E.coli* (B).



O paralelismo das retas das formulações em relação aos extratos foi confirmado, visto que todas as retas possuíam o mesmo coeficiente angular (a) na equação da reta ( $y = ax+b$ ) (Tabelas 51 e 52), sendo possível fazer uma relação de doseamento entre as concentrações dos padrões (extratos) e amostras (formulações), calculando assim a potência antimicrobiana das formulações em relação aos extratos.

Tabela 51 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos extratos e das formulações frente a *S. aureus*.

<b>Amostras</b>	<b>Coeficiente angular (a)</b>	<b>Coeficiente Linear (b)</b>	<b>Coeficiente de correlação (<math>r^2</math>)</b>
Folha	0,550	75,070	0,996
FEP	0,550	73,070	0,995
Fruto	0,550	80,070	0,994
FEF	0,550	72,019	0,996

Tabela 52 - Dados das equações das retas obtidas com os níveis 50, 100 e 200 das concentrações dos dos extratos e das formulações frente a *E. coli*.

<b>Extrato/ antimicrobiano</b>	<b>Coeficiente angular (a)</b>	<b>Coeficiente Linear (b)</b>	<b>Coeficiente de correlação (<math>r^2</math>)</b>
Folha	0,370	63,160	0,996
FEP	0,370	61,186	0,997
Fruto	0,370	65,200	0,995
FEF	0,370	63,27	0,993

Com os dados demonstrados na tabela 53 percebe-se que as formulações obtiveram valores de potência relativa dentro do especificado para produtos de origem vegetal (85-115%), de acordo com o Formulário Nacional de Fitoterápicos (2011).

Tabela 53 - Valores de potências percentuais das formulações em relação aos extratos contra *S.aureus* e *E. coli* apresentados no T0 E T12.

Microorganismos	Formulações	Tempo	
		T <sub>0</sub>	T <sub>12</sub>
<i>S. aureus</i>	FEP	94,56	92,23
	FEF	91,28	90,15
<i>E. coli</i>	FEP	94,89	93,56
	FEF	92,65	91,78

Observou-se ainda que não houve variação significativa do doseamento em relação ao tempo de 12 dias indicando boa estabilidade na eficácia microbiológica das formulações no período estudado (CORDEIRO et al, 2013).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização desse trabalho percebeu-se que com a metodologia de processamento das drogas vegetais utilizadas foi possível obter amostras das folhas e dos frutos em diferentes tamanhos de partículas na faixa micrométrica.

As infusões obtidas dos frutos e das folhas de *Momordica charantia* obtiveram atividade antimicrobiana contra os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*, obtendo valores de CIM menor do que 1mg/mL em todos os tamanhos de partículas. As amostras vegetais possuem citotoxicidade relativamente baixa uma vez que não foi possível determinar a E<sub>50</sub>.

As infusões obtidas apresentaram concentrações significativas de taninos, flavonóides e polifenóis totais, ocorrendo uma variação inversalmente proporcional nas concentrações de todos os metabólitos quantificados em função do tamanho de partícula, podendo essas drogas vegetais serem diferenciadas pela quantificação desses compostos. A caracterização das drogas vegetais obtidas de *Momordica charantia* foi específica de acordo com o tamanho de partículas através dos dados térmicos e cinéticos obtidos com a TG e DTA e os os dados de cromatografia. Isso foi evidenciado pela aplicação das técnicas de análise multivariada PCA E HCA nos dados obtidos. Esses resultados foram confirmados com dados obtidos através da RMN-H1 evidenciando que as quantidades de picos variaram de acordo com o tamanho de partícula da amostra vegetal.

Em relação aos extratos observou-se equivalências quanto aos dados termoanalíticos, cromatográficos e composição fitoquímica entre os lotes diferenciados dos extratos das folhas e dos frutos de *M. charantia*. Portanto, a aplicação dessas técnicas forneceu dados importantes que podem ser utilizados como parâmetro de controle de qualidade e reprodutibilidade das características lote a lote de isumos vegetais apresentando assim, grande relevância.

Para que um ingrediente ativo seja eficaz quanto a sua natureza antimicrobiana contra determinado microrganismo, é necessário que sua potência esteja dentro dos limites estabelecidos, de modo que forneça eficácia, segurança e qualidade. Sendo assim, na realização do doseamento de potência antimicrobiana dos extratos secos obtidos das folhas e dos frutos de *M. charantia* os resultados obtidos indicaram que o ensaio microbiológico do método de microdiluição oferecem boa precisão, exatidão, bem como uma curva de calibração apropriada sendo efetivo para doseamento microbiológico dos extratos nebulizados. Além disso, com a aplicação do método observou-se que os os extratos possuem uma potência similar ao padrão

nos mesmos níveis de concentração, frente a *S. aureus* e *E. coli* e que se apresentarm dentro das especificações.

Os estudos de compatibilidade extrato nebulizado/excipientes, por análise técnica mostraram que os excipientes Natrosol, Propilenoglicol e Imidazolidinil uréia utilizados na forma farmacêutica gel, apresentam indícios de compatibilidade com o extrato.

Foi perceptível ainda que as formulações produzidas a partir dos extratos e do estudo de compatibilidade obtiveram parâmetros de pH, viscosidade e espalhabilidade dentro dos especificados. Isso foi observado após 24 horas de obtenção da formulação e após 12 dias, caracterizando uma boa estabilidade das formulações nas condições empregadas e uma boa correlação dos ingredientes ativos (extratos) e os excipientes selecionados no estudo termoanalítico de compatibilidade.

Com o estudo realizado percebe-se a importância de trabalhos que mostrem o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, bem como a caracterização e padronização de seu insumo ativo, apontando indícios para a produção de produtos de origem vegetal que tenham comprovada a sua qualidade, segurança e eficácia.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, I. et al. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.51, p.155-161, 2001.
- AKKERMANS, S.; IMPE, J.F.V. Mechanistic modelling of the inhibitory effect of pH on microbial growth. **Food Microbiology**. v. 72, p. 214-219, 2018.
- ALAMA, S. et al. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.464-469, 2009.
- ALI, K et al. Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR based metabolomics. **Metabolomics**, v.9, p. 778-785, 2013.
- ALLEN Jr, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.
- ALMEIDA, H.S., et al. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. **Industrial Crops and Products**, v. 95, 2016.
- ALVES, L.R. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. Niterói-RJ: **Revista Virtual de Química**. v.5, n.3, p.450-451, 2013.
- ALVES, M. S. M. et al. Physicochemical and Phytochemical of *Arrabidaea chica* (H & B) Verlot. Leaf power and standardized tincture. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, n. 4, p.804-808, 2011.
- AMICO, S. C. et al. Efeito da incorporação de talco nas características térmicas, mecânicas e dinâmico-mecânicas de poliuretanos termoplásticos. **Revista Matéria**, v.16, n.1, p.597-605, 2011.
- ANDRADE, J., et al. Análise térmica aplicada ao estudo de materiais energéticos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, 952-956, 2007.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, v.48; n.3, p.541-553, 2014.
- ARAGÃO, C. F. S. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para a padronização de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl (milona)**. Tese de Doutorado. 225 p. João Pessoa-PB, 2002.
- ARAUJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.33, n.1, p.27-36, 2012.
- ARAUJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.33, n.1, p.27-36, 2012.

ARIF, T.; MANDAL, T. K.; DABUR, R. Natural products: Anti-fungal agents derived from plants Opportunity. **Natural Products in Medicinal Chemistry**, v.81, p.283–311, 2011.

ASSIS, J. P. et al. Avaliação biométrica de caracteres do melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.505-514, 2015.

AUGUSTIN, J. M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.72, p.435-457, 2011.

ÁVILA, P. H. et al. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16, p. 9790–9794, 2008.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.444-447, 2007.

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

BEGUM, S. et al. Triterpenes, a sterol and a monocyclic alcohol from *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v.44, p.1313–1320, 1997.

BEHERA, T. K.; SINGH, A. K.; STAUB, J. E. Comparative analysis of genetic diversity in Indian bitter gourd (*Momordica charantia* L.) using RAPD and ISSR markers for developing crop improvement strategies. **Scientia Horticulturae**, v.115, p. 209–217, 2008.

BELOIN, N. et al. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.49–55, 2005.

BENUCCI, I., et al. Inhibitory effect of ethanol, sulphur dioxide and proanthocyanidinic tannins on lysozyme antimicrobial activity in model wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73. p. 320-325, 2016

BERG J. M. T. & LUBERT J. **Bioquímica**. 6º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BLUM, A. et al. *Momordica charantia* extract, a herbal remedy for type 2 diabetes, contains a specific 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v.128; p. 51– 55, 2012.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p.218-225, 2014.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of carbopols gels in hydrophilic cosolvents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 115-130, 2004.

BORELLA, J.C., et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.193-197, 2010.

BOTELHO, T. S; LOURENCO, F. R ; PINTO, T.JA. Vancomycin Microbial Assay Using Kinetic-Reading Microplate System. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, p. 172-176, 2013.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, p.123–125, 2008.

BRANDÃO D.O., et al. Model Analytical Development for Physical, Chemical, and Biological Characterization of *Momordica charantia* Vegetable Drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução- RDC, nº 48, de 16 de março de 2010. **Dispões sobre normas de registro de medicamentos fitoterápicos.**

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 10, de 16 de março de 2010.** Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a ANVISA.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ( ANVISA). **Resolução- RDC, nº 899, de 29 de maio de 2003.** Dispões sobre o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução- RDC, nº 26, de 13 de maio de 2014.** Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

BRASIL, Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira.** 2º ed. Brasília, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.** Brasília: Anvisa, p.126, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde. 190 p., 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico.** Brasília, 35p., 2007.

BUDRAT, P.; SHOTIPRUK, A. Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. **Separation and Purification Technology**, v.66, p.125–129, 2009.

CAMELO, S. R. P. et al. Physicochemical Characterization and Quantification of Total Anthraquinones of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, p.2064-2070, 2012.

CAO, J. Q. et al. Two new cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. **Chinese Chemical Letters**, v.22, n.5, p.583–586, 2011.

CAO, JQ; ZHANG, BY; ZHAO, YQ. A New Cucurbitane Triterpene in Acid-treated Ethanol Extract from *Momordica charantia*. *Chinese Herbal Medicines*, v.5, n.3, p.234-236, 2013.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.326–342, 2010.

CARVALHO A. C. B. Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.7, p.6-16, 2012.

CAZEDEY, E.C.L.; SALGADO, H.R.N. A novel and rapid microbiological assay for ciprofloxacin hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n.5, p. 382–38, 2013.

CHANDRA e MEIJA. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.2, n.52, p.3583-9, 2004.

CHANG, C. et al. In vivo and in vitro studies to identify the hypoglycaemic constituents of *Momordica charantia* wild variant WB24. **Food Chemistry**, v.125, p.521–528, 2011.

CHATTERJEE, T., et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 299–306, 2015.

CHEN, J. C. et al. Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v.70, p.133–140, 2009.

CHEN, W. J.; HSIAO, L. C.; CHEN, K. K. Y. Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. **Process Biochemistry**, v.43, p.488–498, 2011.

CLSI. **Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo** v.25, n.1, 2017.

CORDEIRO, M.S.F., et al. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n.2, p.148-153, 2013.

CORRÊA, N.M., et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofilicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, 2005.

CORREIA, L. P. et al. Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.122, n.1, p.207–214, 2015.

CORREIA, L. P. et al. *Sideroxylon obtusifolium* herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.123, n.2, p.993-1001, 2015.

CORREIA, L. P. **Obtenção e Padronização Química e Bilógica de Pós de Plantas Medicinais de Diferentes Tamanhos de Partículas**. Dissertação de Mestrado. Recife-PE, 2011.

CORREIA, L.P. et al. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.111, p.1691–1698, 2013.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**. v. 30, n. 02, p. 481-487, 2007.

