



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LAÍS EMANUELLE BERNARDO VIEIRA

**ESTUDOS FARMACOBOTÂNICO, FITOQUÍMICO E PROSPECÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *Momordica charantia* L. E
Luffa cylindrica (L.) M. ROEM. FRENTES ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida spp.**

Recife
2019

LAÍS EMANUELLE BERNARDO VIEIRA

**ESTUDOS FARMACOBOTÂNICO, FITOQUÍMICO E PROSPECÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *Momordica charantia* L. E
Luffa cylindrica (L.) M. ROEM. FRENTE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Vieira, Laís Emanuelle Bernardo Vieira

Estudos farmacobotânico, fitoquímico e prospecção da atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. e *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. frente isolados clínicos de *Candida spp.* / Laís Emanuelle Bernardo Vieira - 2019.

93 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Karina Perrelli Randau

Coorientadora: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices

1. *Momordica charantia* 2. *Luffa cylindrica* 3. *Candida*

I. Randau, Karina Perrelli (orient.) II. Macêdo, Danielle Patrícia Cerqueira (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-125

LAÍS EMANUELLE BERNARDO VIEIRA

**ESTUDOS FARMACOBOTÂNICO, FITOQUÍMICO E PROSPECÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *Momordica charantia* L. E
Luffa cylindrica (L.) M. ROEM. FRENTE ISOLADOS CLÍNICOS DE
Candida spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em 21 de janeiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Perrelli Randau (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lilian Rodrigues Alves (Examinadora Externa)
Centro Universitário dos Guararapes

Dedico esse trabalho aos que me amam e verdadeiramente e que me tem como exemplo e espelho para trilhar seus caminhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado tantas alegrias e conquistas que sempre lembrarei e que foram importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

A UFPE e ao PPGIT pela oportunidade de realizar a pesquisa do mestrado numa instituição renomada e num programa de pós-graduação conceituado.

A Prof.^a Dr.^a Karina Perrelli Randau, pela orientação, paciência, ideias, conselhos. Por ter sido uma orientadora presente, que me proporcionou vivenciar experiências maravilhosas no período de convivência.

A Prof.^a Dr.^a Danielle Macêdo, por ter aceitado ser coorientadora e por disponibilizar o Laboratório de Análises Microbiológicas para a realização dos testes antifúngicos.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Josinalda Bernardo, pelas palavras de apoio e força. O exemplo de superação que me foi passado e sigo a orientação de vocês na melhor forma possível para o conforto de ambos.

A Douglas Felipe pela companhia e partilha de todos os dias dos meus sentimentos e pela paciência para que continuássemos em união e fortalecidos.

A Ianca Karine pelo apoio moral, paciência, escuta, pelo suporte na realização dos testes e pela amizade construída.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela disponibilidade em ajudar neste período do mestrado.

Aos meus ajudantes nas coletas, Severino Leonel da Mata Filho e Valdir Cavalcante soa Santos que não mediram esforços e disponibilizaram seus tempos livres para me acompanhar na busca pelas plantas.

A Ivanise Brito pelos momentos compartilhados, as decisões tomadas e pela amizade construída e duradoura.

A Rafaela Sá pela paciência, ensinamentos e orientações nos momentos de necessidade.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia, a Equipe da Botânica, ao Laboratório de Análises Microbiológicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas por terem me acolhido e auxiliado nas pesquisas.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Médica do Centro de Biociências pelo apoio quando necessário.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desta trajetória, intensa, de momentos maravilhosos, que fluíram para que esta pesquisa fosse realizada e o mestrado fosse concluído.

RESUMO

As infecções fúngicas ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* acometem pacientes imunocomprometidos e aqueles que usam antibióticos de amplo espectro. Para o tratamento são utilizadas drogas antifúngicas como os azóis, poliênicos e equinocandinas. Entretanto, estes fungos estão desenvolvendo resistência aos medicamentos disponíveis para a terapêutica levando ao insucesso do tratamento do paciente. Como novas perspectivas de agentes antifúngicos, as plantas medicinais estão sendo estudadas pela comunidade científica frente estes patógenos. *Momordica charantia* L. e *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem., pertencentes a família Cucurbitaceae, apresentam atividades anti-inflamatórias, antidiabéticas, antibacterianas e antifúngicas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antifúngica frente isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida*, a análise do perfil fitoquímico dos extratos das folhas e frutos de *M. charantia* e de folhas de *L. cylindrica* bem como a análise anatômica e histoquímica de *L. cylindrica*. Para isso foram obtidos os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas e frutos por meio de Soxhlet e realizado o perfil fitoquímico. Lâminas foliares, gavinha e pecíolo foram utilizados para análise de anatomia de *L. cylindrica* e cortes transversais de sua folha fresca para a histoquímica. Para atividade antifúngica utilizou teste de microdiluição em placa de 96 poços e o teste de sinergismo com isolados clínicos de *Candida* obtidas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A fitoquímica evidenciou triterpenos e esteroides, flavonoides, alcaloides, saponinas e mono e sesquiterpenos. A anatomia foliar evidenciou tricomas glandulares identificados pela primeira vez no pecíolo e a histoquímica identificou polifenóis, triterpenos, alcaloides, lignina. Quanto ao teste de microdiluição, os extratos das folhas de *M. charantia* apresentaram concentração inibitória mínima de 16µg/mL para o extrato hexânico e etanólico ao isolado de *Candida krusei*, os extratos dos frutos de *Momordica charantia* não apresentaram inibição do crescimento e os extratos das folhas de *L. cylindrica* apresentaram concentração inibitória mínima de 64µg/mL para o extrato hexânico, 32 µg/mL para o extrato de acetato de etila e 4 µg/mL para extrato etanólico ao isolado clínico de *C. krusei* e 4 µg/mL do extrato de acetato de etila e etanólico para o isolado clínico de *Candida glabrata*. O teste de sinergismo apresentou resultados de sinergia do extrato etanólico da folha de *M. charantia* para a cepa ATCC 22019, o extrato hexânico das folhas de *L. cylindrica* também para cepa ATCC 22019, extrato de acetato de etila para o isolado de *Candida parapsilosis* URM 7427 e o extrato etanólico para os isolados de *Candida parapsilosis* 7443 e 7427 e para a cepa ATCC 22019. Os resultados da fitoquímica dos extratos permitem verificar quais metabólitos

secundários estão presente nas espécies estudadas do município de coleta, a análise da anatomia e histoquímica de *L. cylindrica* contribuem para a correta identificação da planta bem como seu controle de qualidade e os resultados da atividade antifúngica evidenciaram que os extratos das folhas de ambas as espécies apresentaram ação frente os isolados clínicos testados.

Palavras-chave: *Momordica charantia*. *Luffa cylindrica*. Família Cucurbitaceae. *Candida*.

Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Fungal infections caused by yeasts of the genus *Candida* affect immunocompromised patients and those who use broad spectrum antibiotics. Antifungal drugs such as azoles, polyenes and echinocandins are used for the treatment. However, these fungi are developing resistance to medications available for therapy leading to failure of patient treatment. As new perspectives of antifungal agents, medicinal plants are being studied by the scientific community against these pathogens. *Momordica charantia* L. and *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem., Belonging to the family Cucurbitaceae, present anti-inflammatory, antidiabetic, antibacterial and antifungal activities. Thus, the present work aimed to evaluate the antifungal activity against clinical isolates of *Candida* yeasts, the phytochemical profile analysis of leaf and fruit extracts of *M. charantia* and *L. cylindrica* leaves as well as the anatomical and histochemical analysis of *L. cylindrica*. For this, the hexane, ethyl acetate and ethanolic extracts of the leaves and fruits were obtained by means of Soxhlet and the phytochemical profile was obtained. Leaf blades, tendril and petiole were used for anatomy analysis of *L. cylindrica* and cross sections of its fresh leaf for histochemistry. For antifungal activity, it was used a 96-well plate microdilution test and the synergism test with *Candida* clinical isolates obtained from the URM Micoteca of the Federal University of Pernambuco. Phytochemistry evidenced triterpenes and steroids, flavonoids, alkaloids, saponins and mono and sesquiterpenes. The leaf anatomy showed glandular trichomes identified for the first time in the petiole, and histochemistry identified polyphenols, triterpenes, alkaloids and lignin. As for the microdilution test, extracts from the leaves of *M. charantia* presented a minimum inhibitory concentration of 16 µg / mL for the hexanic and ethanolic extract to the *Candida krusei* isolate, the extracts of the fruits of *Momordica charantia* showed no growth inhibition and the extracts of the *L. cylindrica* showed a minimum inhibitory concentration of 64 µg / mL for hexanic extract, 32 µg / mL for ethyl acetate extract and 4 µg / mL for ethanolic extracts of the clinical isolate of *C. krusei* and 4 µg / mL of the ethyl acanthus extract and ethanolic extract for the clinical isolate of *Candida glabrata*. The synergism test showed synergistic results of the ethanolic extract of the leaf of *M. charantia* for strain ATCC 22019, the hexanic extract of the leaves of *L. cylindrica* also for strain ATCC 22019, extract of ethyl acetate for the isolate of *Candida parapsilosis* URM 7427 and the ethanolic extract for the isolates of *Candida parapsilosis* 7443 and 7427 and for the strain ATCC 22019. The results of phytochemistry of the extracts allow to verify which secondary metabolites are present in the studied species of the

municipality of collection, the anatomy and histochemical analysis of *L. cylindrica* contributes to the correct identification of the plant as well as its quality control and the results of the antifungal activity evidenced that the extracts of the leaves of both species presented action against the clinical isolates tested.

Keywords: *Momordica charantia*. *Luffa cylindrica*. Family Cucurbitaceae. *Candida*.
Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de teste de microdiluição em placa dos extratos de <i>M. charantia</i> e <i>L. cylindrica</i>	35
Figura 2 - Placa de 96 poços para a realização do teste de sinergismo.....	36
Figura 3 - Secção transversal de gavinha de <i>L. cylindrica</i>	42
Figura 4 - Secção transversal de pecíolo de <i>L. cylindrica</i>	43
Figura 5 - Secção transversal de pecíolo de <i>L. cylindrica</i> visão mais aproximada dos feixes vasculares.....	44
Figura 6 - Secção transversal da nervura central de <i>L. cylindrica</i>	44
Figura 7 - Secção transversal do mesofilo de <i>L. cylindrica</i>	45
Figura 8 - Secção paradérmica abaxial da lâmina foliar de <i>Luffa cylindrica</i>	46
Figura 9 - Secção paradérmica adaxial da lâmina foliar de <i>Luffa cylindrica</i>	47
Figura 10 - Análise histoquímica da lâmina foliar de <i>Luffa cylindrica</i>	48
Figura 11 - Teste de Sinergismo dos extratos de <i>L. cylindrica</i> e <i>M. charantia</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes antifúngicos comuns usados na terapia antifúngica.....	21
Tabela 2 - Identificação de metabólitos secundários, estruturas químicas e atividades de <i>Momordica charantia</i>	27
Tabela 3 - Metabólitos primários e secundários de <i>Luffa cylindrica</i>	30
Tabela 4 - Prospecção dos metabólitos secundários dos extratos brutos de <i>Momordica charantia</i> L. e <i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem.....	32
Tabela 5 - Reagentes utilizados para a o estudo histoquímico da lâmina foliar de <i>Luffa cylindrica</i>	33
Tabela 6 - Caracterização fitoquímica dos extratos de folha e fruto de <i>M. charantia</i>	37
Tabela 7 - Caracterização fitoquímica dos extratos brutos de <i>Luffa cylindrica</i>	38
Tabela 8 - Reagentes utilizados para estudo histoquímico, identificação e localização dos metabólitos primários e secundários.....	48
Tabela 9 - Espécies de leveduras utilizadas nos testes de atividade antifúngica.....	49
Tabela 10 - Atividade antifúngica de extratos brutos da folha de <i>Momordica charantia</i> frente isolados clínicos do gênero <i>Candida</i>	50
Tabela 11 - Atividade antifúngica de extratos brutos do fruto de <i>Momordica charantia</i> frente isolados clínicos de gênero <i>Candida</i>	50
Tabela 12 - CIM Extrato bruto de folhas de <i>Luffa cylindrica</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CYP	Citocromos P
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
LH	Extrato hexânico folha <i>L. cylindrica</i> .
LA.	Extrato acetato de etila folha <i>L. cylindrica</i>
LE	Extrato etanólico folha <i>L. cylindrica</i> .
FLH	Extrato hexânico folha <i>M. charantia</i> .
FLA	Extrato acetato de etila folha <i>M. charantia</i> .
FLE	Extrato etanólico folha <i>M. charantia</i> .
FRH	Extrato hexânico fruto <i>M. charantia</i> .
FRA	Extrato acetato de etila fruto <i>M. charantia</i>
FRE -.	Extrato etanólico fruto <i>M. charantia</i>
IRAS	Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde
MDA-MB-231	Célula epitelial de câncer de mama humano
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	<i>University Recife Mycologia</i>
WiDr	Adenocarcinoma de cólon humano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo Geral	18
1.1.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	INFECÇÕES FÚNGICAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> E RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS	19
2.3	PLANTAS MEDICINAIS	22
2.4	FAMÍLIA CUCURBITACEAE	24
2.4.1	<i>Momordica charantia</i> L.	24
2.4.2	<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem.	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	MATERIAL VEGETAL	31
3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	31
3.2.1	Extração a quente em Sistema Fechado - Aparelho Soxhlet	31
3.2.2	Caracterização dos extratos	31
3.3	ANATOMIA FOLIAR DE <i>Luffa cylindrica</i>	33
3.4	ESTUDO HISTOQUÍMICO DE LÂMINA FOLIAR DE <i>L. cylindrica</i>	33
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
3.6	REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS EM COLEÇÃO DE CULTURAS	34
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	34
3.7.1	Teste quantitativo de microdiluição em placa	34
3.7.2	Teste de Sinergismo dos extratos de <i>M. charantia</i> e <i>L. cylindrica</i> com fluconazol	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS	37
4.2	ANATOMIA FOLIAR DE <i>Luffa cylindrica</i>	42
4.3	ESTUDO HISTOQUÍMICO DA LÂMINA FOLIAR DE <i>Luffa cylindrica</i>	47
4.4	LEVEDURAS DE GÊNERO <i>CANDIDA</i> E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE <i>M. charantia</i> E <i>L. cylindrica</i>	49
4.5	TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA	50

4.6	TESTE DE TABULEIRO DE XADREZ	54
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA <i>PHARMACOGNOSY JOURNAL</i>	71
	APÊNDICE B - PUBLICAÇÃO EM ANAIS	84
	APÊNDICE C - 5º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA.....	85

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas datam de muitos anos atrás. Como principais agentes etiológicos causadores destas infecções estão as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* que, na década de 90, foram grandes preocupações nos países desenvolvidos por ocasionarem infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados em instituições de nível terciário no cuidado a saúde (KHARLOWSKY et al., 1997).

Estudos realizados para análise das infecções fúngicas relataram presença de 4725 infecções sistêmicas ocasionadas por espécies do gênero *Candida* em várias regiões dos Estados Unidos da América e o isolamento de 816 espécies em um hospital terciário no Canadá, subindo o *rank* de 13º para 4º maior patógeno relacionado a infecções sistêmicas ocorridas no âmbito hospitalar (EDMOND et al., 1999).

Outra pesquisa analisando o perfil de resistência das espécies de *Candida* evidenciou que a maioria dos isolados clínicos apresentava sensibilidade aos medicamentos utilizados, chegando em torno de 90% para fluconazol e itraconazol, entretanto o surgimento de organismos resistentes já era percebido, mas não atingiam mais que 20% dos isolados coletados (PFALLER et al., 1998).

Um dos motivos que levaram a comunidade científica a analisar estas leveduras é o caráter oportunista apresentado, atingindo pacientes debilitados, como os recém-transplantados que fazem uso de imunossupressores, aqueles em tratamento de câncer que também há redução dos agentes de defesa do organismo e neonatos de baixo peso (LEROY et al., 2009).

Para que estas infecções ocorram essas leveduras utilizam alguns fatores que as beneficiam. Um deles é estar presente na microbiota humana que, por meio de via endógena, atravessam os vasos mesentéricos chegando a circulação sanguínea. Outras formas relatadas na literatura são a transmissão através de profissionais relacionados a assistência, onde por meio da ausência de higienização das mãos, principalmente, transferem o patógeno ao ter contato com o paciente e o outro é devido a característica do fungo ser capaz de produzir biofilme, que o protege da ação de germicidas e proporciona sua estadia em materiais médicos hospitalares como cateteres e tubos de ventilação (BRILHANTE et al., 2005; COLOMBO et al., 2007; BRUNKE; HUBE, 2013; VILLALOBOS et al., 2016).

Apesar da presença de resistência aos medicamentos antifúngicos, os tradicionais fármacos utilizados pela medicina são pertencentes as classes do azóis, poliênicos e equinocandinas. Dentre estes os mais conhecidos são fluconazol e itraconazol (azol),

anfotericina B (poliênico) e caspofungina (equinocandina), sendo a primeira classe citada o de tratamento de primeira escolha (YANAGIDA, 2000; BANSOND; RAI, 2008; PAPPAS et al., 2009; PFALLER et al., 2010; GARCIA-EFFRON et al., 2010; KAUR et al., 2016).

Entretanto, o desenvolvimento de resistência e o surgimento de novas espécies do gênero *Candida* multidrogarresistentes de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelos *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) levaram a busca de novos agentes antifúngicos (BERGOLD; GEORGIADS, 2004; SEARS; SCHWARTZ, 2017).

Para combater as infecções fúngicas, novos medicamentos já estão disponíveis no mercado como o Voriconazol e o Pozaconazol, (BERGOLD; GEORGIADS, 2004; ARCADER; CARVALHO, 2006).

Também são utilizadas plantas medicinais como fonte de medicina alternativa, principalmente pela população, para se obter novos agentes com potencial antifúngico (BRUNING et al., 2012).

Seu uso ganhou força a partir da Alma – Ata liberada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ao expor que este recurso é utilizado por 80% da população mundial. No Brasil foi impulsionada pela inclusão da fitoterapia no Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, tornando o uso de plantas medicinais não mais uma forma alternativa, mas sim complementar, de modo a auxiliar nas mais diversas doenças (OMS, 1979; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BRASIL, 2006).

Visto este estímulo ao uso de plantas medicinais, o presente estudo selecionou duas espécies de plantas, sendo uma pertencente a relação de plantas medicinais de interesse ao sistema único de saúde (RENISUS) – *Momordica charantia* L. (Cucurbitacea) conhecida popularmente como melão-de-são-caetano – e outra pertencente a mesma família – *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. conhecida como bucha ou maxixão, para realizar atividade antifúngica frente isolados clínicos de *Candida* (BRASIL, 2009).

Essa escolha se deu por estas espécies apresentarem estudos relatando atividades frente diversas doenças com diabetes, distúrbios gastrointestinais, infecções virais, problemas relacionados as vias respiratórias e ação antimicrobiana frente vários micro-organismos deste bactérias Gram-positivas e negativas como fungos leveduriformes e filamentosos (GROVER; YADAV, 2004; HAZRA et al., 2011; SILVA, 2012; WANG et al., 2016).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar estudos farmacobotânico, fitoquímico e prospecção da atividade antifúngica de extratos de *Momordica charantia* L. e *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. frente isolados clínicos de *Candida* spp.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter os extratos brutos de folhas e frutos de *M. charantia* e de folhas *L. cylindrica*
- Caracterizar o perfil fitoquímico dos extratos de folhas e frutos de *M. charantia* e folhas de *L. cylindrica*
- Realizar a anatomia de gavinha, pecíolo e folha de *L. cylindrica*
- Realizar estudo histoquímico de lâmina foliar de *L. cylindrica*
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de *L. cylindrica* e *M. charantia* frente isolados clínicos de *Candida*
- Avaliar atividade de sinergismo dos extratos obtidos com o fluconazol nos isolados clínicos de *Candida* spp. obtidos

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* E RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIFÚNGICOS

As leveduras do gênero *Candida* são organismos presentes na microbiota humana e apresentam relação de comensalismo. Entretanto, sob variações desta microbiota e diminuições nos componentes de defesa do organismo, como a terapia com agentes antibacterianos e a utilização de imunossupressores, pode haver deslocamento destes fungos para a corrente sanguínea, acarretando infecções sistêmicas graves (LEROY et al., 2009; CAUCHIE et al. 2017; RICHARDSON; RICHARDSON, 2017).

Essas infecções são mais susceptíveis em pacientes que tiveram seu diagnóstico e tratamento tardios para infecções fúngicas, os que realizaram transplantes de órgãos sólidos e/ou transplante de medula óssea, aos que fazem uso de imunossupressores e nos internados em unidades de terapia intensiva. Esse grupo de risco é susceptível devido a fatores como neutropenia, disfunção nas células de defesa e comprometimento da mucosa intestinal (VAZQUEZ et al., 2013; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

Candida albicans, como também espécies de *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e a mais recentemente isolada cepa de *Candida auris* – são as mais reportadas com resistência a terapia antifúngica nas infecções sistêmicas. Estas também são diagnosticadas, muitas vezes, após o paciente ter sido exposto a antibióticos de amplo espectro sem melhora clínica e ter feito uso de cateter venoso central (CALVO et al., 2016; SULEYMAN; ALANGADEN, 2016; RICHARDSON; RICHARDSON, 2017; ALATOOM et al., 2018).

Além de infecções sistêmicas, pode haver acometimentos como vulvovaginites em mulheres que apresentam desequilíbrio na microbiota ou durante o período gestacional, podendo ser assintomática ou sintomáticas com aparecimento de corrimento vaginal, coceira, sensação de queimor e disúria. Outra infecção está relacionada a onicomicose que, em geral, ocorrem devido a traumas ocasionados nas unhas ou a exposição a ambientes úmidos (MUCCI et al., 2017; SAV et al., 2018).

As infecções de pele são tratadas com antifúngicos tópicos ou orais. Já as infecções sistêmicas são tratadas principalmente com antifúngicos sistêmicos de via de administração endovenosa. A exposição aos antifúngicos de ação sistêmica apresenta fins terapêuticos,

profiláticos, ou ambos, de acordo com a clínica do paciente. Entretanto, pode ocasionar o desenvolvimento de fungos resistentes ao tratamento, levando o paciente a estágios mais graves da doença, com passível desfecho de morte (ALATOOM et al., 2018).

O surgimento das resistências pode ser evidenciado pela presença do fungo quando o paciente está fazendo uso do medicamento e ao fim do tratamento sua erradicação não foi bem-sucedida. O micro-organismo lança mão de estratégias, como a liberação de toxinas e reorganização estrutural para driblar a ação dos agentes antifúngicos. Além disso, estas propriedades vão sendo transmitidas para as espécies descendentes, aumentando sua replicação ocasionando falha terapêutica (ANDERSON, 2005; COWEN, 2008; MORACE et al., 2014).

Esses mecanismos de resistência ocorrem frente várias classes de agentes antifúngicos. Algumas espécies apresentam esta resistência de forma intrínseca, como *C. krusei* frente fluconazol, um medicamento da família dos azólicos e primeira escolha para tratamento de infecções. Mas, a forma como a levedura se comporta para burlar os mecanismos de ação dos fármacos varia de acordo com a classe terapêutica e as espécies. De modo geral, pode haver a formação de bombas de efluxo, facilitando a saída do fármaco da célula fúngica, *downregulation* ou modificação da conformação dos sítios de ação, impedindo que a ação farmacológica seja iniciada (ANDERSON, 2005; COWEN, 2008; MORACE et al., 2014; LU et al., 2017; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; KOOSHKI et al., 2018).

2.2 AGENTES ANTIFÚNGICOS E NOVAS PERSPECTIVAS

Haja vista as classes terapêuticas de fármacos disponíveis para o tratamento e profilaxia (Tabela 1) de pacientes e os mecanismos de resistência que apresentam, a busca de novos agentes antifúngicos é necessário (CALVO et al., 2016; ZIDA; BAMBA et al., 2016; BERKOW et al., 2017).

A descoberta de substâncias ativas até a chegada do fármaco a população com a garantia de qualidade, segurança e eficácia demanda tempo e muito investimento financeiro. Mas, com a evolução da tecnologia, novas formas de se pesquisar possíveis candidatos a novos fármacos foram sendo criadas e fortalecidas ns últimos anos como os estudos sobre produção de vacinas e testes *in silico* (SILVA et al., 2019).

Tabela 1 Agentes antifúngicos comuns usados na terapia antifúngica.

Classe antifúngica	Fármaco representante	Espectro de ação	Atividade antifúngica	Usos terapêuticos
Polieno - Macrolídeo	Anfotericina B	Ampla espectro	Ligação com o ergosterol na membrana fúngica formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana e o extravasamento de moléculas	Esofagite por <i>Candida</i> , aspergilose invasiva, meningite por <i>Coccidioides</i> , esporotricose, fusíode, histoplasmose, blastomicose
Atimetabólito	Flucitosina	Espectro restrito	É convertida em 5-fluorouracila, que inibe a timidilato sintase, inibindo a síntese de DNA fúngico.	Infecções por <i>Critococcus neoformans</i> , espécies de <i>Candida</i> e cromoblastomicose
Azólicos - imidazólicos	Clotrimazol, Miconazol, Cetoconazol, Econazol, Butoconazol, Oxiconazol, Sertaconazol, Sulconazol	Ampla espectro	Inibem a enzima 14- α -esterol desmetilase, uma CYP mitocondrial, essencial para a síntese do ergosterol, ocasionando inibição do crescimento fúngico	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>parapsilosis</i> , <i>glabrata</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , espécies de <i>Coccidioides</i> , <i>Paracoccidioides brasilienses</i> e dermatófitos
Azólicos (triazólicos)	Terconazol, Itraconazol, Fluconazol, Voriconazol			
Equinocandinas	Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina	Ampla espectro	Inibem a síntese de 1,3- β -glicano, polímero de glicose necessário para manter a estrutura da parede celular fúngica.	Candidíases e aspergiloses invasivas, refratárias à Anfotericina.

Fonte: Goodman; Gilman, 2010; Rang; Dale, 2012.

Estudos sobre a produção de vacinas estão sendo realizados por pesquisadores através da análise da ação imunológica dos fungos no organismo, porém necessita de mais pesquisas, visto que relatos indicaram dificuldades com relação ao público alvo, como pacientes imunossuprimidos que não apresentam imunidade responsiva a vacinas e os que desenvolvem alergias aos componentes da formulação. Entretanto, o uso de anticorpos monoclonais pode ser uma via promissora (NAMI et al., 2019a; NAMI et al., 2019b).

Esta nova técnica pode realizar a construção *in silico* de possíveis sítios de ação do micro-organismo ao qual se deseja pesquisar e, a partir de estudos prévios de análise de espectrometria de massa e demais técnicas para se predizer a estrutura de uma molécula estudada, desenhar a molécula em formato 3D em programas específicos para testar sua afinidade de ligação com o sítio em questão e assim estimar se esta tem algum potencial farmacológico (SILVA et al., 2019).

Estudos recentes *in silico* estão auxiliando na descoberta de estruturas das leveduras do gênero *Candida* para serem utilizados em teste de *Docking* molecular (SILVA et al., 2019). A análise simula a interação de duas estruturas, normalmente uma proteína e o ligante, através das interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio e indica o potencial de interação (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

Estes testes estão sendo aplicados em compostos sintéticos de imidazolilflavanonas, onde estas são precursoras de possíveis moléculas com ação antifúngica que foram testadas com método *in silico* para verificação de ação frente as espécies de *Candida* (EMAMI et al., 2013).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização das plantas medicinais para fins de tratamento, cura e prevenção de doenças é uma prática milenar. A busca por remédios à base de plantas, como as ervas, iniciou para suprir necessidades de combater doenças e, à medida que esse conhecimento aumentava, as pessoas que manipulavam estas ervas foram nomeadas de curandeiros, que tinham a responsabilidade de transmitir esta sabedoria a pessoas escolhidas (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BRUNING et al., 2012).

Esse uso foi tomando a sociedade de tal forma que se tornou uma prática generalizada na medicina popular. Mas, com o surgimento da industrialização, do empirismo e da química experimental a síntese de novos compostos orgânicos destinados ao tratamento da

população, levou a diminuição do uso das plantas pela medicina (SIMÕES et al., 2001; FRANÇA et al., 2007; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010).

Contudo, os medicamentos alopáticos tinham um alto custo agregado e a população não tinha um bom acesso a assistência a saúde nem condições financeiras para a aquisição destes medicamentos, recorrendo assim ao uso das plantas medicinais para o tratamento das enfermidades (SIMÕES et al., 2001; BRASILEIRO et al., 2008).

O uso etnobotânico e etnofarmacológico das plantas evoluiu de uma forma que a Organização Mundial de Saúde (OMS) explanou na Declaração Alma-Ata, em 1978, que 80% da população mundial utiliza plantas ou preparados delas como forma de atenção primária a saúde e destaca os países em desenvolvimento nesta prática, visto que possuem 67% das espécies vegetais do mundo (OMS, 1979; BRASIL, 2006).

No Brasil, o uso das plantas medicinais tomaram maior visibilidade após a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC) onde traz a Fitoterapia – terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal – para tratar o paciente de forma holística (BRASIL, 2006; FOGGIO et al., 2006; PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006; FRANÇA et al., 2007; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010)

A inserção da fitoterapia no SUS causou bom impacto a população, visto que pesquisas com pacientes frequentadores de unidades básicas de saúde e do programa de saúde da família relataram sobre a importância da intervenção de profissionais capacitados para garantir a segurança do paciente haja vista as informações dos próprios usuários quanto ao uso indiscriminado das plantas medicinais, sem ter consciência da passividade dos efeitos tóxicos que estavam expostos (BRASILEIRO et al. 2008; BRUNING et al., 2012).

Uma outra forma de auxiliar os profissionais para a orientação do paciente quanto ao uso seguro de plantas medicinais foi a criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), onde traz uma seleção de plantas com ação terapêutica, com fim de estimular a pesquisa científica, a produção de medicamentos fitoterápicos e contribuir com a assistência farmacêutica para a promoção de segurança e eficácia do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, utilizados na atenção básica da saúde (BRASIL, 2009).