COSTA, R. S. et al. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.111, p.1959–1964, 2013.

COUTINHO, H. D. et al. In vitro screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L. *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira Biociência**, v.8, n.3, p.299-301, 2010.

CUINICA, L.; MACEDO, R. O. Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2017.

DAFALE, N.A., et al. Development and validation of microbial bioassay for quantification of Levofloxacin in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.5, n.1, p.18–26, 2015.

DANIEL, J. S. P., et al. Risperidone – Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochimica Acta**, v. 568, p. 148-155, 2013.

DE MELO, M.O.; CAMPOS, P.M. Técnicas para Avaliar a Hidratação e a Oleosidade da Pele. **Bioengenharia cutânea**. v.28, 2016.

DIRECT INDUSTRY. **Microplaca para ensayos de absorción**. Disponível em: <<http://www.directindustry.es/prod/eppendorf/product-22548-1479257.html>>. Acesso em 06 de março de 2018.

DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.06-08, 2009.

DZOYEM, J.P. et al. Antimycobacterial activity against different pathogens and selectivity index of fourteen medicinal plants used in southern Africa to treat tuberculosis and respiratory ailments. **South African Journal of Botany**, v.102, p. 70-74, 2016.

EDSMAN, K.; HAGERSTROM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 3–22, 2015.

EDWARD, J. Alternative antimicrobial approaches to fighting multidrug-resistant infections. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. **Academic Press**, v.1, p.1–8, 2013.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Revista Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.35-36, 2009.

ERMER, J.; JOHN H.; MILLER, M.; **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. 3ª Edição. Library, British, 2008.

ESMERINO, L.A. et al., Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Ciência Biologia e Saúde, Ponta Grossa**, v.10 n. 1 53-60, 2004.

FAHEINA-MARTINS, G.V. **Avaliação do Potencial Citotóxico das lectinas de Canavalia Ensiformis, Canavalia Brasiliensis e Cratylia Floribunda**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2009.

FANG, E. F. et al. The MAP30 protein from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v.324, n.1, p.66–74, 2012.

FARAGO, P. V. et al. Método Microbiológico para o Doseamento da Potência da Amoxicilina em Suspensões Orais. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 112-6, 2006.

FARIAS, M. R. et al. O Problema da Qualidade dos Fitoterápicos. **Caderno de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 73-82, 2008.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**, 5 ed., Editora Atheneu, 2010.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, 2006.

FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, v.3, p.2807-2913, 2012.

FERNANDES, L.C.N. et al. Classificação do biodiesel na região do visível. **Química Nova**. v. 03, n.02, p. 315-318, 2012.

FERREIRA, D. S. **Propiedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de chagas experimental- avaliação em fase aguda da infecção**. Tese de doutorado. São Paulo-SP, 2010.

FIGUEIREDO A. L. **Pirólise termoquímica de pós da fibra de coco seco em um reator de cilindro rotativo para produção de bio-óleo**. Dissertação de Mestrado. Natal-RN, 2011.

FRADE, J. C. et al. Chemotaxonomic application of Py-GC/MS: Identification of lacquer trees. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.89, p.117-121, 2010.

FRANCIOSO, O. et al. TG-DTA, DRIFT and NMR characterisation of humic-like fractions from olive wastes and amended soil, **Journal of Hazardous Materials**, v.149, n.2, p.408-417, 2007.

FRANCISCO, F.L., et al. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **Journal of Microbiological Methods**. v. 23, p. 1-30, 2014.

GINDRI, A. L.; LAPORTA, L. V.; SANTOS, M. R. Controle microbiológico de drogas vegetais comercializadas na região central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.563-570, 2012.

GOMES, R. V. R. et al. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Revista Caatinga**, v.24, n.4, p.172-177, 2011.

GROVER J. K.; YADAV S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v.93, n.1, p.123-132, 2004.

GUIMARÃES G.P., et al., Thermoanalytical characterization of herbal drugs from *Poincianella pyramidalis* in different particle sizes. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**, 2017.

GUO, J., et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. **Acta Biomaterialia**, v. 72, p. 35-44, 2018.

GUPTA. D.; DUBEY. J.; KUMA. M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v.6, n.1, p.15-20, 2016.

GÜRBÜZ, I. et al. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.77-82, 2010.

GUZZI, S. **Desenvolvimento, Estudo de estabilidade e teste *in vivo* da formulação gel com extrato e fração enriquecida de *Kalanchoe Crenata* (Andrews) Haworth**. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Dissertação de Mestrado, 2011.

HASENCLEVER, L. et al. The Brazilian phytotherapies industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017

HOSSAIN, M. A. et al. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with aqueous extracts of *Momordica charantia* (karela) fruits. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, n.2, p.698-704, 2014.

HSU, C. et al. Wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract and its bioactive components suppress *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. **Food Chemistry**, v.135, p.976–984, 2012.

HUBERT, P., et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p.70 – 81, 2007.

HUI LIU, C. et al. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. **Food Chemistry**, v.118, p.751–756, 2010.

JABEEN, U.; KHANUM, A. Isolation and characterization of potential food preservative peptide from *Momordica charantia* L. **Arabian Journal of Chemistry**, Article in press, 2014.

JABRA-RIZK, M.A. et al., Effect of farnesol on *Stahylococcus aureus* Biofilm formation and antimicrobial susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1463-9, 2006.

JAIN, V et al. Standardized fruit extract of *Momordica charantia* L protect against vincristine induced neuropathic pain in rats by modulating GABAergic action, antimitotoxic, NOS inhibition, anti-inflammatory and antioxidative activity. **South African Journal of Botany**, v.97, p.123–132, 2015.

JOSEPH, B.; JINI, D. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.3, n.2, p.93-102, 2013.

KAVITHA, M.; BOBBILI, K. B.; SWAMY, M. J. Differential scanning calorimetric and spectroscopic studies on the unfolding of *Momordica charantia* lectin. Similar modes of thermal and chemical denaturation. **Biochimie**, v.92, p.58–64, 2010.

KEDE, M..P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. Ed. Atheneu. 1052, 2014.

KHARCHOUFI, S. Antimicrobial and antioxidant features of ‘Gabsi’ pomegranate peel extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p.345-352, 2018.

KOUASSI, P. A. Y. et al. New nitro-benzo[c]phenanthridine and indolopyridoquinazoline alkaloids from *Zanthoxylum atchoum*. **Comptes Rendus Chimie**, v.18, n.8, p.891-897, 2015.

KUEI LII, C. et al. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.227–233, 2009.

KUMAR, R. et al. Fruit extracts of *Momordica charantia* potentiate glucose uptake and up-regulate Glut-4, PPAR $\gamma$  and PI3K. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.533–537, 2009.

KUSUMA, I.W. et al. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Medicinal Plants Used by theBentian Tribe from Indonesia. **Food Science and Human Wellness**, 2015.

LEITE, R.S. et al. Standardization and Stability Evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* alemão obtained by spray drier. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.9. n.2, 2017.

LEONEL, M. F. V.; SOARES, C. D. V.; SIQUEIRA, A. L. Comparison of pharmacopeial statistical methods applied in microbiological assay for antibiotics potency determination using parallel lines and three-dose level. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, 2012.

LI, Y. et al. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.20, p.4316–4322, 2012.

LIM, H.P.; TEY, B.T.; CHAN, E.S. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin. **Journal of Controlled Release**, v.186, p.11–21, 2014.

LIMA, P. M. Avaliação da atividade de extratos de folhas De *Momordica Charantia*, *Auxemma Oncocalyx* e *Ziziphus Joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex Quinquefasciatus*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, 2008.

LIN, K.W., et al. Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. **Food Chemistry**, v. 127, n.2, 2011.

LIPNHARSKI, C., et al. Colonization by *S. aureus* increases the EASI and the number of appointments by patients with atopic dermatitis: cohort with 93 patients. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 88, n. 4, p. 518-21, 2013.

LOURENÇO, F. R.; PINTO, T. J. A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, n.3, p.573–584, 2011.

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Comparison of three experimental designs employed in gentamicin microbiological assay through agar diffusion. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 45, n. 3, 2009.

LOZIENE, K. et al. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.31, p. 249-259, 2003.

MA, M. M.; MU, T. H. Effects of extraction methods and particle size distribution on the structural, physicochemical, and functional properties of dietary fiber from deoiled cumin. **Food Chemistry**, v.1, p.237-246, 2016.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso- Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.45-47, 2004.

MACHADO, A. R. T. Pimenta. Total  $\alpha,\beta$ -Unsaturated- $\gamma$ -Lactone Acetogenins in *Annona muricata* by Proton NMR Spectroscopy. **Applied Magnetic Resonance**, v. 46, pp. 153-160, 2014.

MACHADO, F. L. S. et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.3, p.441-452, 2010.

MACHIDA, K; TANAKA, T. Farnesol induced generation of reactive oxygen species dependent on mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization mediated by. **Journal of Bacteriology**.v.462, n. 1, v. P. 108-112, 2009.

MADIGAN, M.T., et al. **Microbiologia de Brock. Artmed** - 14ª Edição. 2016.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; Methods in Molecular Biology, vol.393: **Plant Secondary Metabolites**. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.

MALHEIRO, L.F. et al. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.29, n.2, p. 195-205, 2017.

MANSUR C. R. E.; LUCAS E. F. Interação tensoativo/hidrotropo em sistemas aquosos, utilizando ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . **Química Nova**, v.24, n.1, p.47-54, 2001.

MARÇO et al. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v.31, n.5, p.218-223, 2008.

MAXIMIANO, FP.; COSTA, GH Y.; SOUZA, J. Caracterização Físico-Química do fármaco Anthichagastico Benzimidazol. **Química Nova**. v. 33, n. 8, 2010.

MEDA, A., et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v.91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MELO, E.K.S., et al. Análise e estudo viscosimétrico de diferentes géis de cetoprofeno 2,5%. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 95-99, 2013.

MENDONÇA, C. M. S., et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n.3, p. 2277-2285, 2014.

MENDONÇA, R.S.C; RODRIGUES, G.B.O. Principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia e Diagnóstico**, v. 24, n.1, p. 68-73, 2011.  
MERCLIN, N.; BRAMER, T.; EDSMAN, K. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p.57-65, 2004.

MIRANDA, G. S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MIURA, D.Y. **Desenvolvimento farmacotécnico e estudo de estabilidade de géis de papaína destinados ao tratamento de feridas.** Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos Para Saúde. Dissertação de Mestrado. 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

MONTGOMERY, D.; PECK, E.; VINING, G. **Introduction to linear regression analysis.** New Cork: Wiley Interscience Publication.641 p. 2001.

MULEY, B. et al. Anthelmintic activity of ethanolic and aqueous extracts of fruits peels of *Momordica charantia* (curcubitaceae). **International Journal of Herbal Drug Research**, v.1, n.4, p.10–13, 2012.

NANDHINI, A.; SUMATHI, C. Review: An Overview of herbals used in helminthiasis. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v.3, n.10, 2014.

NASCIMENTO, V. T. et al. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p. 56-64, 2008.

NATRAJAN, K., et al. Convective solar drying of *Vitis vinifera* & *Momordica charantia* using thermal storage materials. **Renewable Energy**. v. 112, p. 143-150, 2017.

NETO, H. S.; NOVÁK, C. S.; MATOS, J. R. Thermal analysis and compatibility studies of prednicarbate with excipients used in semi solid pharmaceutical form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 1, p. 367–374, 2009.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344- 350, 2009.

NUNES, L.C.C., et al. Desenvolvimento de gel vaginal contendo extrato de própolis vermelha. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 93, n. 2, p. 179-185, 2012.

OLIVEIRA E. J. et al. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of commercial samples of *Cymbopogon citratus* Stapf., Poaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.1, p.93–99, 2010.

OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

OLIVEIRA, M. A., GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria Farmacêutica. **Revista Química Nova**, v. 34, n.7, p.1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.2, p.301-307, 2009.

PAN, J. et al. Effect of Nitrogen and Fluorine Co-substitution on the Structure and Magnetic Properties of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **ChemPhysChem**, v.16, n.7, p.1502–1508, 2015.

PASSOS, A. A. et al. Obtenção de Nanocompósito de EVA/SÍLICA e Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido. **Polímeros**, v.21, n.2, p.98–102, 2011.

PEREIRA, B. S. et al. Atividade hepatoprotetora dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Momordica charantia* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.311-316, 2010.

PEREIRA, T.A. **Desenvolvimento e Estudo da Estabilidade de Gel com Extrato de *Matricaria Recutita* (L.) e Avaliação da Atividade Antiinflamatória Tópica Comparada com Gel de diclofenaco Sódico**. Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação de Mestrado, 2011.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 780 p., 2010.

PIRES S, MUSSEL W, YOSHIDA M. Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility between citalopram and excipients using thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.127, n.1, p. 535–42, 2017.

PIRES, C. et al. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica em Saude**. v.6, n.2, p. 45-50, 2015.

POPOVICH, D. G.; ZHANG, L. L. Bitter melon (*Momordica charantia*) triterpenoid extract reduces preadipocyte viability, lipid accumulation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.1619–1626, 2010.

PRAMYOTHIN P. et al. The protective effects of *Phyllanthus emblica* Linn. extract on ethanol induced rat hepatic injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.361-364, 2006.

PUGAZHENTHI, R. V. G.; KATIVA, V. Thermal degradation kinetics of sucrose palmitate reinforced poly(lactic acid) biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.65, p.275–283, 2014.

QUEIROZ. M.B.V. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *matricaria* (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. Universidade de Brasília. Programa De Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Dissertação de Mestrado, 2008.

QUIAO Y., et al., Dataset on preparation of the phosphorylated counterparts of a *Momordica charantia* protein for studying antifungal activities against susceptible dose-dependent *C. albicans* to antimycotics. **Data in Brief**, v. 15, p. 370–375. 2017.

RAMOS, S.V.V., et al. **Validação da metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade microbiológica de formas farmacêuticas líquidas e determinação da eficácia dos conservantes.** Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Tese de Doutorado, 2010.

REBELO, M. M., NASCIMENTO, L. D.; CORRÊA, J.A.M. Sílica gel obtida de escória de alto forno: Marabá, Pará (Silica gel obtained from blast furnace slag: Marabá, PA, Brazil). **Revista Cerâmica**, v. 61, p. 359-366, 2015.

RECHIA, L. M. **Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade de Gel a Base de Extrato de *Melissa Officinalis* L.** Universidade Federal de Santa Catarina. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação Em Farmácia. Dissertação de mestrado. 2010.

RIBEIRO, B. D. **Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira.** Tese de doutorado. Rio de Janeiro, 2012.

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

RODRIGUES, K. A. F. et al. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Caderno de Pesquisa**, v.17, n.2, 2010.

ROMERO, C. D. et al. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.2, p.253–257 , 2005.

ROOPASHREE, T.S. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: Cassia tora, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.1 n. 3, p. 20-28, 2008.

ROWE, R.C; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E.; **Handbook of Pharmaceutical excipients.** 6th ed. Chicago: AphA; 2009.

RUBIOLO, P. et al. Headspace-Solid-phase Microextraction Fast GC in Combination with Principal Component Analysis as a Tool to Classify Different Chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). **Phytochemistry Analytical**, v. 17, p. 217-225, 2006.

SALIH, M., et al. Lambert, Growth curve prediction from optical density data, **International Journal of Food Microbiology**, v.154, p.169–176, 2012.

SANTANA, C.P. et al. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.1, n.1, p.1–15, 2017.

SANTOS, C. Structural, textural and morphological characteristics of tannins from *Acacia mearnsii* encapsulated using sol-gel methods: Applications as antimicrobial agentes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 151, p. 26-33, 2017.

SANTOS, F.A. **Quimiometria aplicada à metabolômica de *Aldama La Llave*: Contribuições quimiotaconômicas e fitoquímica direcionada baseada em inibição de**

**cicloxiase-1 e 5- lipoxiase.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2014.

SAVIANO, A. M., et al. Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty. **Talanta**, v.127, p. 225–229, 2014.

SCHULZ, D. et al. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células vero. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n.2, 2009.

SEITÉ, S., et al. Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.25, n.5, p. 607-9, 2011.

SHAHZAD, Y., et al. The evaluation of coated granules to mask the bitter taste of Dihydroartemisinin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, 2011.

SHANA, B. et al. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidante activity. **Food and bioproducts processing**, v.90, p.579–587, 2012.

SILVA JÚNIOR, J. O. C., et al. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 671-677, 2006.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto De Biociências de Botucatu, 2010.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto De Biociências de Botucatu, 2010.

SILVA, S.A.M., et al. Análise da influência do agente umectante na estabilidade reológica e avaliação de cristais líquidos em formulações cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, n. 3, p.199 – 210, 2013.

SINGH, A.; SINGH, S. P.; BAMEZAI, R. *Momordica charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. **Toxicology Letters**, v.94, p.37–46, 1998.

SINGH, M.V., et al. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.89, v.2, 2008.

SLAVKOSKA, V. et al. Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. Ex Heuff. From the central part of the Balkan peninsula. **Phytochemistry**, v. 57, p.71-76, 2001.

SLAVOV, A. Physico-chemical characterization of water-soluble pectic extracts from *Rosa damascena*, *Calendula officinalis* and *Matricaria chamomilla* wastes. **Food Hydrocolloids**. v.61 p.469 e 476, 2017.

SOLANO, A. G. R., et al., Development of agar diffusion method for dosage of gramicidin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, 2011.

SOLANO, A.G.R. **Desenvolvimento de Métodos Microbiológicos para doseamento de Gramicidina Matéria-Prima**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte, 2010.

SOUZA, A.M. et al. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, parte I. **Química Nova**. v. 35, n. 01, p. 223-229, 2012.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.3, p. 217-222, 2010.

SWAIN R.A., et al. A five-year review of necrotising fasciitis in a tertiary referral unit. **Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 95. n.1, p.57-60, 2013.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006, p. 345–367.

TITA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, p.221–227, 2011.

TRAORE, M. S. et al. The malária coinfection challenge: Na investigation into the antimicrobial activity of selected Guinean medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p. 576–581, 2015.

TRAPLE, M. A. L. et al. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.1, p.1–5, 2014.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Rockville, 2001, 22p.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of natural products**, v.76, p.439-444, 2014.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERAS, G. et al. Classificação do biodiesel na região do visível. **Química Nova**. v. 03, n.02, p. 315-318, 2012.

WANG L. et al. Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.90, p.13–17, 2011.

WANG, Q.; WANG, H.; XIE, M. Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on staphylococcus aureus. **Archives of Microbiology**, v.192, p.893–898, 2010.

WESOŁOWSKI. M.; KONIECZYNSKI, P. Thermoanalytical, chemical and principal component analysis of plant drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 262, P. 29-37, 2003.

WU, W. H. et al. 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**, v.117, p306–311, 2009.

YALDIZ, G. Antimicrobial activity and agricultural properties of bitter melon (*Momordica charantia* L.) grown in northern parts of Turkey: a case study for adaptation. **Natural Product Research**, v.29, n.6, p.543–545, 2015.

ZHANG C., CHEN H., BAI W. Characterization of *Momordica charantia* L. polysaccharide and its protective effect on pancreatic cells injury in STZ-induced diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.115, 2018.

ZHANG, L.J., et al., Cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia* and their hypoglycaemic and cytotoxic activities. *Journal of functional food* s6, v.6, 2014.

ZHANG, Z.; ZHU, M.; ZHANG, D. Pyrolysis Characteristics of Cellulose Isolated from Selected Biomass Feedstocks using a Thermogravimetric Analyser. **Energy procedia**, v. 142. p. 636–641, 2017.

ZHAO, G. T. et al. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems and leaves of *Momordica charantia*. **Fitoterapia**, v.95, p.75–82, 2014.

ZHAO, G. T. et al. Cucurbitane-type triterpenoids from the stems and leaves of *Momordica charantia*. **Fitoterapia**, v.95, p.75–82, 2014.

ZOCOLER, A. M. D. et al. Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.1, p.22–27, 2006.

ZOCOLER, A. M. D. et al. Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.1, p.22–27, 2006.

## APÊNDICE A - Artigo publicado no Journal of Analytical Methods in Chemistry

Hindawi Publishing Corporation  
Journal of Analytical Methods in Chemistry  
Volume 2016, Article ID 7528297, 15 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7528297>



### Research Article

## Model Analytical Development for Physical, Chemical, and Biological Characterization of *Momordica charantia* Vegetable Drug

Deysiane Oliveira Brandão,<sup>1,2</sup> Geovani Pereira Guimarães,<sup>1,2</sup>  
Ravelly Lucena Santos,<sup>1,2</sup> Fernando José de Lima Ramos Júnior,<sup>1,2</sup>  
Karla Monik Alves da Silva,<sup>1,2</sup> Fabio Santos de Souza,<sup>1,2</sup> and Rui Oliveira Macêdo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, University City, Artur de Sá Avenue, 50740-521 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Unifal Laboratories of Pharmaceutical Development and Assays, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, Campus I, University City, 58059-970 João Pessoa, PB, Brazil

Correspondence should be addressed to Deysiane Oliveira Brandão; [deysiane\\_farmacia@hotmail.com](mailto:deysiane_farmacia@hotmail.com) and Rui Oliveira Macêdo; [rui\\_macedo@ccs.ufpb.br](mailto:rui_macedo@ccs.ufpb.br)

Received 3 February 2016; Revised 9 May 2016; Accepted 15 June 2016

Academic Editor: Eduardo DeLacasa

Copyright © 2016 Deysiane Oliveira Brandão et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Momordica charantia* is a species cultivated throughout the world and widely used in folk medicine, and its medicinal benefits are well documented, especially its pharmacological properties, including antimicrobial activities. Analytical methods have been used to aid in the characterization of compounds derived from plant drug extracts and their products. This paper developed a methodological model to evaluate the integrity of the vegetable drug *M. charantia* in different particle sizes, using different analytical methods. *M. charantia* was collected in the semi-arid region of Paraíba, Brazil. The herbal medicine raw material derived from the leaves and fruits in different particle sizes was analyzed using thermoanalytical techniques as thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA), pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry (PYR-GC/MS), and nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR), in addition to the determination of antimicrobial activity. The different particle surface area among the samples was differentiated by the techniques. DTA and TG were used for assessing thermal and kinetic parameters and PYR-GC/MS was used for degradation products chromatographic identification through the pyrograms. The infusions obtained from the fruit and leaves of *Momordica charantia* presented antimicrobial activity.

### 1. Introduction

The knowledge of traditional medicine and the use of medicinal plants are of fundamental importance in the development of new drugs by pharmaceutical companies because the plants, aside from their pharmacological applications, are likely to have low toxicity and are easy to access and of low cost [1]. In association with these facts, it must be considered that drugs already on the market are developing resistance to pathogens, causing serious problems for the world's population. Therefore, it is necessary to search for new

therapeutic alternatives to treat these infections and to derive these alternatives mainly from natural products [2].

In this context, *Momordica charantia* is a species popularly known as "bitter melon," "bitter melon," or "melão de São Caetano." This species is cultivated throughout the world and widely used in folk medicine, and its medicinal benefits are well documented, especially its pharmacological properties, including antimicrobial activities [3–5]. The extracts obtained from *Momordica charantia* fruit contain many biologically active metabolites including chemical glycosides, saponins, alkaloids, fixed oils, triterpenes, proteins, and steroids [3, 6].