2.4 FAMÍLIA CUCURBITACEAE

A família Cucurbitaceae, segundo *The Plant List* (2018), tem 134 gêneros de plantas e 965 espécies, apresenta variabilidade genética e pode crescer em locais de clima subtropical, tropical, árido e temperado. Os gêneros de destaque na família são *Bryonopsis*, *Corallocarpus*, *Cucurbita*, *Cucumis*, *Citrullus*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica* e *Trichosanthes*. (DHIMAN et al., 2012; PARIS et al., 2017 *The Plant List*, 2018;).

São plantas herbáceas, com folhas geralmente grandes inteiras ou com lobos profundos, podendo se comportar como trepadeiras ou rastejantes. Suas flores apresentam sexos separados com ovário ínfero grande, e seus frutos são, geralmente, do tipo pepônio, indeiscentes, com epicarpo duro, mesocarpo e endocarpo carnosos (JOLY, 1993; SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013).

Visto sua ampla adaptação em diversas áreas de climas diferentes, as espécies da família Cucurbitaceae são bastante cultivadas. Seus frutos podem ser consumidos verdes ou quando estão maduros e são servidos em formas de doces, pickles ou frescos, em saladas ou sobremesas. Além dos frutos, as sementes, raízes e folhas são também utilizados pela população para tratamento de vermes, diabetes, abortivas, dismenorrea, reumatismo, purgativa, dentre outros relatos (BELOIN et al., 2005; JEYADEVI et al., 2012; MODI; KUMAR, 2014; GIOVANNINI et al., 2016).

A composição química apresenta diversos metabólitos secundários, como os terpenos, polifenóis e alcaloides, que variam entre as espécies. Mas, a presença das substâncias denominadas cucurbitacinas, um derivado triterpeno tetracíclico oxidado, identificadas inicialmente na década de 50, são predominantes na família, e responsáveis por atividades *in vitro* como anticâncer, antimicrobiana, antipirética, hepatoprotetora e anti-inflamatória (GEISSMAN, 1964; KIM; PARK; KIM, 2014; ZHU et al., 2018).

2.4.1 *Momordica charantia* L.

De nome popular melão-de-são-caetano, *M. charantia* é uma planta encontrada em diversas regiões da América do Sul, inclusive no Nordeste brasileiro, mas de origem africana e asiática. Ela tem como características ser uma trepadeira anual, com caule chegando a 10 metros de comprimento, folhas recortadas entre 5 e 7 lóbulos, sendo estes denteados e obtusos. Apresenta numerosas gavinhas que nascem em lado oposto a folha, suas flores se

apresentam sozinhas, de coloração amarela clara e geram frutos pequenos, pendentes, do tipo cápsula escamosa, deiscente, fusiforme, medindo de 4 a 6 centímetros de comprimento. A cor de seus frutos é verde, quando imaturos, se tornando alaranjados quando maduros, onde se abrem e expõem as sementes que estão envolvidas em um arilo vermelho-vivo adocicado (MATOS, 2007; SOUZA; FLORES; LORENZI, 2013).

Levantamento etnobotânico desta planta no Tongo (Oeste da África) evidenciou seu uso para tratamentos de doenças como diabetes, varíola e sarampo, infecções de pele, problemas gastrointestinais e em pessoas acometidas por malária. A população utiliza as folhas e caules em água por um grande período de tempo e em seguida bebem ou se banham com o preparo. Suas sementes são raramente utilizadas, mas houve relatos de uso para problemas ginecológicos, como dismenorreia, e também de ação abortiva (BELOIN; GBEASSOR; AKPAGANA, 2005).

Estudos farmacológicos vem sendo realizados para verificação da atividade de *M. charantia* em várias doenças. Glicosídeos cucurbitanos, encontrados em extratos etanólicos, tiveram ação comprovada como anti-hiperglicemiante, com comportamento semelhante a insulina. Extratos etanol/água de partes aéreas, e extratos metanólicos do caule foram testados para ação antioxidante, sendo estas comprovadas, evidenciando as moléculas de triterpenoides cucurbitanos e de triterpenoides multifloranos (LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2014; SVOBODOVA et al., 2016).

Outros testes realizados em modelo animal para evidenciar efeito antiulcerogênico com extratos metanólicos a 70% de frutos de *M. charantia* verificaram que os resultados foram significativos frente as úlceras induzidas por etanol, indometacina, estresse e cisteamina. Sendo verificada também o efeito cicatrizante de úlceras induzidas por ácido acético (ALAM et al., 2009).

Estudos envolvendo metabólitos secundários como triterpenos do tipo cucurbitanos oriundos de frutos imaturos apresentaram característica de protetor hepático com ação antifibrosi e anti-hepatoma em testes *in vitro* (YUE et al., 2019). Outros compararam a ação de saponinas e polissacarídeos extraídos de frutos verdes quanto a ação anti-hiperlipidêmica e hipoglicemiante, tendo os extratos com saponinas melhores resultados (WANG et al., 2019).

A ação anticâncer também é relatada na literatura. Extratos obtidos de frutos verdes foram testados frente células tumorais como MDA-MB-231 (célula epitelial de câncer de mama humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), WiDr (adenocarcinoma de cólon humano) evidenciaram ação citotóxica de moderada a alta, apresentando morte celular. Nestes estudos se evidenciou também a ação do extrato na clivagem da enzima PARP,

responsável pela reparação do DNA das células tumorais e a modulação de enzimas de apoptose celular (RAY et al., 2010; HSIAO et al., 2013).

Com relação as atividades antimicrobianas, a ação antifúngica em *Fusarium solani* L. a partir de extratos obtidos de sementes e ação em bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* HQ693279) e Gram negativas (*Aeromonas hydrophila* ATCC7966) a partir de extratos aquosos de frutos frescos foram relatadas na literatura (MALAIKOSHUNDAN et al., 2016; WANG et al., 2016).

Outros relatos de ação antimicrobiana envolvem atividade antifúngica. Algumas são a ação do extrato aquoso do melão identificada frente a levedura *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* com inibição total do crescimento fúngico, ao qual o autor fez uma proposição de estar relacionado a presença da proteína MAP-30 que apresenta atividade biológica em vários ramos da pesquisa (SCHMOURLO et al., 2005), e também a ação frente fungos leveduriformes e filamentosos através de sabonetes contendo óleo de sementes de *M. charantia* (ZUBAIR et al., 2018).

Ações antivirais também são descritas na literatura sobre esta planta. Pesquisas relatam a ação de metabólitos oriundos de *M. charantia* frente o vírus da imunodeficiência humana. Dentre os compostos evidenciados temos o MAP-30 (proteína inativadora de ribossomo tipo I) que impede a infecção dos linfócitos T, monócitos e a replicação do vírus em células já infectadas bem como a transcriptase reversa, a α e β -momorcarina que inibem a enzima integrasse e a MRK29 que também inibe a transcriptase reversa (FANG; NG, 2011; NAGARANI; ABIRAMI; SIDDHURAJU, 2014; PALAMTHODI; LELE, 2014; RAINA; KUMAR; AGARWAL, 2016).

Quanto a sua composição fitoquímica, há vários estudos com identificação de seus metabólitos secundários, suas elucidações estruturais e, em alguns casos, as possíveis atividade que eles possuem. As observações destas pesquisas estão descritas na Tabela 2 (FANG; NG, 2011).

Tabela 2 Identificação de metabólitos secundários, estruturas químicas e atividades de *Momordica charantia*.

Parte usada	Tipo de extrato	Separação dos compostos	Compostos identificados	Classe química	Atividade	Referência
Raiz	Extrato metanólico	Coluna cromatográfica Sephadex LH-20 e sílica gel	Kuguancina A - E	Cucurbitacinas. Kuguancinas C, D e E são triterpenoides tetracíclicos	Anti - HIV	Chen et al., 2008
Folha e videira	Extrato etanólico, seguido de suspensão em água e partição em solventes de polaridade diferentes	Coluna cromatográfica se Sephadex LH-20 e sílica gel	Kuguancina F - S	Cucurbitacinas	Anti-HIV	Chen et al., 2009
Caule	Extrato metanólico, seguido de suspensão em água e partição em solventes de polaridade diferentes	Cromatografia em Sílica Gel	Ácido 3 β -hidroximultiflora-8-em-17- oico (1), Cucurbita-1(10),5,22,24-tetraen-3 α -ol (2), 5 β ,19 β -epoxicucurbita-6,22,24-trien- 3 α -ol (3)	1 – triterpenoide multiflorano, 2 e 3 - Triterpenoide cucurbitano	Antioxidante para tratamento de doenças que envolvam espécies reativas de oxigênio	Liu et al., 2010
Fruto	Extrato etanólico a 70%. Seguido de suspensão em água e tratamento com solventes de polaridades diferentes	Cromatografia em sílica gel	(23E)-5 β ,19-epoxicucurbita-6,23,25(26)-trieno-3 β -ol. (19R, 23E)-5 β ,19-epoxy-19-etoxicucurbita-6,23-diene-3 β ,25-diol.	Triterpenoides cucurbitanos	Apenas o metabólito 1 apresentou atividade anticâncer e em uma linhagem de células (MCF-27).	Cao et al., 2011
Fruto fresco	Extrato etanólico a 70%.	Cromatografia líquida de fase reversa	Kuguasaponinas de A a H	Glicosídeos cucurbitanos	Ação hipoglicemiante – Compostos B e C, G e H. Compostos B - F apresentaram Significativa atividade frente células tumorais	Zhang et al., 2014
Parte aérea	Extrato metanólico a 95% sob refluxo a 65°C particionado em solventes de polaridades diferentes	Cromatografia em sílica gel	Cucurbita-6,24-dien-3 β ,23-diol-19,5 β - olideo (1), (19R)-5 β ,19-epoxi-19-metoxicucurbita-6,24-dien- 3 β ,23-diol (2), (19S)-5 β ,19-epoxi-19-metoxicucurbita-6,24-dien-3 β ,23-diol (3), (19R)-5 β ,19-epoxi- 19-isopropoxicucurbita-6,24-dien-3 β ,23- diol	Triterpenoides cucurbitanos	Não realizado testes para verificação de ação dos compostos	Jiang et al., 2016

(4), 3 β ,23-dihidroxi-
5-metoxicucurbita-
6,24-dien-19- al (5),
(19R)-7 β ,19-epoxi-
19-metoxicucurbita-
5,24-dien-3 β ,23-diol
(6)

Fonte: Autor

Devido as variadas pesquisas sobre esta planta, dentre elas etnobotânicas e farmacobotânicas, visando a descoberta de atividades em diversas doenças, esta planta foi elencada na RENISUS, com a finalidade de fortalecer as pesquisas com esta espécie para futuras produções de medicamentos fitoterápicos em laboratórios públicos e privados, a publicação técnico-científica de plantas brasileiras e também para contribuir com a assistência farmacêutica promovendo o uso com segurança e eficácia da planta na atenção básica no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009).

2.4.2 *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.

A espécie *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. tem como nomes vulgares bucha, maxichão, bucha de banho (OBOH; ALUYOR, 2009; ALBUQUERQUE et al., 2007) e está presente em regiões de clima subtropical como Índia, Brasil, Asia e África (OBOH; ALUYOR, 2009; KAO; HUANG; CHEN, 2012).

Tem como sinônimos *Momordica cylindrica* L. e *Luffa aegyptiaca* Mill. e é de hábito arbustiva/ trepadeira. Pode ser encontrada nas regiões Norte (Amazonas, Pará e Rondônia), Nordeste (Bahia, Paraíba e Pernambuco), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Rio de Janeiro), nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2018).

Seu uso popular é bem disseminado no semi-árido do Nordeste Brasileiro. A população faz uso de seus frutos para tratamento de úlceras e gastrite (ALBUQUERQUE et al., 2007), como anti-inflamatória a partir da infusão de suas folhas para auxiliar no tratamento de artrite reumatoide (SALIHU et al., 2018) e para o tratamento de rinites, mastites, amenorreia, queimaduras, faringite, inchaços e enxaqueca por meio do uso oral, de sucos e por decocção de seus frutos e sementes (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014).

Quanto a sua composição fitoquímica, suas folhas apresentam os metabólitos saponinas, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos (OYETAYO; OYETAYO; AJEWOLE, 2007), seus

frutos podem apresentar triterpenos, flavonoides e derivados cinâmicos (DU et al., 2006; PARTAP et al., 2012) e as sementes apresentam alcaloides, flavonoides glicosídeos e esteroides (MUTHUMANI et al., 2010).

Com o auxílio de estudos fitoquímicos foram isolados alguns componentes de várias partes de *L. cylindrica*. Dentre eles os mais recentes foram a Lufacilina, uma proteína inativadora de ribossomo obtida de suas sementes secas (PARKASH; NG; TSO, 2002), e uma flavona glicosídica de seus frutos (DU; CUI, 2007).

Tanto estas moléculas isoladas quanto extratos de folhas, frutos e sementes da bucha apresentam alguma atividade biológica. A Lufacilina, por exemplo, apresentou atividade antifúngica frente *Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum* (PARKASH; NG; TSO, 2002). Já outros estudos mostraram que extratos de seus frutos maduros apresentaram ação antibacteriana moderada frente *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* e ação antifúngica frente *Candida albicans*, *Trichophyton longifulos* e *Microsporum canis* (AHMAD; KHAN, 2013).

Ação antioxidante do extrato de seus frutos *in vitro* e a ação anti-inflamatória de toda a planta também foram evidenciadas na literatura em modelo animal (DU et al., 2006; ABIRAMI et al., 2011).

Alguns metabólitos isolados de *L. cylindrica* podem ser verificados na tabela 3.

Tabela 3 Metabólitos primários e secundários de *Luffa cylindrica*.

Parte utilizada	Tratamento do material vegetal	Processo de obtenção	Compostos identificados	Classe química	Atividade	Referência
Sementes	Extrato aquoso	Coluna cromatográfica Amberlite XAD-2	Luciosideo N e P	Saponina	Fibrinolítica	Yoshikawa, Arihara, Wang et al., 1991.
Sementes	Éter congelado e tampão com cloreto de sódio	Coluna de troca iônica	<i>Luffin</i> S	Peptídeo	Atividade ribonucleolítica	Gao, Ling, Zhong et al., 1994.
Fruto	NI	NI	Lusicosídeos C-H, uma mistura de alfa-espinaesterol e outro glicosídico, estigmasta-7,22,25-trien-3-beta-OH e delta 7,22,25-estigmasteril-beta-D-glicosídeo.	NI	NI	Xiong, Fang, Zeng, 1994
Sementes	Extrato de origem não informada	Coluna de Sefadex G-75	Sequência de aminoácido 6.5k-arginina-glutamato	Polipeptídeo	NI	Kimura, Park, Sakai et al., 1997.
Fibras do fruto	Extração em Soxhlet com tolueno:etanol 19:31, por 24h	Tratamento com água fervente, oxalato de amônia e EDTA. Por fim tratado com NaOH e neutralizado com HCL	(1→4)- α -D-Xylp (1→4)- α -D-Xylp-2-O-GlcpA 4-OMe-α-D-GlcpA	Xilano – polissacarídeo	NI	Vignon, Gey 1998.
Sementes	Extrato bruto de sementes em Tris-HCl mM	Cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade,	Lufacilina	Peptídeo	Antifúngica	Parkash, Ng, Tso, 2002.
Sementes	Tratamento com vários solventes e sais	Coluna de troca iônica	<i>Luffin</i> P1	Peptídeo	N-glicosidase	Li, Yang, Xia et al., 2003
Fruto	Tratamento com metanol e brometo de potássio	NA	Metil éster Diosmetina 7-O-β-D-glicuronídeo	NI	NI	Du, Cui, 2007.
Sementes	PCR	NA	<i>Luffijn</i> P1	Peptídeo inativador de ribossomos	Anti-HIV – 1	Ng, Yang, Sze et al., 2011
Fibras do fruto	Tratamento com solução de hidróxido de sódio 2% seguido de tampão acetato	Solução de ácido cloroacético, tionil cloridrato e clorofórmio	Celulose	NI	NI	Adewuyi, Pereira 2017.

Legenda: HCl: ácido clorídrico. NA: não se aplica. NaOH: hidróxido de sódio. NI: não informado. PCR: reação em cadeia da polimerase

Fonte: autor

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas e frutos da espécie vegetal *Momordica charantia* foram coletadas na cidade de Aliança, no distrito Usina Aliança, Mesorregião Mata Norte do estado de Pernambuco, no período de março a maio de 2017. As folhas de *Luffa cylindrica* foram coletadas no mesmo município no período de junho a julho de 2018. As exsiccatas foram encaminhadas ao Herbário Dárdano de Andrade Lima, na Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias, tombadas sob os números 89980 – *M. charantia*, 92082 – *L. cylindrica*.

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras foram secas em Estufa de Esterilização e Secagem com Circulação Forçada de Ar (Modelo LUCA – 82/480®, Marca Lucadema Científica®) a 40 °C, por 24 horas -folhas- e 48 horas – frutos. Em seguida foram pulverizadas em liquidificador industrial.

3.2.1 Extração a quente em Sistema Fechado - Aparelho Soxhlet

Os extratos de folhas e frutos foram preparados na proporção 1:10 (p/v). com solventes de polaridades crescentes (Hexano, Acetato de Etila, Etanol) por um período de 6 horas em aparelho de Soxhlet. Após extração, estes foram filtrados e rotaevaporados, a 40 °C (Rotaevaporador RV 10 Basic, IKA®), até retirada completa dos solventes.

3.2.2 Caracterização dos extratos

O material vegetal foi caracterizado através de Cromatografia em Camada Delgada. As prospecções foram para os metabólitos secundários: taninos, alcaloides, triterpenos e esteroides, mono e sesquiterpenos, flavonoides, fenilpropanoglicosídeos e derivados cinâmios, saponinas e cumarinas, segundo protocolo desenvolvido no Laboratório de

Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFPE apoiado em estudos de Harborne (1984) e Wagner (1996) com modificações Tabela 4 (RANDAU, 2004).

Tabela 4 Prospecção dos metabólitos secundários dos extratos brutos de *Momordica charantia* L. e *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.

Metabólitos	Sistema Eluente	Proporção	Revelador	Espectro de verificação	Padrão
Alcaloides	AcOEt ¹ - AcOH ² -HCOOH ³ -H ₂ O ⁴	100:11:11:27	Dragendorff	Visível	Pilocarpina
Monoterpenos e Sesquiterpenos	Tolueno:AcOEt ¹	97:3	Vanilina Sulfúrica	Visível	Carvacrol
Triterpenos e Esteroides	Tolueno:AcOEt ¹	90:10	Liebermann Buchard	Visível	B-sitosterol
Saponinas	AcOEt ¹ - AcOH ² -HCOOH ³ -H ₂ O ⁴	100:11:11:27	Vanilina Sulfúrica	Visível	Saponina
Cumarinas	n-Hexano-AcOEt ¹	3:2	KOH ⁵ 10% em EtOH ⁶	Ultra-violeta (365nm)	Escopolamina
Flavonoides Fenilpropanoglicosídeos Derivados cinâmicos	AcOEt ¹ - AcOH ² -HCOOH ³ -H ₂ O ⁴	100:3:3:3	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Rutina e Ácido clorogênico
Taninos hidrolizados	AcOEt ¹ - AcOH ² -HCOOH ³ -H ₂ O ⁴	100:11:11:27	NEU	Ultra-violeta (365nm)	Ácidos gálico e elágico
Taninos condensados	AcOEt ¹ - AcOH ² -HCOOH ³ -H ₂ O ⁴	100:11:11:27	Vanilina Clorídrica	Visível	Catequina

Legenda: ¹ Acetato de Etila, ² Ácido fórmico, ³ Ácido acético, ⁴ Água, ⁵ Hidróxido de potássio, ⁶ Etanol.

3.3 ANATOMIA FOLIAR DE *Luffa cylindrica*

A caracterização anatômica se deu pela fixação do material vegetal em FAA50 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) (JOHANSEN, 1940). Secções transversais de lâminas foliares, pecíolo e gavinhas foram obtidos por técnica à mão livre, utilizando lâminas de aço e medula do pecíolo de embaúba (*Cecropia* sp.) como material suporte, bem como secções paradérmicas nas faces adaxial e abaxial.

Os cortes foram submetidos a solução de hipoclorito de sódio a 50% para descoloração (KRAUS; ARDUIN, 1997). Em sequência, foram lavados em água destilada e corados; cortes transversais foram corados segundo técnica descrita por Bukatsch (1972), com safranina e azul de Astra; as secções paradérmicas foram coradas com azul de metileno (KRAUTER, 1985). Por fim, foram montadas lâminas semipermanentes, seguindo procedimentos usuais em anatomia vegetal (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951).

3.4 ESTUDO HISTOQUÍMICO DE LÂMINA FOLIAR DE *L. cylindrica*

Foram realizados cortes transversais a mão livre da lâmina foliar fresca de *L. cylindrica* seguido da análise histoquímica com os reagentes indicados na tabela 5. Cortes controles foram realizados através de secções transversais e montagem de lâminas semipermanentes (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951).

Tabela 5 Reagentes utilizados para a o estudo histoquímico da lâmina foliar de *Luffa cylindrica*.

Reagentes	Substâncias	Referências
Lugol	Amido	Johansen, 1940
Floroglucinol	Lignina	Johansen, 1940
Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	Gabe, 1968
Tricloreto de antimônio	Triterpenos e esteroides	Mace; Bell; Stipanovic, 1974
Dragendorff	Alcaloides	Brasil, 2010
Sudam III	Compostos lipofílicos	Sass, 1951
Ácido clorídrico (10%)	Cristais de oxalato	Jensen, 1962
Vanilina clorídrica	Taninos condensados	Mace; Howell, 1974
Nadi	Óleos essenciais	David; Carde, 1964

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise das lâminas histológicas para caracterização anatômica e histoquímica foi conduzida em imagens, com uso de *software Toup View Image*, obtidas por câmera digital acoplada a um microscópio óptico de luz (*Alliton e Leika*).

3.6 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS ESTOCADOS EM COLEÇÃO DE CULTURAS

Foram obtidas 6 culturas de *Candida* de origem clínica depositadas na Coleção de Culturas Micoteca Universidade Recife Micologia (URM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As culturas foram reativadas em caldo BHI, mantidos por 24 horas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, seguido por semeio em ágar Müller Hinton para verificação da viabilidade e pureza (PUTIGNANI et al., 2010).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

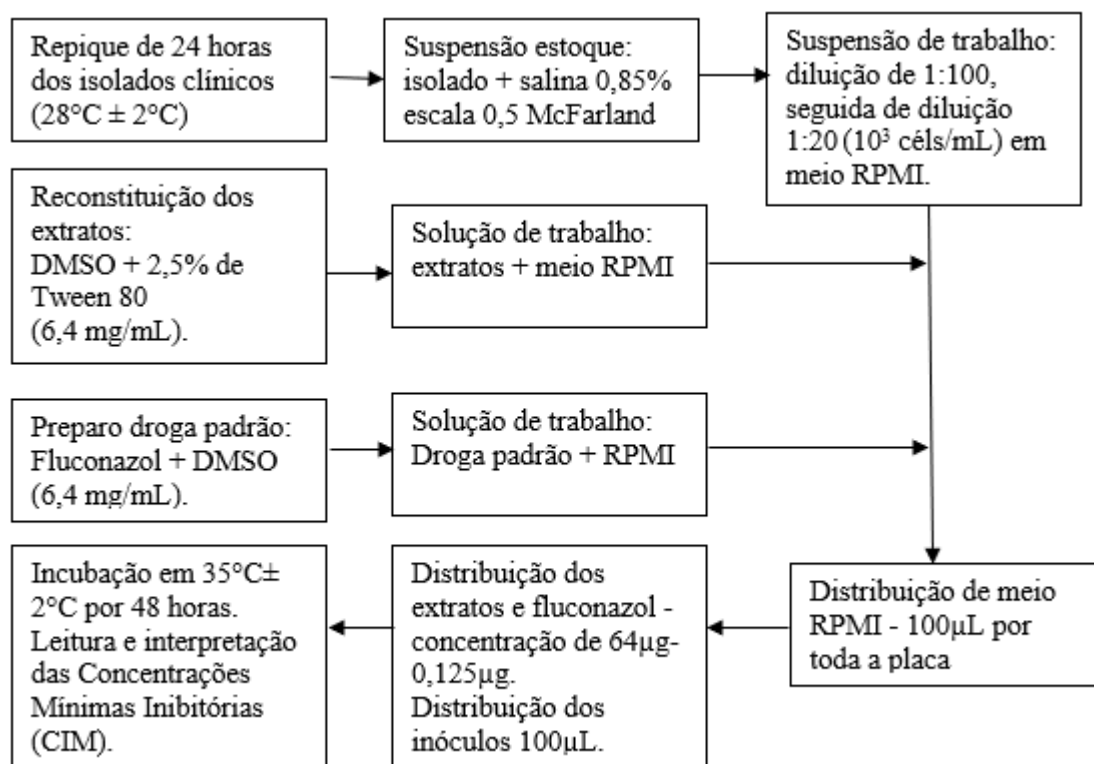
3.7.1 Teste quantitativo de microdiluição em placa

Foi realizado seguindo metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27-A2 (2012) esquematizado abaixo na Figura 1 para técnica de microdiluição em caldo.

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, a cepa *Candida parapsilosis* da *American Type Culture Collection* (ATCC 22019) como controle de validação do teste, meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) cuja concentração final foi $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0. O meio de cultura foi esterilizado por filtração a vácuo em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

A leitura dos resultados foi realizada de modo visual, considerando a Concentração Mínima Inibitória àquela que inibiu em 50% o crescimento fúngico. Os poços com ausência de crescimento foram semeados em placa de Müller Hinton para verificação de atividade fungicida.

Figura 1 Fluxograma de teste de microdiluição em placa dos extratos de *M. charantia* e *L. cylindrica*



Fonte: Autor

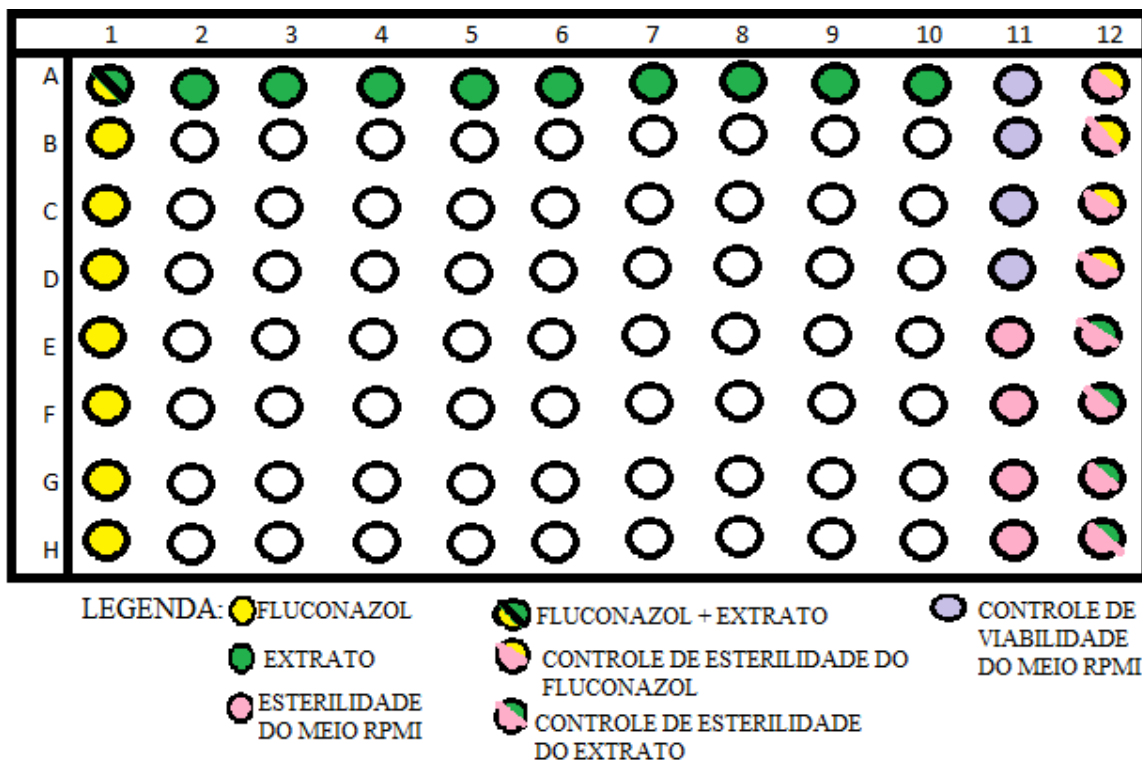
3.7.2 Teste de Sinergismo dos extratos de *M. charantia* e *L. cylindrica* com fluconazol

Utilizou-se placas de microdiluição de 96 poços, de fundo chato, com tampa. Foram adicionados, inicialmente, 100 µL de meio RPMI 1640 em todos os poços. Em seguida, 100 µL de fluconazol foi colocado no primeiro poço das linhas A – H (de forma vertical) e realizada a microdiluição seriada. Em seguida foi adicionado 100 µL dos extratos no primeiro poço das colunas de 1 – 10 (horizontal) e realizada a microdiluição (Figura 2).

Os inóculos, previamente padronizados na escala 0,5 McFarland e diluídos de 1:100 e 1:20, foram adicionados nos poços que abrangiam da primeira a décima coluna.

Como controle do teste foram deixadas as colunas 11 e 12 da placa de microdiluição para verificação de esterilidade dos extratos, meio de cultura, fluconazol e viabilidade de crescimento.

Figura 2 Placa de 96 poços para a realização do teste de sinergismo.



Fonte: Autor

A interpretação dos resultados para definir as CIM foi realizada segundo Barchiese, Di Francesco, Compagnucci (1998) e Arai, Sugita, Nishikawa (2005), que a CIM mais alta encontrada ($>64\mu\text{g}$) fora convertida para a diluição anterior ($128\mu\text{g}$), mesmo esta não sendo testada para fins de calcular o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).