Since this is a great source of plant phytochemicals, pharmacological and toxicological compounds may be tested and raw materials used for the production of a new herbal medicine with antimicrobial activity.

The market for herbal products is growing worldwide, but this increase is not reflected in the quality of available herbal medicines because there are major obstacles to effecting quality control, proof of safety, and proof of efficacy of herbal medicines. This is due to the chemical complexity of derivatives of vegetable drugs [7, 8].

Therefore, control of the granulometry of the powders from vegetable drugs is an important factor in the manufacturing process, as the particle size distribution is significantly influential in various stages of production [9]. In addition, in RDC number 26 of 13 May 2010, ANVISA [10] mentioned that one should consider the degree of reduction of particles in the case of medicinal teas or herbal drugs used as a final product by the consumer. Therefore, analytical methods have been used to aid in the characterization of compounds derived from plant drug extracts and their products.

In this sense, thermoanalytical techniques such as thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) are used for different purposes in pharmaceutical technology and are of fundamental importance in the characterization and thermal behavior of drugs such as those obtained from plant [11–14]. Pyrolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry (Pyr-GC/MS) is useful for elucidation of decomposition of complex volumes of organic molecules, such as in the case of vegetable drugs [15, 16]. Nuclear magnetic resonance,  $^1\text{H}$  NMR, has been applied successfully in several studies' fingerprinting, in which fingerprints of complex mixtures spectra under standard conditions are evaluated, since most organic metabolites contain the  $^1\text{H}$  isotope and have high natural abundance (99.98%) [17].

This paper developed a methodological model to evaluate the integrity of the vegetable drug *Momordica charantia* in different particle sizes, using different analytical methods in order to ensure the quality of the pharmaceutical plant's active ingredient.

## 2. Methodology

**2.1. Obtaining the Vegetable Drug.** *Momordica charantia* (leaves and fruits) was collected in the semiarid region of Paraíba, Brazil, in the countryside in São José da Mata, latitude  $7^{\circ}13'$  and longitude  $35^{\circ}55'$ , between December 2014 and January 2015, respecting the ideal time for collection. The voucher specimen was deposited in the Herbario Manuel de Arruda Câmara (ACAM), State University of Paraíba, under registration number EAN-257/ACAM, thus proving the authenticity of the plant.

**2.2. Preparation of Powder.** The leaves and fruit of the plants were dehydrated in an oven with circulating air temperature controlled at  $40^{\circ}\text{C}$ . The dried material was milled using a mill with four mobile knives and four fixed Wiley models, Marconi brand, coupled to a sieve of 10 mesh. The powdered plant drug was subjected to a system of sieves with different

pore sizes:  $>297\ \mu\text{m}$ ,  $\leq 297\ \mu\text{m}$ ,  $\leq 149\ \mu\text{m}$ , and  $\leq 74\ \mu\text{m}$ . The fruits sample was denoted as F1 ( $>297\ \mu\text{m}$ ), F2 ( $\leq 297\ \mu\text{m}$ ), F3 ( $\leq 149\ \mu\text{m}$ ), and F4 ( $\leq 74\ \mu\text{m}$ ) and the leaves sample was denoted as P1 ( $>297\ \mu\text{m}$ ), P2 ( $\leq 297\ \mu\text{m}$ ), P3 ( $\leq 149\ \mu\text{m}$ ), and P4 ( $\leq 74\ \mu\text{m}$ ).

**2.3. Thermogravimetry (TG) Analysis.** Dynamic thermogravimetric curves of the powders of plants in different particle sizes were obtained in a Thermobalance TGA-5011 model, Shimadzu, at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ranging from  $25^{\circ}\text{C}$  to a temperature of  $900^{\circ}\text{C}$ . We used an atmosphere of nitrogen and synthetic air with a flow of 50 mL/min and 20 mL/min, respectively. Mass used was  $5.00 \pm 0.05\ \text{mg}$ , and each sample was packaged in an alumina crucible. The calibration of the thermobalance was performed using calcium oxalate monohydrate. The graphs were analyzed using TASYs software WS 60, Shimadzu, to characterize the weight loss steps.

**2.4. Determination of the Kinetics of Degradation.** The kinetics of degradation of the drug obtained from plant fruits and leaves of *M. charantia* were obtained using thermogravimetric curves in synthetic air atmosphere (20 mL/min) under heating rates of 5, 10, 20, and  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Based on the data obtained in the gravimetric curves, we applied the Ozawa model to determine the kinetic parameters, reaction order ( $n$ ), frequency factor ( $A$ ), and activation energy ( $E_a$ ). For the determination of these parameters, we used TASYs software WS 60, Shimadzu.

**2.5. Differential Thermal Analysis.** Using the differential thermal curves, powders of plants in different particle sizes were obtained in a differential thermal analyzer, DTA-50, Shimadzu, at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ , varying from  $25^{\circ}\text{C}$  to a temperature of  $900^{\circ}\text{C}$  under an atmosphere of nitrogen, with flow of 50 mL/min. The samples were placed in an alumina crucible using mass of  $5.00 \pm 0.05\ \text{mg}$  for each sample. The calibration of the equipment was performed using melting point and enthalpy of indium and zinc as standards. The differential thermal curves were analyzed using the program TASYs 60, Shimadzu.

**2.6. Pyrolysis Coupled with GC/MS.** Pyrolysis was carried out using a pyrolyzer (Shimadzu, Pyr-4A), directly coupled to gas chromatography system/mass spectroscopy (Shimadzu GCMS-QP5050A). Capillary column with stationary phase was used: phenyl dimethylpolysiloxane (5:95) (30 m length, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 particle size). The interface temperature was  $70^{\circ}\text{C}$  and was increased by a rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $300^{\circ}\text{C}$  and then held for 5 minutes. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.7 mL/min and a split ratio of 1:5. The mass spectrometer was configured to scan a mass range from  $m/z$  50 to  $m/z$  450. The mass spectra were obtained by electron impact at an energy of 70 eV.

A sample consisting of a minuscule portion of powders of vegetal drugs was placed in a platinum crucible and introduced into the pyrolyzer at temperatures of 250, 350, and  $450^{\circ}\text{C}$ , selected according to the steps for displaying

thermodecomposition by thermogravimetric analysis of the samples. Chemical compounds produced in pyrolytic processes were identified using comparative analysis with the mass spectra library of Wiley, 6th Edition, for Class-500.

**2.7. Proton NMR Spectroscopy.**  $^1\text{H}$ -dimensional spectra were obtained using a Varian 500 MHz spectrometer with a sample of waste evaporated hydroethanolic extract (HSE) of vegetable drugs in different particle sizes, solubilized in deuterated DMSO ( $\text{DMSO-d}_6$ ). We then compared the intensities of the analytical signal in different particle sizes under the same extraction conditions.

Then, 5 mL of 50% hydroethanol solution was added. The assembly was subjected to extraction in an ultrasound bath (USC 2800A, Unique, Brazil) for 1 hour and then left to stand for 24 hours. The extractive cycle was repeated three times. Then, the material was filtered using cotton. The filtrate was placed in a porcelain capsule, and the solvent was evaporated in an oven with air circulation (ET 394/2, Tecnal, Brazil) at 40°C for 24 hours. At the end of the process, we were left with a residue which was solubilized in  $\text{DMSO-d}_6$  and subjected to analysis.

All spectra were manually corrected for phase and baseline and analyzed using the MestreNova® 6.0.2 software (Mestrelab Research). Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm).

**2.8. Determination of the Antimicrobial Activity.** To evaluate the antimicrobial activity, 5% infusions were obtained from different particle sizes of the fruits and leaves. Standard strains used included American Type Culture Collection (ATCC) of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), which were made available by the Oswaldo Cruz Foundation (Flocruz, RJ).

**2.8.1. Screening Microbiology.** The microorganisms were maintained in test tubes containing BHI agar and then grown in Holiday Rentals Abroad Hinton agar at 37°C for 24 hours. The determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was performed by broth microdilution method. It was performed in 96-well microplates according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) procedures [18].

The inocula were standardized into tubes containing 5 mL sterile 0.9% saline. The suspension was adjusted by spectrophotometer at 625 nm in a concentration equivalent to  $10^8$  UFC.

One hundred microliters of infusion of 5% (50 mg/mL) was subjected to serial dilution in Müller-Hinton broth in each microplate, thereby obtaining the following concentrations: 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, and 0.195 mg/mL in each infusion. Ten microliters of each microculture was added to each well of the microplate.

They were used as negative control, and distilled water was used as the positive control, gentamicin 80 mg/mL. The bacterial growth was indicated by addition of 20  $\mu\text{L}$  of aqueous resazurin (Sigma-Aldrich) 0.01%, with further

incubation at  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  for 2 h. Viable microorganisms reduced the blue dye to a pink color. Thus, the MIC was defined as the lowest concentration at which there was no change of color noted in the dye.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Thermogravimetric Analysis (TGA).** Thermal decomposition of the samples, both leaves and fruit, occurred in six stages when subjected to the synthetic air atmosphere at a heating ratio of 10°C/min. However, it was observed that the presence of synthetic air degradation of the vegetable drugs occurred more intensely, thus presenting a further step of degradation and a minor mineral residue in all the samples as compared to inert atmosphere at the same rate of heating (Figures 1 and 2).

In an oxidative atmosphere (synthetic air), thermal decomposition of the first event occurred at the following temperature ranges in the leaves: 35–103°C, 35–106°C, 35–109°C, and 35–116°C, with the following losses of mass: 6.7%, 7.3%, 5.6%, and 5.0% for P1, P2, P3, and P4 samples, respectively. The same event was observed when plants were subjected to an inert atmosphere, thereby obtaining the following temperature ranges: 35–96°C, 35–105°C, 35–106°C, and 35–107°C, for the following losses of equivalent mass: 3.3%, 6.9%, 6.1%, and 5.4%, referring to samples P1, P2, P3, and P4, respectively. For vegetable drugs obtained from the fruits of *Momordica charantia*, we observed similar events. Thus, this first stage of decomposition occurred in synthetic air at 35–108°C, 35–90°C, 35–89°C, and 35–116°C with the mass losses of 4.6% for samples F1 and F2 and 4.7% to 5.0% for F3 and F4, respectively, according to the same events as vegetable drugs were subjected to an inert atmosphere, thereby obtaining the following temperature ranges: 35–107°C, 35–108°C, 35–110°C, and 35–114°C for mass losses equal to 3.8%, 4.5%, 5.3%, and 4.4%, referring to samples F1, F2, F3, and F4, respectively.

The first step of thermal decomposition is to hallmark the loss of volatile products, mainly free water, as this event occurs in fusion tracks and with vaporization of the substance [19, 20]. These weight loss values are related to water, and the recommended level of water in the sample is less than 14% [21].

The second stage of thermal degradation is related to the loss of bound water in vegetable drugs. An increased mass loss was observed in vegetable drugs obtained from fruits (F1, F2, F3, and F4) with losses of 2.2%, 3.2%, 3.1%, and 4.0%, respectively, with respect to the obtained sheets (P1, P2, P3, and P4) with loss of 4.5%, 4.4%, 4.6%, and 4.0%, respectively. Almost the same events were observed in the two atmospheres evaluated, indicating that perhaps this degradation step does not depend on the atmosphere to which the vegetable drugs were subjected.