Quanto ao cálculo da FICI deu-se baseado na metodologia de Den Hollander, Mouton, Verbrugh (1998). Primeiro, foi calculada a Concentração Inibitória Fracionária (FIC) de cada linha, de acordo com a inibição de 50% verificada, seguida da realização da média para se obter a FICI seguindo a fórmula abaixo:

$$FIC_{flzX} = \text{CIM do fluconazol em combinação} / \text{CIM do fluconazol sozinho}$$

$$FIC_{extratoX} = \text{CIM do extrato em combinação} / \text{CIM do extrato sozinho}$$

$$FICI = \Sigma (FIC_{flzX} + FIC_{extratoX}) / n$$

X equivale a/as linha(as) (A-H) e n o número de linhas que foi possível estabelecer o poço em questão. Com o valor do FICI é possível definir se a interação foi sinérgica quando $FICI \leq 0,5$, indiferente em $4 > FICI > 0,5$ e antagônico em $FICI > 4$ (JOHNSON et al. 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS

Foram obtidos três extratos brutos: hexânico, acetato de etila e etanólico das partes de folha e fruto de *M. charantia* e folha de *L. cylindrica* evidenciados nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

A análise fitoquímica destes extratos evidenciou a presença de alcaloides em todos os extratos etanólicos de ambas as espécies. Já os mono e sesquiterpenos foram identificados nos extratos hexânicos e de acetato de etila.

Quanto aos triterpenos e esteroides estão presentes nos extratos hexânicos de folha de *M. charantia* e *L. cylindrica* e também no extrato de acetato de etila desta última espécie.

Comparando as quantidades de bandas, os flavonoides apresentam-se mais nos extratos de acetato de etila e etanólico das folhas de *L. cylindrica*, mas as saponinas estão ausentes, diferenciando dos extratos de *M. charantia*.

Tabela 6 Caracterização fitoquímica dos extratos de folha e fruto de *M. charantia*

Metabólitos Secundários	Extratos de folhas de <i>M. charantia</i>				Extratos dos frutos de <i>M. charantia</i>		
	Hexânico	Acetato de Etila	de	Etanólico	Hexânico	Acetato de Etila	Etanólico
Alcaloides	-	-		+	-	-	+
Mono e Sesquiterpenos	+++	++		-	+++	++	-
Triterpenos/ Esteroides	+++	-		-	-	-	-
Saponinas	-	-		+	-	-	+
Cumarinas	-	-		-	-	-	-
Flavonoides	-	+		++	-	+	++
Taninos hidrolizados	-	-		-	-	-	-
Taninos Condensados	-	-		-	-	-	-

Legenda: +++: acima de 5 bandas, ++: entre 3 e 5 bandas, +: entre 1 e 2 bandas, -: ausência de bandas

Tabela 7 Caracterização fitoquímica dos extratos brutos de *Luffa cylindrica*

Metabólitos Secundários	Extratos das folhas de <i>L. cylindrica</i>		
	Hexânico	Acetato de Etila	Etanólico
Alcaloides	-	-	+
Mono e Sesquiterpenos	+++	++	-
Triterpenos/ Esteroides	+++	++	-
Saponinas	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Flavonoides	-	++	+++
Taninos hidrolizados	-	-	-
Taninos Condensados	-	-	-

Legenda: +++: acima de 5 bandas, ++: entre 3 e 5 bandas, +: entre 1 e 2 bandas, -: ausência de bandas

Numa visão geral, alcaloides, mono e sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e flavonoides estão presentes em ambas as espécies, tendo saponinas ausente apenas em *L. cylindrica*.

A presença de alcaloides nos extratos de *M. charantia* corroboram com estudos na literatura. Em extratos etanólico a 70% e em éter etílico, foram evidenciados a presença deste metabólito e também de fenóis, esteroides, saponinas e catequinas (RODRIGUES et al., 2010). Porém, em um outro estudo feito com extrato aquoso de ramos e folhas, o metabólito alcaloide não foi identificado pela prospecção fitoquímica (LINS et al., 2012).

O grupo dos terpenoides são metabólitos bem identificados e presentes nesta espécie. Estes apresentam uma estrutura básica de seis unidades de isopreno com precursor comum – esqualeno acíclico de C₃₀, que podem ter presença de grupamentos álcoois e açúcares para formação de esteroides (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN, 2001; CHEN et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Uma pesquisa realizada com extrato metanólico das raízes de *M. charantia* identificou e caracterizou triterpenos do tipo cucurbitanos sendo cinco novas moléculas de cucurbitacinas denominadas de Kuguancinas as quais apresentaram atividade anti-HIV, testados por Chen et al. (2008).

Outro relato sobre os triterpenos, agora utilizando as folhas e ramos do melão-de-são-caetano, deu sequência a identificação de novos compostos triterpenos Kuguancinas. Nele foi utilizado extrato bruto etanólico seguido de partições em acetato de etila e n-Butanol que, após coluna cromatográfica de sílica gel e Sephadex LH-20, foram identificados quatorze novas moléculas de Kuguancina (CHEN et al., 2009).

Jiang et al. (2016) também conseguiram identificar novos triterpenos cucurbitanos das partes aéreas de *M. charantia*. Foram isolados e as estruturas de seis novas moléculas foram elucidadas a partir do extrato metanólico seguido de partição em solventes de característica

mais apolar, seguidas de separação em coluna cromatográfica.

Quanto aos extratos dos frutos de *M. charantia*., é interessante a ausência de triterpenos. Ao contrário deste resultado, a literatura traz pesquisas onde a presença deste metabólito é evidenciada inclusive com atividades biológicas *in vitro* testadas como a pesquisa realizada por Cao et al. (2011) onde eles conseguiram identificar e isolar duas novas moléculas cucurbitanos do tipo terpenoide a partir de extrato etanólico a 70%.

Um estudo feito por Zhang et al. (2014) identificou e realizou a elucidação estrutural de oito novos triterpenos cucurbitanos do tipo glicosídeos os quais denominaram de Kuguansaponinas, oriundas de extrato etanólico a 70% seguida de coluna cromatográfica em eluentes de etanol-água, acetato de etila e metanol-clorofórmio. Sendo quatro compostos novos e um já identificado posteriormente apresentaram forte ação hipoglicemiante.

Recentemente, Yue et al. (2019) isolaram mais três tipos de triterpenos cucurbitanos do tipo glicosídeos a partir de extrato etanólico 70% dos frutos verdes do melão que obtiveram atividade frente doenças hepáticas na pesquisa por eles realizada.

A variação destes compostos é discutível, haja vista que metabólitos secundários são produzidos segundo a necessidade da planta, sendo este já inerente de sua genética. Como a origem de coleta delas divergem, a presença ou ausência de compostos pode ser aceitável (PEREZ et al., 2019).

Quanto aos flavonoides, a ausência no extrato hexânico das folhas e dos frutos são justificáveis devido apresentam característica de molécula polar, não tendo afinidade por meios apolares como o hexânico (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN, 2001).

Eles se destacam pela ação antioxidante, sendo bem relatados na literatura. Nagarani; Abirami; Siddurajhu (2014) identificaram e quantificaram flavonoides e compostos fenólicos para averiguação nas variações da planta selvagem e da obtida comercialmente bem como a ação antioxidante.

Svobodova et al. (2016) também relataram presença de flavonoides e polifenóis. Eles identificaram três ácidos fenólicos e onze tipos de flavonoides glicosídicos, sendo seis destes pela primeira vez, em extrato hidroetanólico de partes aéreas de *M. charantia*.

Já He et al. (2018) verificaram a ação de prevenção de hiperlipidemia e estresse oxidativo induzidos por alimentação com alta quantidade de lipídeos a partir de extratos etanólicos das folhas de *M. charantia* em modelo animal.

Kim et al. (2018) ao testarem extrato etanólico de frutos secos de *M. charantia* identificaram que este obteve ação antioxidante e anti-apoptótica impedindo a morte celular de células neuronais em testes *in vitro* que induziam estresse oxidativo com o uso de peróxido

de hidrogênio.

Há também presença de flavonoides em frutos de outras espécies pertencentes a família Cucurbitaceae, como em *Cucurbita moschata* Duch e *Cucumis anguria* L. (MORETONI, 2008; AMARIZ et al., 2012)

Haja vista os trabalhos citados, estes corroboram com a presença de flavonoides nos extratos de folhas e frutos de *M. charantia* deste estudo, sendo este um metabólito importante para futuras pesquisas frente atividades anticâncer, anti-inflamatória e antilipidêmica.

Já os metabólitos secundários taninos condensados e hidrolizados e cumarinas, estes não foram evidenciados na fitoquímica dos extratos brutos tanto da folha quanto do fruto. Porém, pesquisas envolvendo extratos com solventes de polaridades semelhantes de partes aéreas, frutos e caule de espécies da família Cucurbitaceae evidenciaram tais metabólitos (MODI; KUMAR, 2014; CHEKROUN et al., 2015). Mas esta ausência pode ser justificada devido a fatores como local e período de coleta, visto que os metabólitos secundários são produzidos de acordo com a necessidade da planta (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

Em relação aos estudos fitoquímicos da folha de *L. cylindrica*, estes são escassos na literatura, mas a presença de metabólitos secundários é evidenciada em partes da planta como fruto e semente e em outras espécies pertencentes ao gênero *Luffa*, como a pesquisa de Muthumani et al (2010) que realizaram prospecção do extrato de éter de petróleo, benzeno, clorofórmio e etanol, obtidos por Soxhlet, de suas sementes e identificaram alcaloides, flavonoide, esteroides, glicosídeos e alguns metabólitos primários como açúcares e proteínas.

Uma pesquisa realizada com a espécie *Luffa echinata* Roxb. identificou na fitoquímica do extrato etanólico de partes aéreas, a presença de alcaloides, flavonoides e glicosídeos e também carboidratos e proteínas, que estão sendo cada vez mais isolados e identificados assim como suas atividades farmacológicas (MODI; KUMAR, 2014).

Já Ismail et al (2010) identificaram e isolaram do extrato de éter de petróleo dos frutos de *L. cylindrica* dois compostos esteroides, obtidos por método de extração exaustiva.

Outro estudo envolvendo os frutos, realizado por Du et al (2006), identificou a presença de compostos fenólicos e derivados cinâmicos com grande potencial antioxidante.

Uma outra espécie pertencente ao gênero *Luffa* – *Luffa acutalanga* Roxb – também apresentou flavonoides em sua análise fitoquímica, sendo identificado miricetina e quercetina no estudo de Miean e Mohamed (2001).

Saponinas não identificada neste estudo foi evidenciada em alguns na literatura inclusive de extrato etanólico de folhas de *L. cylindrica* (OYETAYO; OYETAYO; AJEWOLE, 2007) e em outras espécies como nos frutos de *Luffa operculata* (BROCK;

DUARTE; NAKASHIMA, 2003) e em *L. acutalanga* (NAGAO et al., 1991).

Quanto aos taninos, ausente nos extratos de folhas testados, estão presentes nos frutos de *L. acutalanga*, identificados por análise fitoquímica dos extratos metanólico, clorofórmio, acetato de etila e butílico testados como agentes antimicrobianos frente bactérias Gram-positivas e negativas (MUCHTARID; SUPRIYATNA, 2012).

Mas, Wadood et al. (2013) não identificaram algum metabólito secundário em *L. cylindrica* a partir de extrato aquoso de suas folhas coletadas em Mardan, no Paquistão.

Essas variações nos metabólitos secundários de uma mesma espécie, coletada em locais diversos pode ser explicada, visto que eles são produzidos de acordo com as necessidades da planta para adaptação e proteção. Variações de temperatura, sazonalidade da produção dos metabólitos, disponibilidade hídrica, estímulos mecânicos como herbivoria e o ataque de patógenos são alguns fatores que levam a planta a variar a produção destes componentes (GOOBO-NETO; LOPES, 2007).

Quanto a identificação dos metabólitos secundários presentes, é de suma importância para uma sequência de estudos da espécie. Eles auxiliam no combate a doenças e infecções mostrando cada vez mais que a fitoterapia é algo promissor. Testes *in vivo* comprovaram a ação anti-inflamatória, broncodilatadora e moderada ação antimicrobiana frente bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (MUTHUMANI et al., 2010) e ação antioxidante em testes *in vitro* de extratos de *L. cylindrica* obtidos de várias partes da planta (DU; XU; LI, 2006).

Um exemplo de importância da identificação dos metabólitos, com a sequência dos estudos farmacológicos está relacionado a espécie *L. operculata* que é componente do medicamento Sinustrat® para o tratamento de rinites, visto que esta apresenta uso popular para este fim (BALBANIL; MONTOVANI, 2002). Mas, a utilização deve ser feita com cuidado devido a identificação, em testes de modelo de epitélio respiratório, de alterações do epitélio com formação de edemas (MENON-MIYAKE et al., 2005).

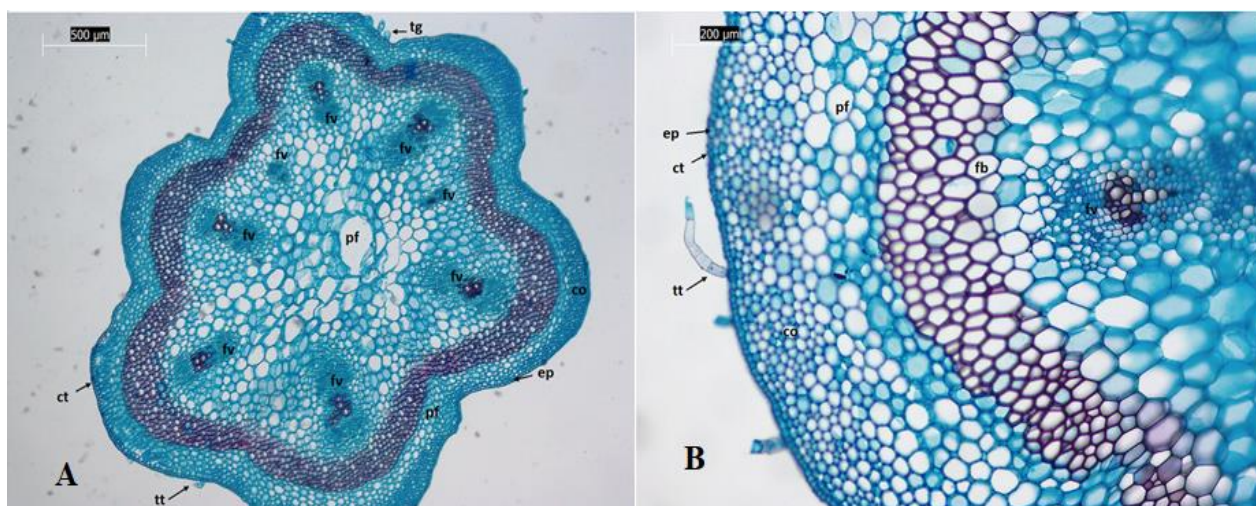
4.2 ANATOMIA FOLIAR DE *Luffa cylindrica*

Após a realização dos cortes anômicos pôde-se identificar os anexos epidérmicos, a forma e disposição dos feixes vasculares e a presença de tecidos de sustentação e proteção.

Iniciando pela gavinha (Figura 3), parte adaptativa do caule para auxiliar na subida em outras plantas e paredes como forma de trepadeira, esta apresenta formato poligonal, evidenciando tricomas tectores e glandulares anexados a uma epiderme uniestratificada coberta por uma fina camada de cutícula.

Adjacente a epiderme, verificou-se colênquima angular constituído por dez camadas seguido de parênquima fundamental. Em sequência, foi evidenciado esclerênquima, em cinco camadas, de que tem como função a proteção dos oito feixes vasculares bicolaterais presentes.

Figura 3 Secção transversal de gavinha de *L. cylindrica*



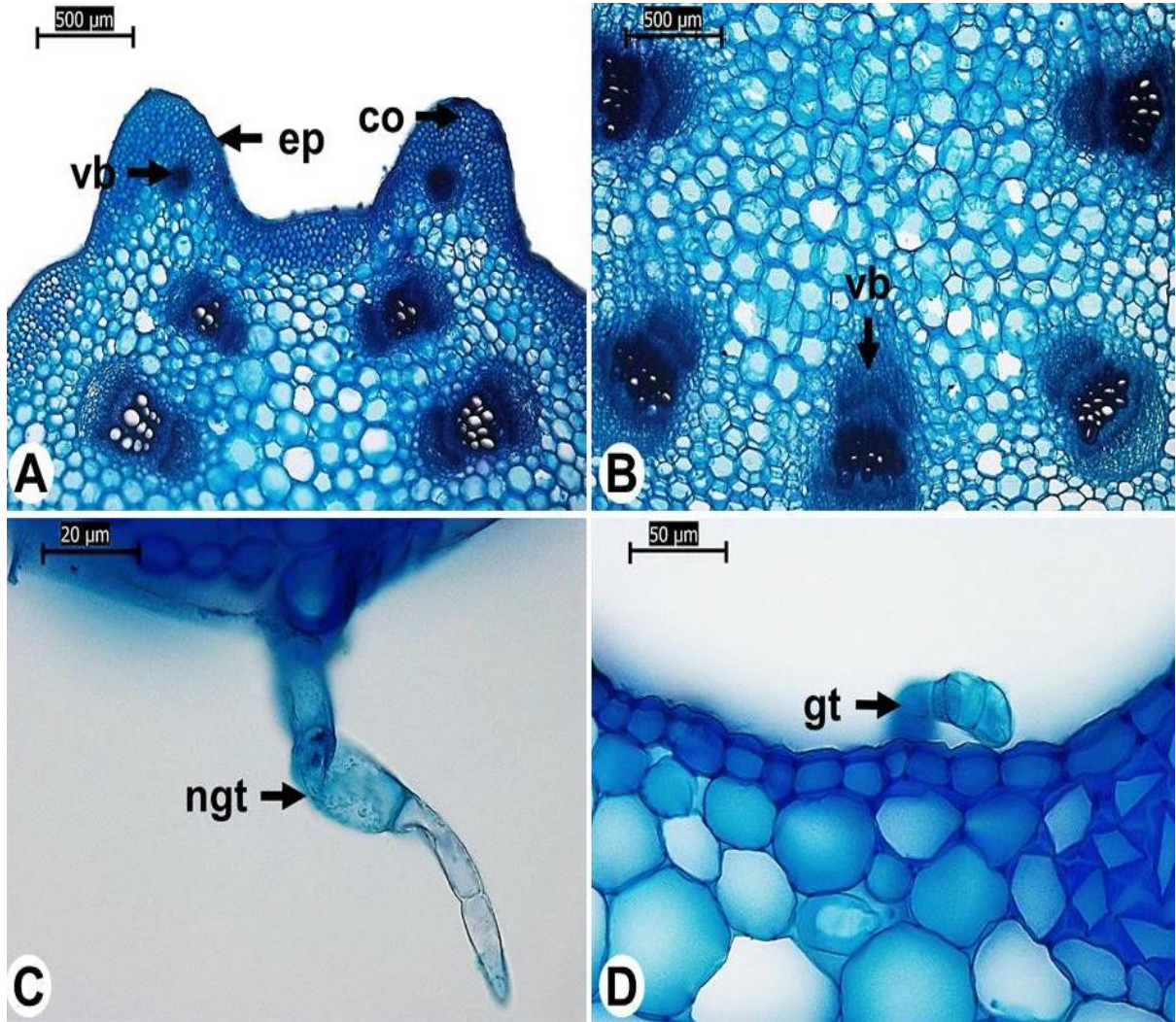
A- Aspecto geral da gavinha de *L. cylindrica*; B- Componentes da gavinha; Abreviaturas: co: colênquima; cu: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fl: floema; fv: feixe vascular; pf: parênquima fundamental; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; xl: xilema.

A anatomia da gavinha apresenta vários feixes vasculares bicolaterais, semelhantes a espécie *Luffa aegyptiaca* Miller. Elas também são encontradas em outros gêneros da família Cucurbitaceae como *Bryonia*, *Cucumis* e *Momordica* que auxilia no alcance de mais luz solar, fornecendo suporte mecânico (THAKUR et al., 2009; EKEKE, et al., 2015; MIZUNO et al., 2015; RUS et al., 2015).

O pecíolo (Figuras 4 e 5) apresenta formato canaletado com componentes semelhantes aos da gavinha, uma espessa camada de colênquima angular e vários feixes vasculares bicolaterais, protegidos por fibras de esclerênquima como encontrado nos gêneros *Bryonia* e

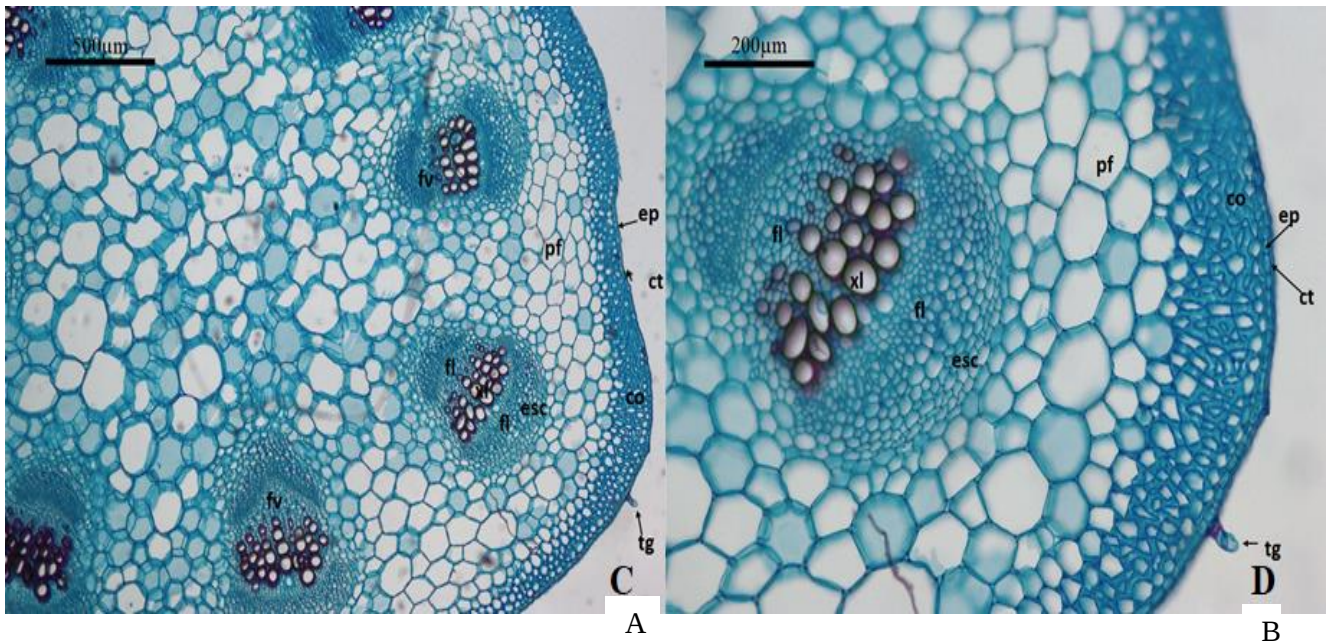
Lagenaria (SHA; JACOB, 1969; RUS et al., 2015) e também a presença de tricomas glandulares não relatado antes na literatura.

Figura 4 Secção transversal de pecíolo de *L. cylindrica*



A, B – visão geral. C – tricoma não glandular. D- tricoma glandular. co: colênquima, ep: epiderme; gt: tricoma glandular; ngt: tricoma não glandular, vb: vasos condutores.

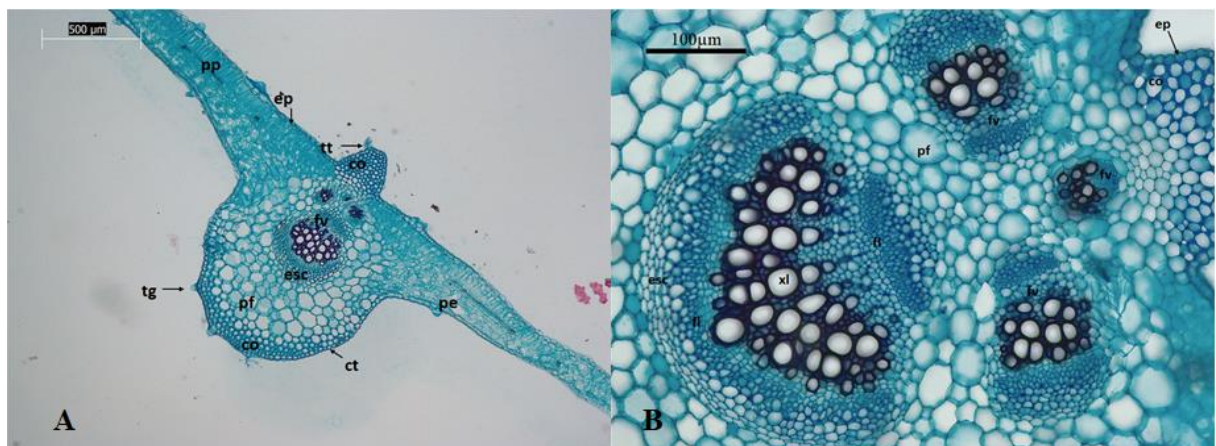
Figura 5 Secção transversal de pecíolo de *L. cylindrica* visão mais aproximada dos feixes vasculares.



A- Aspecto geral do pecíolo; B- Evidência do feixe vascular e dos componentes do córtex foliar. Abreviaturas: co: colênquima; cu: cutícula; ep: epiderme; esc: esclerênquima; fl: floema; fv: feixe vascular; pf: parênquima fundamental; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector; xl: xilema.

Quanto a lâmina foliar, sua nervura central (Figura 6) apresenta tricomas glandular e tector em anexo a epiderme. Na face superior e inferior há uma camada de colênquima descontínuo, para dar sustentação ao esqueleto foliar, seguido de parênquima fundamental. O cilindro central é constituído por quatro feixes vasculares bicolaterais protegidos por fibras de esclerênquima, sendo um de tamanho pequeno, dois médios e um outro maior que os demais.

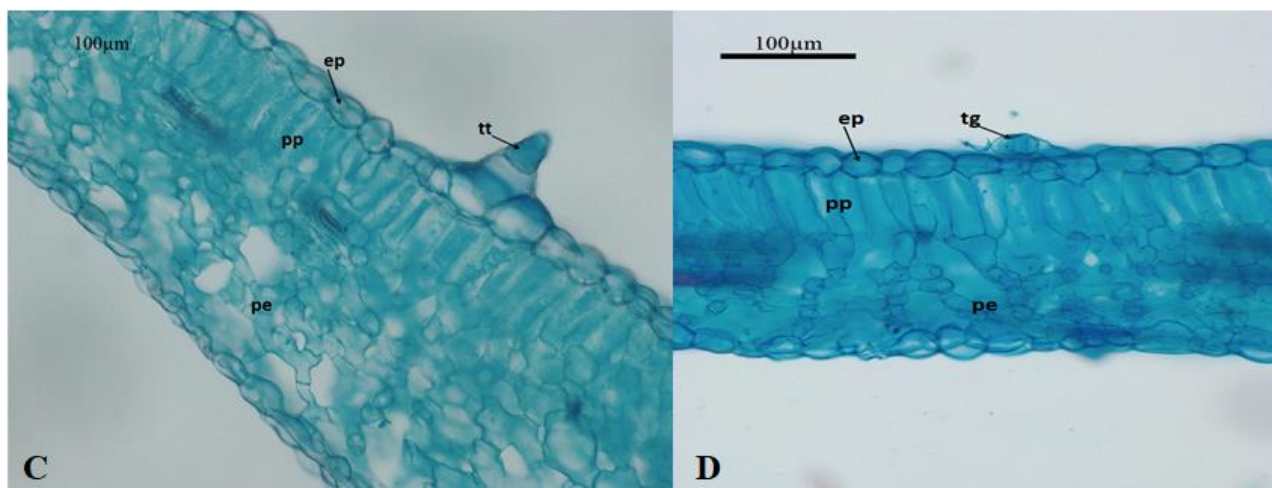
Figura 6 Secção transversal da nervura central de *L. cylindrica*.



A- Visão geral da nervura central; B- Nervura central evidenciando seus feixes vasculares. Abreviaturas: co: colênquima; ep: epiderme; fb: fibras; fl: floema; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliádico; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

O mesofilo (Figura 7) tem sua composição é heterogênea, com presença de parênquima paliádico e lacunoso. Apresenta anexos epidérmicos em tricomas tector e glandular e epiderme uniestratificada com fina camada de cutícula.

Figura 7 Secção transversal do mesofilo de *L. cylindrica*.