In plant drugs obtained from *Momordica charantia* leaves, the third stage in synthetic air introduced the maximum value of mass loss of 11.9%, occurring between 213°C and 285°C for sample P1, obtaining similar values in an inert atmosphere. For drugs derived from the fruit, the greatest mass loss in oxidative atmosphere occurred in sample F3

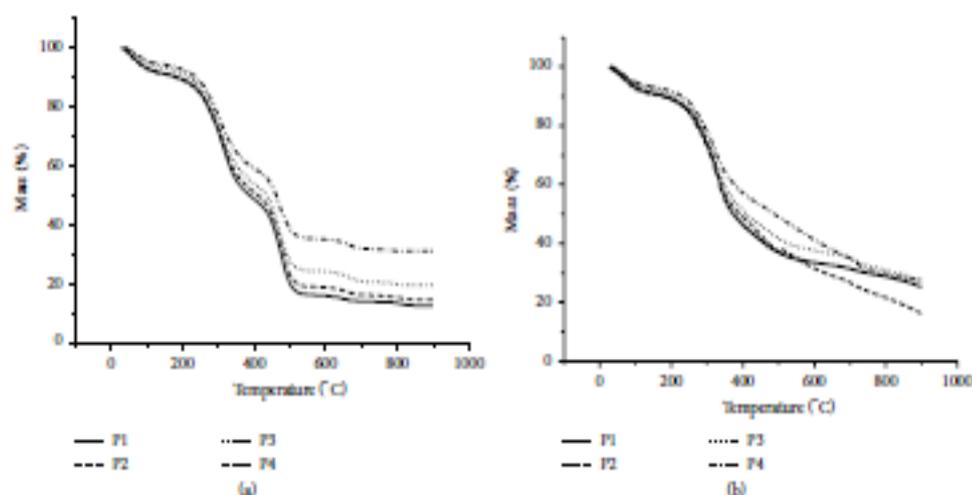


FIGURE 1: Drug *Momordica charantia* (leaves) TG curves in different particle sizes at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  in synthetic air (a) and inert atmosphere (b).

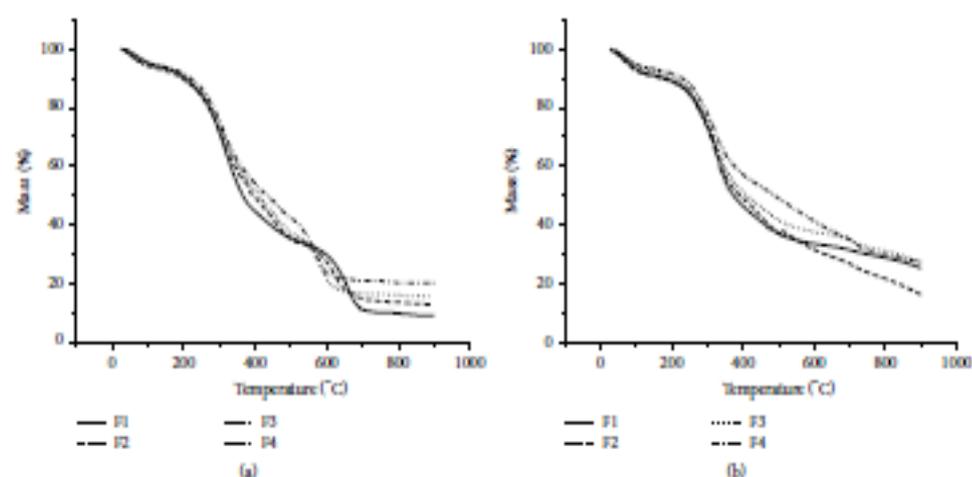


FIGURE 2: Drug *Momordica charantia* (fruit) TG curves in different particle sizes at a heating rate of  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  in synthetic air (a) and inert atmosphere (b).

between the temperature ranges of  $184^{\circ}\text{C}$  to  $267^{\circ}\text{C}$ , with 9.3% mass loss occurring when subjected to similar values in an inert atmosphere. It is suggested that in the decomposition there was no degradation of matrix components of the plant, only output samples of the constituents; there may have been a phase transition, such as volatilization, since similar profiles were obtained for vegetable drugs studied in two atmospheres [22].

The stage of degradation in which there was the greatest weight loss was the fourth step for all herbal drugs in the study. Thus, among the drugs of the obtained sheets that had

more significant degradation was P2 with a weight loss of 24.6% obtained between temperatures of  $270^{\circ}\text{C}$  to  $358^{\circ}\text{C}$ . For the fruit that had higher degradation at this stage, F1 was the highest, with mass loss of 35.9% between temperature ranges of  $251^{\circ}\text{C}$  to  $360^{\circ}\text{C}$ . This stage was regarded as the primary stage of thermal decomposition of all plant drugs. This event is likely associated with the thermal decomposition of carbohydrates and other organic compounds present in the species [23].

The thermal decomposition in the two profiles in similar atmospheres was evaluated in this step, as were samples

TABLE 1: Decomposition of the main parameters of the samples obtained from the degradation step leaves.

Sample	Rate (°C/min)	Onset (°C)	End (°C)	Weight loss (%)
P1	5	247,65	342,13	29,4
	10	285,06	347,95	20,95
	20	286,29	364,07	21,099
	40	291,74	374,78	23,68
P2	5	246,79	345,33	27,622
	10	270,67	358,18	24,601
	20	285,68	364,43	23,33
	40	228,11	377,00	25,461
P3	5	258,8	341,54	23,086
	10	267,41	352,54	23,145
	20	279,68	373,59	25,48
	40	315,01	387,98	19,111
P4	5	262,36	350,7	22,35
	10	264,9	355,38	21,994
	20	292,08	373,47	19,082
	40	298,77	376,04	21,825

obtained from the fruit and leaves and different particle sizes, thus suggesting the presence of the same chemical constituents of organic origin in all plant drugs.

The following steps represent the continuation of the degradation process with mineral residue formation in the end. The quantity of the mineral residue ranged from 18.3% to 37.0% for the samples obtained from the leaves and 10.2% to 37.0% for the samples obtained from the fruit. Also observed was variation according to particle size. The data demonstrate that mineral waste samples of leaves and fruits in different particle sizes can be used to indicate the integrity of the sample for each particle size differentiation. These results corroborate those found by Correta et al., 2016 [20].

**3.2. Kinetic Parameters Determination.** The fourth step was chosen as that in which the major weight loss in the thermal decomposition reaction process for all samples occurred and was used to calculate the kinetic parameters of the degradation using the Ozawa method. Data for this step are described in Tables 1 and 2.

Thus, thermogravimetric curves of all the samples were obtained following the heating rates 40, 20, 10, and 5°C/min. All curves were obtained using the oxidative atmosphere.

All samples demonstrated six thermal decomposition events. Increasing initial temperature of each event as a function of heating rate was observed. There was also displacement of the temperatures and mass loss according to particle size when heating for the same reason (Figures 3 and 4). The particles of smaller size (P4 and F4) had a smaller loss of mass, thus resulting in greater mineral residue.

This displacement may be associated with different chemical composition in each particle size. There are different heat transfer rates for each sample and there is different activation energy for degradation at each different size of

TABLE 2: Decomposition of the main parameters of the samples obtained from the degradation step fruits.

Sample	Rate (°C/min)	Onset (°C)	End (°C)	Weight loss (%)
F1	5	248,19	356,07	32,764
	10	251,66	360,03	35,974
	20	263,18	364,96	29,223
	40	295,15	393,36	28,788
F2	5	215,86	341,84	26,699
	10	270,67	344,99	24,985
	20	251,16	362,28	27,477
	40	275,13	369,21	27,185
F3	5	238,7	351,89	32,449
	10	267,22	380,08	28,589
	20	401,51	586,96	18,052
	40	407,77	587,98	19,111
F4	5	259,77	361,88	30,83
	10	343,61	393,11	24,842
	20	362,73	425,92	10,993
	40	401,51	527,7	34,756

TABLE 3: Thermal decomposition kinetic parameters (fruits and leaves).

	Kinetic parameters		
	Activation energy (kJ/mol)	Reaction order	Frequency factor (min <sup>-1</sup> )
F1	137,23	0	2,409 × 10 <sup>7</sup>
F2	132,35	0	1,376 × 10 <sup>8</sup>
F3	79,54	0	4,227 × 10 <sup>9</sup>
F4	64,71	0	6,112 × 10 <sup>7</sup>
P1	207,38	0	1,648 × 10 <sup>14</sup>
P2	180,81	0	2,867 × 10 <sup>12</sup>
P3	168,12	0	3,426 × 10 <sup>10</sup>
P4	88,71	0	3,265 × 10 <sup>8</sup>

particle [24, 25]. Different profiles of the drugs were obtained from the *M. charantia* leaves and fruit.

The greatest weight loss was observed in sample P1 when subjected to heating rate of 5°C/min, and this mass loss was equal to 29.4%, occurring between the temperatures of 247.65°C to 342.13°C. This greater weight loss can be associated with the presence in sample P1 of a greater amount of chemical constituents degradable at this temperature range. This was similar to the F1 sample at a rate of 10°C/min, which was the sample between herbal drugs obtained from fruits that demonstrated greater weight loss (35.974%) between 251.66°C and 360.03°C.

With the calculation obtained using the kinetic method of Ozawa, the same order of reaction for all samples was given, as shown in Table 3.

It was observed that the value of the activation energy decreases with decreasing particle size. This occurred both in the fruit samples obtained and in samples obtained from

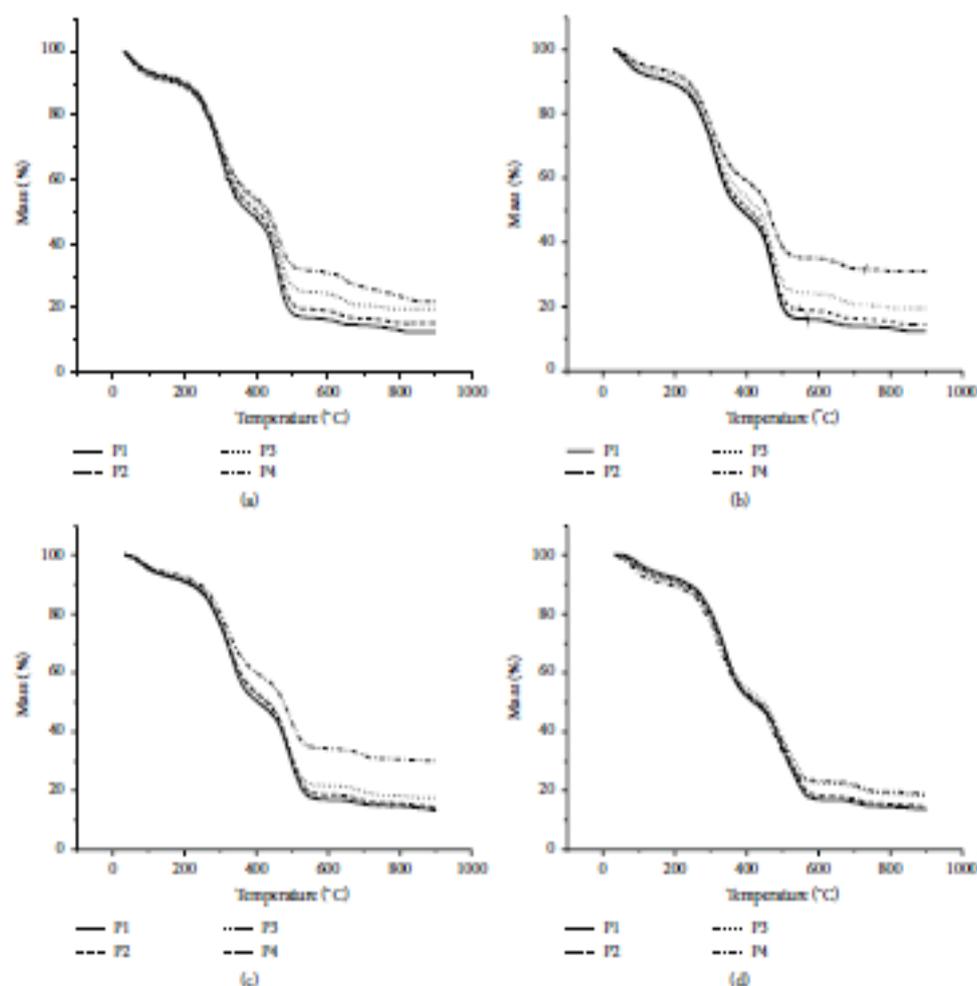


FIGURE 3: *M. charantia* (leaves) TG curves in different particle sizes. (a) Rate of 5°C/min. (b) Rate of 10°C/min. (c) Rate of 20°C/min. (d) Rate of 40°C/min.

the leaves. Thus, it was observed that the activation energy followed the order  $F1 > F2 > F3 > F4$  in the fruits and  $P1 > P2 > P3 > P4$  in the leaves. The activation energy is defined as the minimum energy required to cause chemical reactions, including cracking reactions of macromolecules [26]. Thus, this result was expected since the powders of samples with smaller particle size were characterized by having a larger surface area and were more unstable samples, therefore requiring lower activation energy for the reactions of thermodecomposition to occur [27].