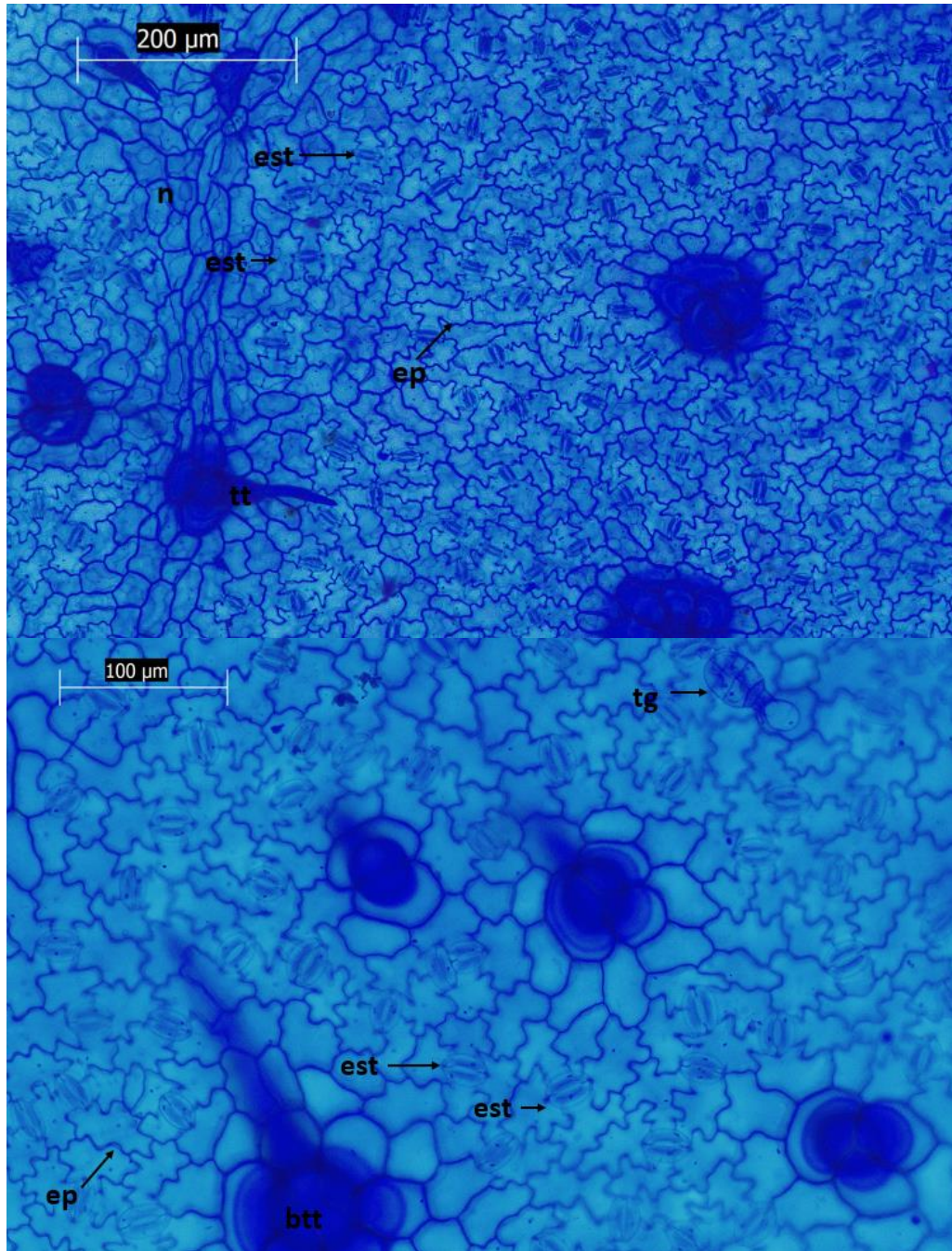


C- Mesofilo identificando os tipos de parênquimas e o tricoma tector; D- Tricoma glandular identificado na epiderme do mesofilo. Abreviaturas: ep: epiderme; pe: parênquima esponjoso; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliádico; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

Para os cortes paradérmicos, evidenciou-se que as células epidérmicas das faces abaxial e adaxial são distintas. A epiderme adaxial tem contornos poligonais, enquanto a abaxial apresenta contornos sinuosos acentuados. São anfiestomáticas, com presença de estômatos tetracíticos e anomocíticos em ambas as faces, bem como presença de tricomas glandulares com base unicelular e cabeça multicelular e tectores com base e corpo multicelulares (Figuras 8 e 9). A presença de tricomas em ambas as faces da folha são semelhantes aos encontrados por Alves et al. (2014) ao estudar *L. aegyptiaca*.

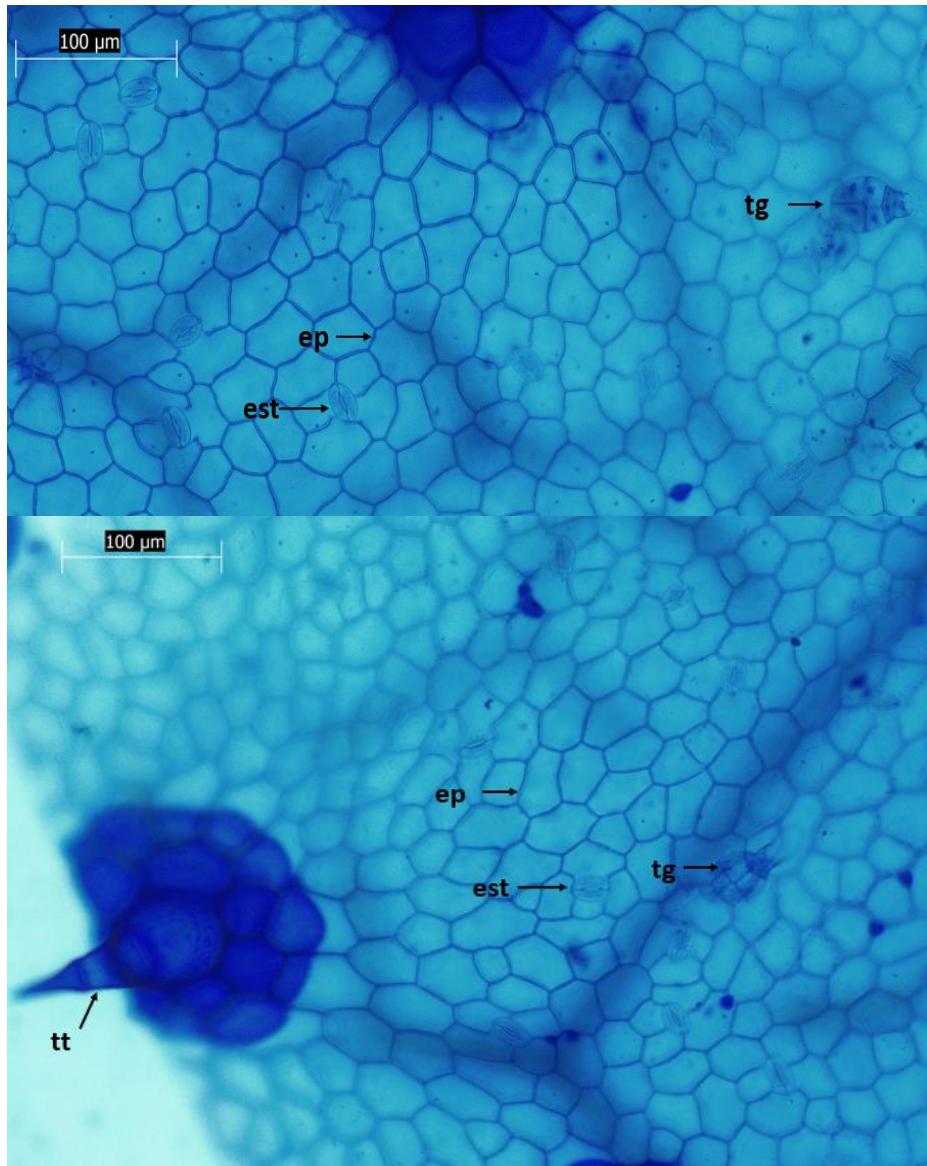
Porém, estudos com espécies pertencentes a família Cucurbitaceae observaram comportamento diferente dos estômatos. Brock, Duarte e Nakashima (2003) ao estudar a anatomia do epicarpo dos frutos de *Luffa operculata* (L.) identificou apenas estômatos anomocíticos. Coutinho, Florêncio, Aguiar et al. (2009) e Sá, Cadena, Padilha et al. (2018) identificaram estômatos anomocíticos em *M. charantia* apenas na face abaxial da lâmina foliar. Christodoulakis et al. (2011) para *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae) e Alves et al. (2014) com *L. aegyptiaca* identificaram apenas estômatos anomocíticos em ambas as faces da folha.

Figura 8 Secção paradérmica abaxial da lâmina foliar de *Luffa cylindrica*.



A, B - Face abaxial. Abreviaturas: btt: base do tricoma tector; ep: epiderme; est: estômato; n: nervura; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

Figura 9 Secção paradérmica adaxial da lâmina foliar de *Luffa cylindrica*.



C, D - Face adaxial. Abreviaturas: ep: epiderme; est: estômato; tg: tricoma glandular; tt: tricoma tector.

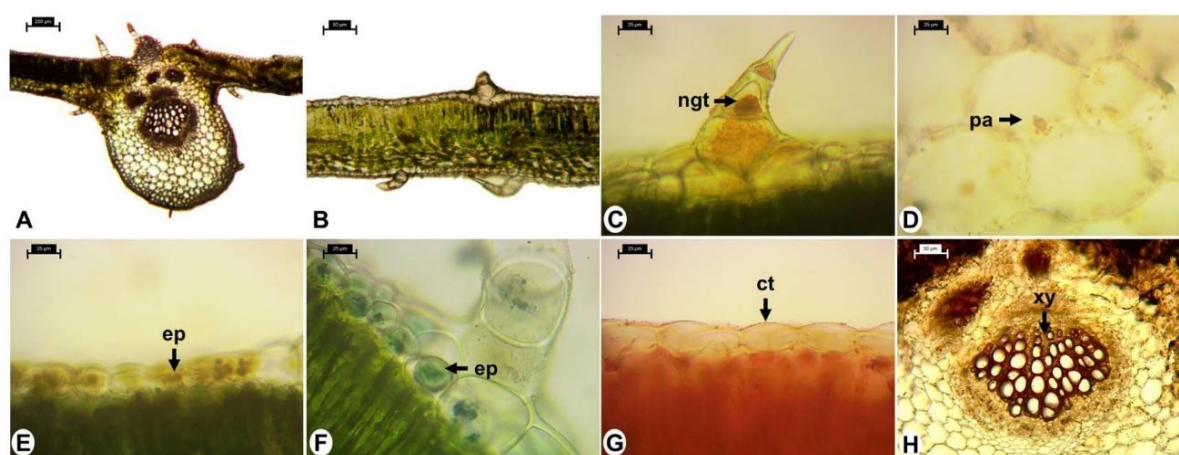
4.3 ESTUDO HISTOQUÍMICO DA LÂMINA FOLIAR DE *Luffa cylindrica*

A tabela 8 apresenta a descrição dos locais onde foram encontrados metabólitos de *L. cylindrica* e a figura 10 a imagem das lâminas foliares do estudo histoquímico.

Tabela 8 Reagentes utilizados para estudo histoquímico, identificação e localização dos metabólitos primários e secundários

Reagente	Metabólito secundário	Local de identificação
Lugol	Amido	Negativo
Floroglucinol	Lignina	Feixes de xilema na nervura central
Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	Tricomas
Tricloreto de antimônio	Triterpenos e esteroides	Epiderme
Dragendorff	Alcaloides	Nervura Central e Parênquima
Sudam III	Compostos lipofílicos	Cutícula
Ácido clorídrico (10%)	Cristais de oxalato	Negativo
Vanilina Clorídrica	Taninos condensados	Negativo
Nadi	Óleos essenciais	Epiderme

Figura 10 Análise histoquímica da lâmina foliar de *Luffa cylindrica*



A e B – controle; C – Dicromato de Potássio; D- Dragendorff; E- tricloreto de antimônio; F- Nadi; G- Sudam III; H- Floroglucinol. ct: cutícula, ep: epiderme, ngt: tricomas não glandular, pa: parenquima, xy: xilema.

Quanto a histoquímica, não foram evidenciados taninos condensados, amido e cristais de oxalato. Os cristais de oxalato podem ser evidenciados em outras espécies da família Cucurbitaceae como *Momordica charantia* com cristais prismáticos, *Zehneria capillacea*, *Coccinia barteria*, *Cucumis sativus* com cristais em formato de drusas (EKEKE et al., 2015).

A lignina foi evidenciada nos vasos xilemáticos da nervura central. Semelhante a pesquisa de Rus et al. (2015) que também evidenciou lignina nos vasos xilemáticos de *B. alba*, além de evidenciar em outros locais como raiz e caule e também de Sá, Cadena, Padilha et al. (2018) analisando a histoquímica de *M. charantia*.

Compostos fenólicos, triterpenos e esteroides observados nos tricomas e epiderme,

respectivamente, são presentes na espécie *L. cylindrica* e responsáveis por atividades biológicas da planta (DU; CUI, 2007; KAO et al., 2012; UMEHARA et al., 2018).

Os compostos lipofílicos foram visualizados na cutícula, sendo esta formada por uma camada delgada sobre a epiderme das faces da lâmina foliar, pecíolo e gavinha. Os resultados corroboram com os obtidos por Ekeke et al. (2015) ao estudar gavinhas e caules de espécies da família Cucurbitaceae, mas divergem de Christodoulakis et al. (2011) onde não evidenciou compostos lipofílicos ao realizar estudos hitoquímicos de *E. elaterium*.

Quanto ao óleo essencial, identificado na epiderme foliar da *L. cylindrica*, este também foi encontrado em sementes de *M. charantia* e apresentou atividades antimicrobianas frente bactérias e fungos (FANG; NG, 2016).

Assim, após os estudos fitoquímicos e hitoquímicos de *L. cylindrica*, estes corroboraram entre si, identificando os metabólitos primários e secundários existentes sendo a hitoquímica uma análise complementar para identificação *in loco* dos metabólitos identificados na fitoquímica das folhas.

4.4 LEVEDURAS DE GÊNERO *CANDIDA* E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *M. charantia* E *L. cylindrica*

Para a realização das atividades antifúngicas foram obtidos seis isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida* da Micoteca URM -UFPE e uma cepa ATTC para a realização dos testes de microdiluição em placa e sinergismo que podem ser verificados na Tabela 9.

Tabela 9 Espécies de leveduras utilizadas nos testes de atividade antifúngica

Número da linhagem	Espécies	Fonte de obtenção
URM 5840	<i>Candida krusei</i>	Sangue
URM 7443	<i>Candida parapsilosis</i>	Não informado
URM 7427	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
URM 6393	<i>Candida glabrata</i>	Sangue
URM 5717	<i>Candida guilliermondii</i>	Sangue

Espécie *C. parapsilosis* ATCC de numeração 22019 foi utilizada como cepa controle para os testes de microdiluição em placa e sinergismo (CLSI).

4.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA

O teste de microdiluição em placa foi determinante na verificação da atividade dos extratos brutos de *M. charantia* e *L. cylindrica* frente os isolados fúngicos.

Os resultados das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos extratos brutos das folhas e frutos de *M. charantia* e das folhas de *L. cylindrica* podem ser verificados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 Atividade antifúngica de extratos brutos da folha de *Momordica charantia* frente isolados clínicos do gênero *Candida*

Cepas	Extratos e CMI (µg/mL)			Controle Negativo	Droga Padrão	
	Extrato Hexânico	Extrato de Etila	Acetato	Extrato Etanólico	RPMI + Extrato	Fluconazol
<i>C. parapsilosis</i> URM 7443	>64	>64		>64	-	0,25
<i>C. krusei</i> URM 5840	16	64		16	-	4
<i>C. parapsilosis</i> URM 7427	>64	>64		>64	-	1
<i>C. glabrata</i> URM 6393	>64	>64		>64	-	0,5
<i>C. guilliermandii</i> URM 5717	>64	>64		>64	-	4
<i>C. parapsilosis</i> ATCC – 22019	>64	>64		>64	-	4

Legenda: - ausência de crescimento

Tabela 11 Atividade antifúngica de extratos brutos do fruto de *Momordica charantia* frente isolados clínicos de gênero *Candida*

Cepas	Extratos e CMI (µg/mL)				Controle Negativo	Droga Padrão
	Extrato Hexânico	Extrato de Etila	Acetato	Extrato Etanólico	RPMI + Extrato	Fluconazol
<i>C. parapsilosis</i> URM 7443	>64	>64		>64	-	0,25
<i>C. krusei</i> URM 5840	>64	>64		>64	-	4
<i>C. parapsilosis</i> URM 7427	>64	>64		>64	-	1
<i>C. glabrata</i> URM 6393	>64	>64		>64	-	0,5
<i>C. guilliermandii</i> URM 5717	>64	>64		>64	-	4
<i>C. parapsilosis</i> ATCC – 22019	>64	>64		>64	-	4

Legenda: - ausência de crescimento

Dentre os extratos das folhas de *M. charantia* testados, apenas obteve-se resultado para o isolado de *C. krusei* URM 5840. Como espécies de *C. krusei* apresentam resistência intrínseca ao fluconazol este resultado pode levar a pesquisas futuras mais promissoras (Pfaller; Diekema; Gibbs et al., 2008).