**3.3. Differential Thermal Analysis.** The vegetable drugs obtained from the leaves of *M. charantia* when subjected to differential thermal analysis showed two exothermic events (Tables 4 and 5).

It was observed that the second event had higher energy release, thus suggesting that this event is related to a more significant weight loss. This suggestion is supported by correlating the data with the DTA curve of the TG curves, noting that this event with greater energy release occurred immediately after the greatest mass loss in the thermogravimetric analysis step. In this temperature range where there is degradation of aromatic and saturated carbon atom-linked structures, other breaches of hydrocarbon structures are present in large quantities in vegetable drugs [23].

Moreover, it was observed that in the second exothermic peak there was a proportional decrease in enthalpy as a function of the particle sizes; thus, the obtained sample P4 demonstrated lower enthalpy. This difference in energy values may be associated with the presence of macrocomponents

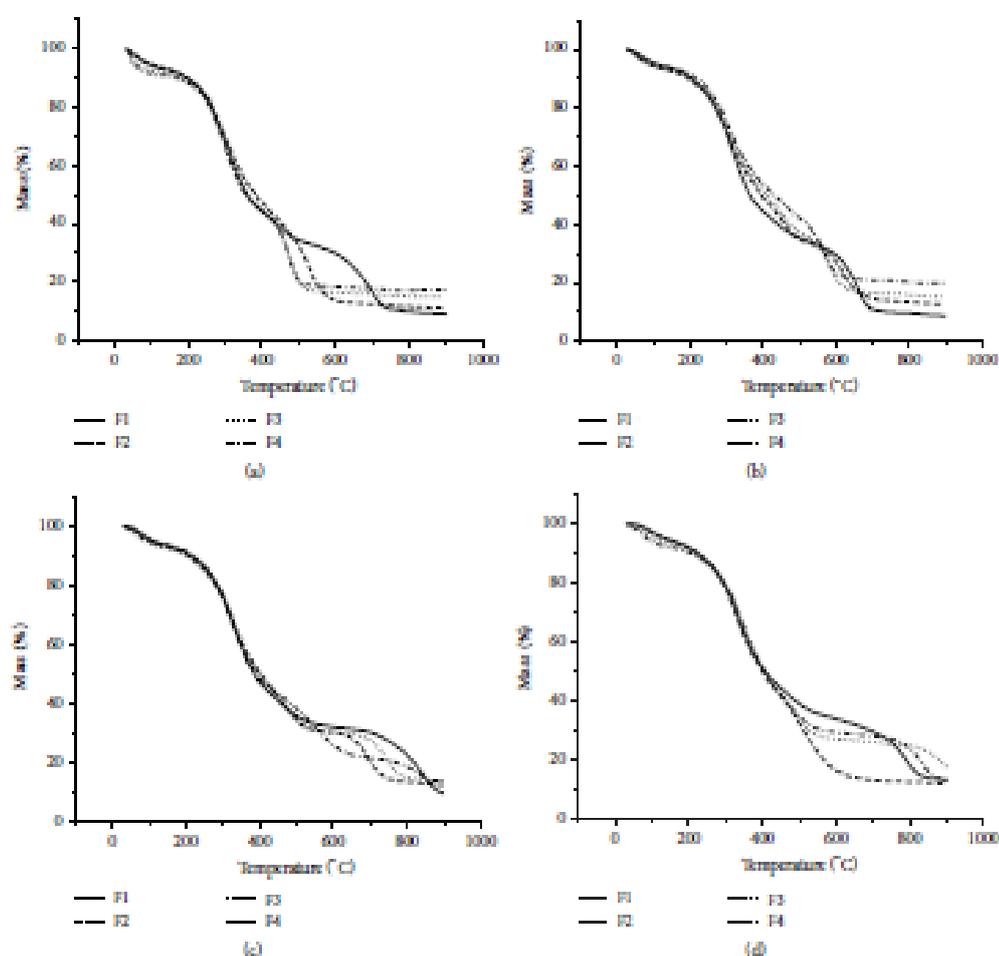


FIGURE 4: *M. charantia* (fruits) TG curves in different particle sizes. (a) Rate of 5°C/min. (b) Rate of 10°C/min. (c) Rate of 20°C/min. (d) Rate of 40°C/min.

such as cellulose and lignins which may occur in larger quantities in samples with larger particle sizes, thus requiring greater energy release in order to degrade these components [28].

For drug obtained fruit was observed of similar profiles (Table 5) in the DTA curves, thus presenting two exothermic peaks, the second event with greater enthalpy, correlating with the thermogravimetric curves where there is a greater mass loss.

The fruit vegetable drugs showed a higher enthalpy variation in the second event in accordance with the particle size; thus, F4 sample with the smallest particle size demonstrated lower enthalpy in this second peak.

**3.4. Pyr-GC/MS.** The data of TG curves demonstrates significant mass losses of vegetable drugs in the temperature

range 250°C to 500°C. In order to assess which degradation products were being released, the samples were subjected to the pyrolysis process at temperatures of 250°C, 350°C, and 450°C, representing the intermediate and initial temperatures of the thermal decomposition process. In Tables 6 and 7, the main compounds released during the stages of thermal degradation can be seen, analyzed using the library of Wiley, 6th Edition, for Class-500.

With the data in Tables 6 and 7, one realizes that the same components, in certain temperatures, were released from all fruit particle sizes and did not just occur in differentiation between drugs of different grain size in relation to the compounds analyzed. There were different intensity values and chromatographic peaks that varied according to particle size. The same thing happened with the herbal drugs obtained from the leaves (Figures 5 and 6).

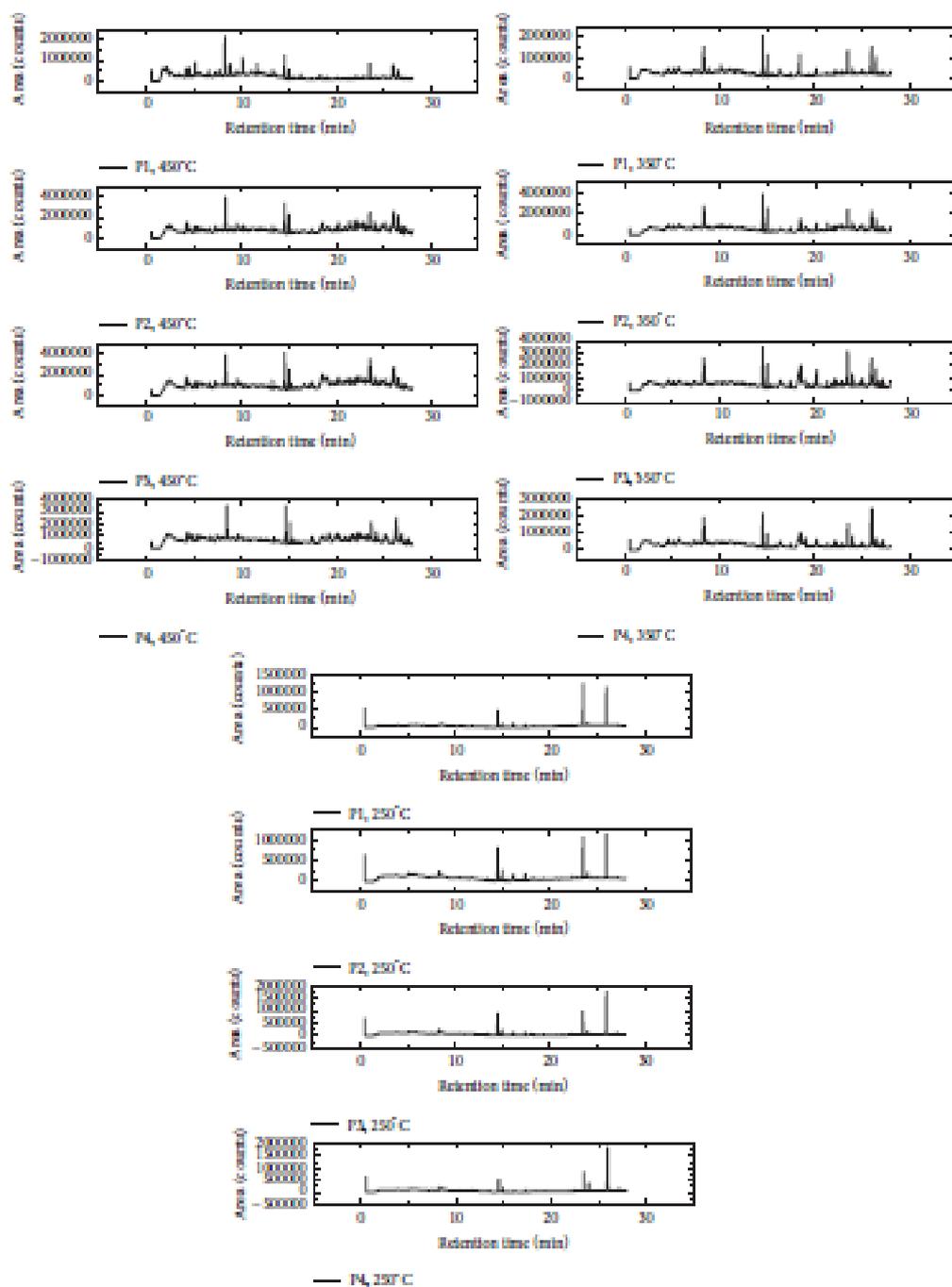


FIGURE 5: *Momentaria charantia* leaves pyrograms obtained in different particles sizes and at the temperatures of 250, 350, and 450.

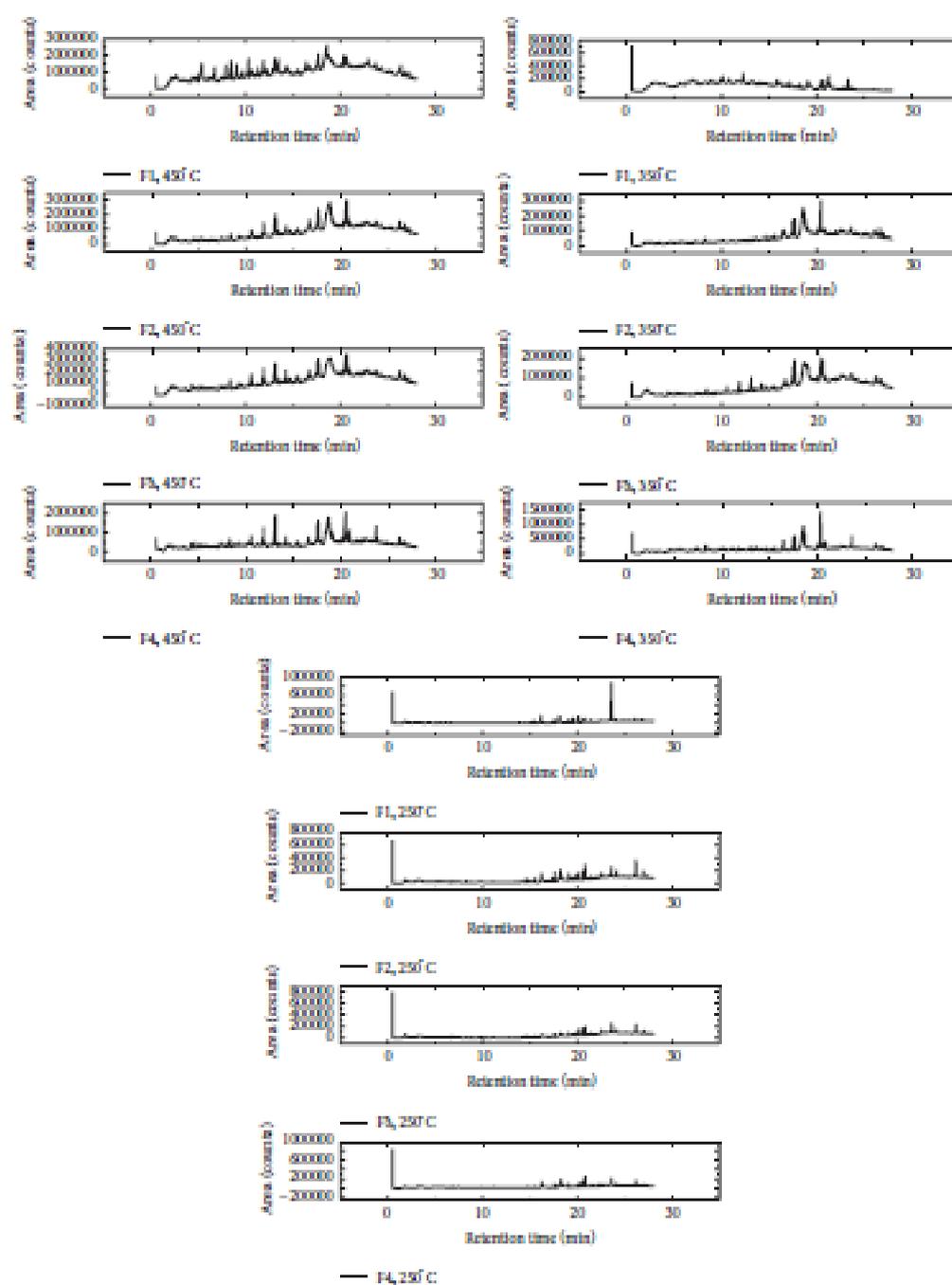


FIGURE 6. *Momordica charantia* fruits pyrograms obtained in different particles sizes and at the temperatures of 250, 350, and 450.

TABLE 4: Exothermic events of DTA (leaves).

Samples	Γ event		Z event	
	Temperature of peak (°C)	Enthalpy (kJ/g)	Temperature of peak (°C)	Enthalpy (kJ/g)
P1	305,86	0,464	456,90	4,8
P2	306,28	0,433	457,74	3,78
P3	328,21	0,445	457,26	3,42
P4	333,57	0,416	458,51	2,71

TABLE 5: Exothermic events of DTA (fruits).

Samples	Γ event		Z event	
	Temperature of peak (°C)	Enthalpy (kJ/g)	Temperature (°C)	Enthalpy (kJ/g)
F1	350,65	0,526	461,98	2,33
F2	353,79	0,521	462,34	2,24
F3	339,75	0,509	457,26	2,12
F4	336,96	0,505	458,51	1,46

Samples of leaves from the neophytadiene substance ( $C_{20}H_{38}$ ) were evident at all three temperatures, but with different areas, with higher values of area under the temperature of 450°C, and with 16.3 min retention time for retaining P1, 25.8 min for P2, 26.8 min for P3, and 27.2 min for P4. Other compounds also appeared to be highlighted in these samples, such as solanesol ( $C_{45}H_{90}O$ ), which was observed at temperatures of 350°C and 450°C, and myristic acid ( $C_{14}H_{28}O_2$ ) and limonene ( $C_{10}H_{16}$ ) evident at temperatures of 350°C and 450°C, respectively. Samples obtained from fruits submitted to 250°C had similar compounds that showed larger areas, including stearic acid ( $C_{18}H_{36}O_2$ ) and palmitic acid ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), highlighting retention times of 24.7 min for F1, 25.3 min for F2, 25.4 min for F3, and 25.8 min for F4, and showed palmitic acid for F1 at 26.0 min, 26.5 min for F2 and F3, and 26.6 min to 26.4 min for F4.

The stearic acid was also evident at a temperature of 350°C, but with a greater area at 22.3 min retention time for F1, 22.4 min for F2, 22.8 min for F3, and 22.9 min for F4. Besides this substance, myristic acid also achieved considerable intensity, appearing at 18.5 min retention time, 18.6 min, and 18.7 min, and 18.1 min for samples F1, F2, F3, and F4, respectively. At a temperature of 450°C, the substances with higher intensity were oleic acid, limonene, and eugenol, with greater intensity demonstrated in F1 retention time of 17.3 min, 10.1 min, and 14.1 min, respectively.

For purposes of quantitative analysis of the released compounds, the relative area of each substance in different particle size at each temperature was calculated. To calculate the relative area of similar peaks for the three samples, the sum of the areas of all the compounds analyzed was considered as 100%.

For the samples obtained from the leaves was verified through these percentages than sample whose particle size is smaller (P4) showed a area chromatographic smaller considering the compound neophytadiene ( $C_{20}H_{38}$ ) when related to particle sizes larger, noted this profile at the three temperatures analyzed. Various profiles of relative area were observed in other compounds.

With the obtained samples of the fruits, it was also observed that the sample with the smallest particle size (F4) was obtained on a smaller area peak when considering some compounds. At temperatures of 250°C to 350°C, this profile prevailed for compounds stearic acid and palmitic acid. In the 450°C temperature profile, it was observed that, in the compounds of palmitic acid and oleic acid, various profiles of relative area were observed in other compounds.

It was also observed that, at a temperature of 450°C, chromatographic peaks resulting from the pyrolytic process showed the presence of a large number of substances from the thermal degradation. At temperatures slightly less than this, a greater loss of mass thermal analysis (TG) and increase in the release of energy in differential thermal analysis (DTA) are expected. Thus, the degradation products are detected in larger amounts at this temperature.

Therefore, the results showed that the samples of *M. charantia* in different particle sizes can be differentiated by degradation pyrograms obtained at temperatures of 250, 350, and 450°C.

**3.5. Proton NMR Spectroscopy.** The characterization and structural elucidation, chemical modification, biological activity, and the study of bioactive metabolites of mechanism of action were always made after the purification of the metabolites. However, the processes for obtaining these compounds in pure form are very long and tedious. Thus, it is of great value to develop methodologies that are able to relate the information about the chemical composition of a crude extract [29].

Thus, the  $^1H$  NMR analysis was used in an attempt to highlight possible similarities and differences among the samples with respect to particle size. Thus, compared to the quantitative intensity of peaks in different particle sizes, in Table 8, we can see the number of peaks per chemical shift of the spectra of each sample.

The numbers of the peaks vary with each plant sample, showing that samples with smaller particle sizes provide more peaks. The variation in the amount of surge can be justified

Table 6: Identified substances obtained in different temperatures (M. chemnitzii leaves).

Temperature	Substance	Samples														
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10				
		Area	%	Rt. (min)	Area	%	Rt. (min)	Area	%	Rt. (min)	Area	%	Rt. (min)	Area	%	Rt. (min)
25°C	Neoplyadiene (C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> )	2850.242	45.87	25.8	2852275.0	44.90	26.8	565.273	4.28	27.2	2385.574	43.08	27.4			
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1543.060	25.47	23.2	1559.289	26.00	23.5	1539.281	26.58	24.6	15102.96	24.70	24.9			
	n-Hentriacontano (C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> )	980.024	15.08	12.8	974.583	16.23	12.9	944.215	16.47	13.4	988.271	16.60	13.6			
	Heptanoic (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	78729.4	126.7	34.3	789.247	12.82	8.1	798.458	12.75	8.2	7142.412	13.00	8.5			
	Neoplyadiene (C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> )	2903.443	24.38	26.1	2748.301	23.86	26.4	257.4290	22.78	26.7	2357.462	21.65	27.1			
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1780.529	14.95	23.4	1754.582	8.30	23.8	1758.962	8.59	24.2	1712.227	8.72	24.6			
	n-Hentriacontano (C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> )	12912.48	108.4	12.7	12632.66	10.91	13.1	1240.357	11.01	13.6	1205.281	11.07	13.8			
	Heptanoic (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	78.2491	65.7	15.1	785.274	6.57	15.4	740.394	6.52	15.7	714.292	6.26	15.9			
	Sedanol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	1862261	15.81	8.3	1862.397	16.05	8.5	1846.286	16.54	9.1	1826.265	16.80	9.3			
	Myristic acid (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	1090.284	9.15	17.8	1074.574	9.25	18.2	1047.285	9.27	18.3	1018.557	9.26	18.7			
360°C	Pyroguallol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	1284.425	10.78	18.8	1265.539	10.89	20.1	1248.297	11.26	20.5	1223.389	11.22	20.8			
	Oleic acid (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	893.254	7.50	16.1	876.290	7.54	16.3	854.291	7.56	17.1	837.294	7.59	17.2			
	Neoplyadiene (C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> )	2933237	20.35	26.1	2725283.1	16.49	26.3	2493273	16.73	26.8	2226203.8	16.80	27.3			
	Oleic acid (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	743.221	5.39	16.5	733.938	5.39	16.7	721.833	5.41	17.1	709216	5.60	17.6			
	Chloro- <i>n</i> -4-olecanol (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> Cl)	1191.382	8.20	22.1	1176.938	8.40	22.4	1144.829	8.58	22.6	1119.503	8.84	23.1			
	Carvacro (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	984.120	6.53	5.6	965.825	6.89	5.8	952.398	6.94	6.2	911.274	7.29	6.6			
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1589253	10.86	23.5	1566.390	11.20	23.8	1534.027	11.50	24.3	1515.958	11.96	24.8			
	Heptanoic (C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	692.385	4.77	14.7	674.572	4.82	15.1	655.239	4.91	15.5	622.398	4.95	15.8			
	Myristic acid (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	794.276	5.47	17.7	771.264	5.21	18.2	742.111	5.56	18.6	7164.52	5.67	19.1			
	Solanosol (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	2376224	17.76	16.6	2465.219	17.63	16.1	2296.146	17.23	16.5	2092.87	16.53	16.8			
450°C	Pyroguallol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	11942.41	9.46	18.5	1172.901	9.82	19.7	1143.205	10.07	20.2	1111.851	10.35	20.1			
	Limonene (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	882.298	6.08	13.2	861.276	6.38	13.7	834.273	6.27	13.9	819.375	6.47	14.1			
	m-Cresol (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O)	632.348	4.56	5.1	648.8271	4.63	5.2	629.112	4.71	5.7	618.283	4.80	6.1			

Rt. retention time.

Table 7: Identified substances obtained in different temperatures (M. charanta fruits).

Temperature	Substance	Series plus											
		F1 Area	F1 %	F1 Rt. (min)	F2 Area	F2 %	F2 Rt. (min)	F3 Area	F3 %	F3 Rt. (min)	F4 Area	F4 %	F4 Rt. (min)
25 °C	Stearic acid (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	1037.214	50.8	24.7	375.990	46.70	23.3	960.899	43.51	23.4	876.422	43.27	23.8
	Propionic acid (C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	5.08.254	21.7	16.2	501.543	24.78	16.5	491.701	24.78	16.6	424.876	23.44	16.9
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	54.6.521	16.9	26.0	32.3.987	16.01	26.5	331.887	15.07	26.6	29.956.3	8.22	26.4
	3-Methyl cyclohexanoic acid (C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	233.321	11.4	16.2	221.544	11.35	16.8	228.543	11.36	16.7	20.3742	21.08	16.9
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1011.543	22.91	23.4	10.01.257	21.65	21.8	987.213	21.37	24.2	939.458	35.72	23.9
350 °C	Phytol (C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O)	6.89.4.56	14.26	18.7	650.854	13.9.6	18.1	634.799	14.94	18.4	617.94.7	11.07	18.6
	Stearic acid (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	1876.675	36.80	22.4	1776.34.6	36.1.2	22.8	156.4.9.87	35.6.0	22.9	146.24.52	6.56	22.9
	Myristic acid (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	1.852.4.56	1.82	18.3	181.7.987	18.6	18.2	180.6.6.37	18.85	18.7	179.4.2.2	16.80	19.1
	n-Hexanoic acid (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> )	423.476	8.76	13.8	375.686	8.91	14.2	403.543	9.24	14.3	376.436	9.35	14.9
	Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1587.529	15.72	22.1	1573.4.78	15.56	22.5	1546.881	15.10	22.8	1515.876	14.62	24.2
450 °C	Cyclohexanol 3-methyl (C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O)	876.914	4.07	16.5	852.129	4.16	16.7	831.960	4.29	17.1	806.211	4.39	17.3
	Caproic acid (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> )	398.976	5.51	4.1	5.62.306	5.43	4.4	529.408	5.22	4.6	506.066	5.34	4.9
	Myristic acid (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	1798.940	16.57	18.5	176.43.07	16.91	18.8	1749.019	17.59	4.2	1700.0.93	17.63	19.6
	n-Decanoic acid (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> )	29.8.4.46	3.67	13.5	271.21.3	3.59	13.8	24.6.021	3.48	14.3	232.768	3.45	14.4
	Hexanoic acid (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> )	78.6.024	2.24	11.2	77.2.86.5	2.40	12.1	74.6.294	2.47	12.5	722.541	2.49	12.7
450 °C	Octic acid (C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	2.65.867	24.48	22.7	24.67.248	24.44	22.2	24.6.6.23	23.80	22.6	20.96.379	21.74	22.7
	Methyl pulegone (C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O)	689.1028	6.34	15.6	655.987	6.26	16.1	626.791	6.20	16.2	60.8.25.5	6.21	16.3
	Limonene (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	973.254	4.96	13.7	96.42.11	9.23	14.2	94.3.598	9.49	14.6	921.111	9.53	14.5
	Schizoneol (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O)	487.675	4.49	13.2	471.991	4.52	10.7	452.343	4.55	10.9	422.965	4.43	11.2

Rt. retention time

TABLE 8: More evident peaks in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of *Momordica charantia*.

Samples	Number of peaks by region				Total
	0,0–3,0 (ppm)	3,0–6,0 (ppm)	6,0–9,0 (ppm)	9,0–14,0 (ppm)	
F1	46	69	35	15	165
F2	47	71	41	18	177
F3	51	73	52	21	197
F4	58	78	55	22	213
P1	51	57	40	19	167
P2	59	64	49	21	193
P3	62	67	42	24	195
P5	66	71	41	25	203

by the presence and quantity of chemical compounds that can vary between samples, whereas the samples with smaller particle sizes can appear to have a greater amount of soluble substance in the used solvents (EtOH and deuterated DMSO) [30].

The peaks evident in the area of 0.0–3.0 can be attributed to the presence of aliphatic, methyl, and methylene groups, carboxylic groups, and amine and amide groups, while the region of 3.0–6.0 can be attributed to amino acid and compounds in the glycosylated region from 6.0 to 9.0, with aromatic and phenolic compounds [30].

It was also observed that the region where there were a larger number of peaks was the region 0.0–3.0 ppm. Some studies claim that various chemical compounds can be identified in this region, such as triterpene glycosides and steroids [30–32]. Studies are reported in the literature using the same technique and other more sensitive techniques which precisely identify such structures in *Momordica charantia*, both on leaves and on fruits [33–38]. There were also a greater number of drug peaks in this region obtained from fruits than in drugs obtained from leaves; there may therefore be a greater number of such structures in the *Momordica charantia* fruit.

**3.6. Determination of Antimicrobial Activity.** In the microbiological screening of *M. charantia*, the plant drug was found to show antimicrobial activity against standard strains of *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*, demonstrating that water is an effective solvent which can be used for the extraction of bioactive plant materials (Table 9). This information is important because, according to some studies [39], water is usually the primary solvent used in folk medicine to obtain preparations from plants. Many of these preparations are used to treat conditions which would normally result in bacterial infections.

In Table 9, the values of MIC of materials infused at concentrations below 1 mg/ml. for different bacteria, regardless of particle sizes, can be seen. However, there are differences in MIC values for the infused leaves among bacteria, with the more potent ones in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the less potent ones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The infused fruits showed MIC values with more power for *Escherichia coli*, followed by *Klebsiella pneumoniae*, and less potency in *Staphylococcus*

TABLE 9: Antimicrobial activity of plants tested against microorganisms.

Herbal drugs	MIC (mg/ml.)			
	Microorganisms tested			
<i>Momordica charantia</i> leaves	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>Pa.</i>	<i>K.p.</i>
P1	0,195	0,195	0,780	0,780
P2	0,195	0,195	0,780	0,780
P3	0,195	0,195	0,780	0,780
P4	0,195	0,390	0,780	0,780
<i>Momordica charantia</i> fruits				
F1	0,780	0,195	0,780	0,390
F2	0,780	0,390	0,780	0,390
F3	0,780	0,390	0,780	0,390
F4	0,780	0,195	0,780	0,390

*S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *Pa.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*.

*aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Particle sizes influenced only the microbial potency of *Escherichia coli*. Studies report varied chemical composition and pharmacological activity as a function of particle size [22, 28].

#### 4. Conclusions

The characterization of vegetable drugs obtained from *Momordica charantia* has been specified according to the size of particles through the thermal and kinetic data obtained from TG and DTA. Chromatographic data, in relation to the peak areas of the examined compounds, showed quantitative differences in the chemical composition of the fruit and leaves of *Momordica charantia*, as well as in different particle sizes.

These results were confirmed by data obtained by proton NMR showing peak quantities that varied according to the plant sample. Demonstrating the potential of proton NMR spectroscopy as an analytical tool with its characteristics, this is nonspecific, inexpensive, and not requiring long time for preparing the sample. This technique may thus have new applications and be a tool for characterization of raw samples.

The infusions obtained from the fruit and leaves of *Momordica charantia* presented antimicrobial activity against

*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*, obtaining lower MIC values than 1 mg/ml, in all particle sizes.

The methodological model developed was satisfactory to differentiate vegetable drugs in different particle sizes of leaves and fruits of *Momordica charantia*.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

- [1] M. S. P. Silva, D. O. Brandão, T. P. Chaves et al., "Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semi-arid northeast: contribution to the control of oral microorganisms," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 681207, 6 pages, 2012.
- [2] U. P. de Albuquerque, E. de Lima Araújo, A. C. A. El-Deir et al., "Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 205182, 18 pages, 2012.
- [3] J. K. Grover and S. P. Yadav, "Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 93, no. 1, pp. 123–132, 2004.
- [4] A. Braca, T. Siciliano, M. D'Arrigo, and M. P. Germanò, "Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil," *Fitoterapia*, vol. 79, no. 2, pp. 123–125, 2008.
- [5] H. D. Coutinho, J. G. M. Costa, J. P. Siqueira, and E. O. Lima, "In vitro screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Morinda arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L.," *Revista Brasileira de Farmacologia*, vol. 8, no. 3, pp. 299–301, 2010.
- [6] B. Joseph and D. Jini, "Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency," *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 3, no. 2, pp. 93–102, 2013.
- [7] V. T. Nascimento, E. U. Lacerda, I. G. Melo, C. S. A. Lima, E. L. C. Amorim, and U. P. Albuquerque, "Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Piperidella animum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espíndrea santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.)," *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 7, no. 3, pp. 56–64, 2008.
- [8] M. R. Farias, E. P. Schenkel, A. M. Bergold, and P. R. Petrovick, "O problema da qualidade de fitoterápicos," *Cadernos de Farmácia*, vol. 4, no. 2, pp. 73–82, 2008.
- [9] J. G. C. Silva Júnior, "Obtenção e avaliação de forma farmacéutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por sublimação de *Simplicium officinale* L. (Camfrú) [Doutorado em Farmácia e Medicamentos], Programa de Pós-Graduação em Farmácia e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2006.
- [10] Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brazil, Resolução-RDC, no. 10, de 16 de março de 2010. Disponível sobre a notificação de drogas vegetais junto a ANVISA.
- [11] A. C. D. Medeiros, L. P. Correia, M. O. D. S. Simões, and R. O. Macêdo, "Technological quality determination of pharmaceutical disintegrant by DSC cooling and DSC photovisual," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 88, no. 2, pp. 301–315, 2007.
- [12] A. H. de Oliveira, E. A. de Moura, M. E. Pinto et al., "Thermal characterization of raw material pentocifyline using thermo-analytical techniques and Pyr-GC/MS," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 108, no. 3, pp. 763–766, 2011.
- [13] J. L. Ford and T. E. Mann, "Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterization and selection," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 5, pp. 422–430, 2012.
- [14] Y. Guan, C. Wang, D. Wang et al., "High transparent polyimides containing pyridine and biphenyl units: synthesis, thermal, mechanical, crystal and optical properties," *Polymer*, vol. 62, Article ID 17622, pp. 1–10, 2015.
- [15] P. Kusch, V. Obst, D. Schroeder-Obst, W. Fink, G. Krupp, and J. Steinhaus, "Application of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for the identification of polymeric materials in failure analysis in the automotive industry," *Engineering Failure Analysis*, vol. 35, pp. 114–124, 2013.
- [16] H. Yang, Z. Huang, Y. Huang, W. Dong, Z. Pan, and L. Wang, "Characterization of Chinese crude propolis by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 113, pp. 158–164, 2015.
- [17] K. Ali, M. Iqbal, N. D. Yuliana et al., "Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics," *Metabolomics*, vol. 9, no. 4, pp. 778–785, 2013.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute, Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15 Suplemento Informativo, vol. 25, no. 1, 2012.
- [19] F. H. A. Fernandes, C. P. Santana, R. L. Santos et al., "Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 113, no. 2, pp. 443–447, 2013.
- [20] L. P. Correia, C. P. Santana, A. C. D. Medeiros, and R. O. Macêdo, "Sideroxylon obtusifolium herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 123, no. 2, pp. 993–1000, 2016.
- [21] G. L. B. Araújo, A. Pitaluga Jr., S. G. Antonio, C. O. P. Santos, and J. R. Matos, "Polimorfismo na produção de medicamentos," *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 27–36, 2012.
- [22] L. P. Correia, J. V. V. Proscópio, C. P. De Santana, A. E. O. Santos, H. M. De Medeiros Cavalcante, and R. O. Macêdo, "Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 111, no. 3, pp. 1691–1698, 2013.
- [23] R. S. Da Costa, C. A. B. Negrão, S. R. P. Camilo et al., "Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC," *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 111, no. 3, pp. 1959–1964, 2013.
- [24] B. Tija, A. Fulig, G. Barduz, E. Marian, and D. Tija, "Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, no. 2, pp. 221–227, 2011.
- [25] J. Pan, U. V. Waghmare, N. Kumar, C. O. Ehi-Iromosele, and C. N. R. Rao, "Effect of nitrogen and fluorine co-substitution on the structure and magnetic properties of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ," *ChemPhysChem*, vol. 16, no. 7, pp. 1502–1508, 2015.
- [26] R. Valapa, G. Pugazhenthi, and V. Katiyar, "Thermal degradation kinetics of sucrose palmitate reinforced poly(lactic acid) biocomposites," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 65, pp. 275–283, 2014.