Os demais extratos não obtiveram resultados semelhantes aos isolados testados. Estes não foram capazes de inibir o crescimento dos fungos em 50.

Com relação aos resultados da CMI dos extratos brutos do fruto, podemos verificar a ausência de potencial antifúngico na concentração testada para os isolados selecionados e para a ATCC.

Schmourlo, Mendonça-Filho, Alviano et al. (2004) utilizaram extrato aquoso de partes aéreas frescas do melão, obtidas por decocção. Esta foi testada pelo método de difusão em ágar para verificação do halo de inibição e verificada sua CMI através de diluições em meio BHI. O extrato apresentou atividade frente isolado clínico de *C. albicans* com halo de 16 mm de diâmetro e 150ng/mL de concentração mínima inibitória.

O extrato etanólico das folhas testado por Prabhakar, Kumar, Rajendran et al (2008) frente isolados clínicos fúngicos originários de lesões orais não obtiveram resultados de inibição frente *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* com concentrações de 100 mg/mL utilizados em teste de disco difusão.

Este resultado corrobora com os testes negativos que se obteve ao utilizar a técnica de disco difusão para verificação dos halos de inibição. Visto que pela técnica de microdiluição em poços o extrato etanólico obteve ação inibitória de 50% no isolado de *C. krusei* URM 5840, pode-se predizer que o contato direto entre o extrato e o inóculo pode proporcionar interação mais eficaz do que por intermédio de um material que precise difundir o extrato para uma possível ação antifúngica.

Outro estudo realizado por Braca, Siciliano, D'Arrigo et al (2008), testaram *M. charantia* não com extratos de folhas ou frutos, mas com o óleo essencial obtido de suas sementes. Mas, este não obteve inibição satisfatória sendo sua CMI >500 µg/mL.

Mwambete (2009) realizou testes antimicrobianos com extrato de frutos e folhas de *M. charantia* e apenas os extratos metanólico e éter de petróleo dos frutos obtiveram atividade frente *Candida albicans* ATCC 90028, porém em concentrações mais elevadas do que as testadas no presente estudo, numa variação de 0,4 a 1 mg/µL.

Santos et al. (2012), ao testar extratos de frutos de *M. charantia* obtidos por maceração em etanol a 95%, observou resultados de inibição frente cepas de leveduras de gênero *Candida*, mas estas em CMIs superiores a 1024 µg/mL para inibição total do crescimento fúngico.

Entretanto, Yaldiz, Sekeroglu, Kulak et al. (2015) ao testarem extrato etanólico do fruto frente *C. albicans* ATCC 10231, este não mostrou resultado significativo frente a análise estatística realizada pelo estudo.

Analisando os resultados e os relatos na literatura, verifica-se que não se segue um

padrão das ações antifúngicas dos extratos de fruto e folha do melão, mesmo estes extraídos com solventes de polaridades semelhantes. Uma observação a ser feita é que foram testados, além dos isolados clínicos, a cepa ATCC 22019 que também não mostrou sensibilidade aos extratos testados. Isto pode ser justificado por existir variações genéticas específicas dentro das espécies estudadas, que podem alterar os resultados dos estudos realizados nas diversas partes do mundo (PERLIN; RICHARDSON; IZQUIERDO, 2017).

Alguns fatores também podem interferir nestes resultados, como a técnica utilizada para realizar o teste antifúngico, a técnica de extração e o local e período de coleta do material vegetal. Algo verificável é que a composição dos extratos brutos das folhas e dos frutos apresentam ausência de triterpenos e esteroides no extrato hexânico do fruto, que pode ser algo que interfira nos resultados da ação antifúngica (SOUZA; MANGANOTTI; SOUZA et al., 2011; SANTOS; MATIAS; SOBRAL-SOUZA et al., 2012; LUCENA -FILHO; LIMA; MEDEIROS et al., 2015).

Outra observação a ser analisada, sendo esta oriunda da literatura, podemos prever que, a ausência dos triterpenos nos frutos desta pesquisa e sua presença nos relatos na literatura com tipos cucurbitanos triterpenoides e glicosídicos podem ter afetado a ação dos extratos do fruto frente os isolados clínicos testados (CAO; ZHANG; CUI et al., 2011; ZHANG; LIAW; HSIAO et al., 2014) e a possível presença de triterpenos do tipo cucurbitanos tetracíclicos e kuguancinas pode ter levado uma melhor ação dos extratos das folhas (CHEN; LIU; LU et al., 2009; JIANG; PENG; YU et al., 2016).

Quanto aos extratos obtidos das folhas de *L. cylindrica*, podemos observar que os extratos hexânico, acetato de etila e etanólico obtiveram ação inibitória de 50% frente o isolado de *C. krusei* URM 5840, e que o extrato de acetato de etila e etanólico tiveram ação frente *C. glabrata* URM 6393.

Tabela 12 CIM Extrato bruto de folhas de *Luffa cylindrica*

Cepas	Extratos e CMI (µg/mL)				Controle Negativo	Droga Padrão
	Extrato Hexânico	Extrato de Etila	Acetato	Extrato Etanólico	RPMI + Extrato	Fluconazol
<i>C. parapsilosis</i> URM 7443	>64	>64		>64	-	0,25
<i>C. krusei</i> URM 5840	64	32		4	-	4
<i>C. parapsilosis</i> URM 7427	>64	>64		>64	-	1
<i>C. glabrata</i> URM 6393	>64	4		4	-	0,5
<i>C. guilliermandii</i> URM 5717	>64	>64		>64	-	4
<i>C. parapsilosis</i> ATCC – 22019	>64	>64		>64	-	4

Legenda: - ausência de crescimento

Ao analisarmos o perfil fitoquímico dos extratos de *L. cylindrica* e *M. charantia*, observa-se que há apenas semelhança quanto a presença de mono, sesquiterpenos nos extratos hexânicos acetato de etila e de triterpenos e esteroides nos extratos hexânicos das folhas de *L. cylindrica* com os do fruto de *M. charantia*, quanto a presença de bandas.

Quanto aos flavonoides nos extratos de bucha, podemos predizer que este pode ter um efeito potencializador frente alguns isolados testados, apresentando CIM menores que os extratos do melão, visto que a ação inibitória de seus extratos não foi verificada frente *C. glabrata* URM 6393.

A ação antifúngica de *L. cylindrica* é pouco relatada na literatura. Mas esta pode ser evidenciada em extratos oriundos de outras partes como os do fruto estudado por Ismail, Russain, Dastagir et al. (2010) que testaram o extrato de éter de petróleo dos frutos frente isolados de *C. albicans* pelo método de disco difusão, obtendo moderada ação fungicida.

Também é vista sua ação antifúngica, não por metabólitos secundários, mas sim por metabólito de origem primária. O peptídeo Luffacilina, isolado das sementes de *L. cylindrica* apresentou atividade frente *Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum*, fungos não-leveduriformes, por meio da técnica de difusão em disco, sendo os micélios inibidos pela solução de proteína adicionadas ao disco (PARKASHI; NG; TSO, 2002).

Ahmad e Khan (2017) ao realizarem testes antifúngicos com frutos de *L. cylindrica* e *M. charantia* evidenciaram que o extrato bruto metanólico e a fração de butanol tiveram pouca atividade frente *C. albicans* e nenhuma atividade frente *C. glabrata*. Diferente da fração n-Hexânica que apresentou ótima ação frente *C. albicans* e nenhuma para *C. glabrata*, quanto a fração de clorofórmio e acetato de etila, estes não tiveram atividade frente os dois fungos testados.

Apesar de as ações de *L. cylindrica* ser pouco estudada na literatura, a ação dela está presente nos fungos leveduriformes e nos filamentosos. As atividades evidenciadas mostraram que metabólitos primários como a Lufacillina como os extratos dos frutos de *L. cylindrica* apresentaram atividade antifúngica tanto nos fungos leveduriformes, responsáveis por infecções relacionadas a assistência em âmbito hospitalar, bem como em fungos filamentosos -*Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum* – que são responsáveis por atingir culturas agrícolas de várias plantas, inclusive leguminosas, como *Vigna radiata* L. ocasionando perdas econômicas (SUN; SUN; ZHU et al., 2019).

4.6 TESTE DE TABULEIRO DE XADREZ

Analisando os resultados do teste de tabuleiro de xadrez (*Checkerboard Test*), este nos trouxe bons resultados para isolados que não inibidos pelos extratos anteriormente, mas também resultados não satisfatórios para aqueles já existentes pela ação dos extratos isoladamente (Figura 11).

O extrato hexânico de *L. cylindrica* após o teste obteve ação antagônica frente os isolados de *K. krusei* (5840) e *C. glabrata* (6393) e efeito sinérgico para a ATCC, sendo este último uma boa resposta devido a ação isolada deste extrato não ter inibido seu crescimento.

Quanto aos extratos de acetato de etila e etanólico da folha de *L. cylindrica*, estes apresentaram resultados sinérgicos frente os isolados de *C. parapsilosis* (7443, 7427) e ATCC. Eles também não tiveram resultados de inibição isoladamente.

Já o extrato de acetato de etila e etanólico da folha de *M. charantia* apresentaram resultados antagônicos ao isolado 5840. Esta ação antagônica não foi favorável quando utilizado em associação com o fluconazol, visto que isoladamente obtiveram CIM 50% de 64 µg/mL e 16 µg/mL frente este fungo, respectivamente.

Interessante verificar que o extrato hexânico de *L. cylindrica* contém triterpenos e esteroides que são uma classe de metabólitos que apresentam atividade sinérgica na literatura frente fungos do gênero *Candida*, porém neste estudo eles não foram um fator diferencial para que ocorresse sinergia (DOKE et al., 2014).

Quando analisamos a atividade dos extratos de acetato de etila e etanólico de *L. cylindrica* e de *M. charantia*, é provável que a ação sinérgica dos extratos de *L. cylindrica* tenha ocorrido devido a presença dos metabólitos secundários triterpenos e esteroides para os de acetato e a ausência de saponinas para o etanólico, sendo estes ausente (triterpenos) e presente (saponinas) nos extratos de *M. charantia*, mas estudos mais aprofundados são necessários para comprovar tal hipótese.

Figura 11 Teste de Sinergismo dos extratos de *L. cylindrica* e *M. charantia*.

Análise da FICI (modificado de Den Hollander et al. 1998 e Barchiesi et al. 1998)							
Isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.	MIC do fluconazol (µg/mL)	FICI dos extratos de <i>L. cylindrica</i> e <i>M. charantia</i>					
		LH	LA	LE	FLH	FLA	FLE
URM 7443	0,25	1,73	0,3	0,5	1,64	2,38	0,75
URM 5840	4	9	4	1,98	10	10	10
URM 7427	1	0,79	0,15	0,29	Ausência de inibição de 50%	1,25	1,03
URM 6393	0,5	6,2	1	3,87	6	9,79	3,85
ATCC 22019	4	0,15	0,16	0,1	Ausência de inibição de 50%	Ausência de inibição de 50%	0,5
URM 5717	4	Ausência de crescimento fúngico, desconsiderado a análise.					

Legenda: LH – Extrato hexânico folha *L. cylindrica*. LA – Extrato acetato de etila folha *L. cylindrica*. LE – Extrato etanólico folha *L. cylindrica*. FLH - Extrato hexânico folha *M. charantia*. FLA - Extrato acetato de etila folha *M. charantia*. FLE - Extrato etanólico folha *M. charantia*. FRH - Extrato hexânico fruto *M. charantia*. FRA - Extrato acetato de etila fruto *M. charantia*. FRE - Extrato etanólico fruto *M. charantia*. Análise do sinergismo: Sinérgica quando $FICI \leq 0,5$, indiferente em $4 > FICI > 0,5$ e antagônico em $FICI > 4$ (JOHNSON et al. 2004).

Sinergismo em $FICI \leq 0,5$, indiferente em $4 > FICI > 0,5$ e antagônico em $FICI > 4$ (Johnson et al. 2004).

5 CONCLUSÃO

A farmacobotânica realizada proporcionou a identificação de componentes não identificados antes na literatura sobre a espécie de *Luffa cylindrica*, que contribue para a correta identificação da espécie e seu controle de qualidade.

Os estudos fitoquímicos possibilitaram a identificação dos metabólitos primários e secundários presentes nas espécies coletadas no município de Aliança e, a histoquímica da lâmina foliar de *Luffa cylindrica* mostrou os locais onde os metabólitos de forma a auxiliar pesquisas futuras envolvendo tais componentes.

Os testes antifúngicos mostraram que os extratos de ambas as espécies apresentaram inibição do crescimento em alguns isolados testados e proporcionam estudos futuros mais aprofundados nesta perspectiva.

O teste de sinergismo apresentou bons resultados com a presença de ação sinérgica dos extratos em isolados clínicos que, quando utilizados separadamente do fluconazol, não tiveram ação inibitória.

Por fim, mesmo os extratos apresentando ação inibitório frente os isolados testados, não podemos afirmar que a presença de metabólitos secundários é o fator determinante para esta ação e que mais estudos são necessários para que os compostos responsáveis por tal atividade sejam identificados.

REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, M. S.; INDHUMATHY, R.; DEVI, G. S.; KUMAR, D. S.; SUDARVOLI, M.; NANDINI, R. (2011). Evaluation of the Wound Healing and Anti-Inflammatory Activity of Whole Plant of *Luffa Cylindrica* (Linn). in Rats. **Pharmacologyonline**. v. 3, p. 281-285.
- ADEWUYI, A.; PEREIRA, F. V. (2017) Isolation and surface modification of cellulose from underutilized *Luffa cylindrica* sponge: A potential feed stock for local polymer industry in Africa. **Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences**. v. 24, p. 39-45.
- AHMAD, B.; KHAN, A. A. (2013). Antibacterial, antifungal and phytotoxic activities of *Luffa cylindrica* and *Momordica charantia*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 22, p. 1593-1599.
- ALAM, S.; ASAD, M.; ASDAQ, S. M. B.; PRASAD, V. S. (2009). Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.132, p. 464-469.
- ALATOOM, A.; SARTAWI, M.; LAULOR, K.; EBDELWARTH, L.; THOMSEN, J.; NUSAIR, A.; MIRZA, I. (2018). Persistent candidemia despite appropriate fungal therapy: first case of *Candida auris* from the United Arab Emirates. **Int J Infect Dis**. v. 13, n. 70, p. 36-37.
- AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; SCHÖDER, G.; LINDEQUIST, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 657-666.
- ALVES, R. M.; INACIO, E. M.; MONQUERO, P. A.; MENECHIN, S. P.; HIRATA, A. C. S. (2014). Leaf-surface characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds. **RBCA**. v.9, n. 4, p. 550-555.
- AMARIZ, A.; LIMA, M. A. C. de.; NUNES, E. D.; BORGES, R. M. E.; ALVES, R. E. (2012). Quantificação de compostos bioativos em frutos de acessos de *Cucurbita moschata*. **Horticultura Brasileira**. v. 30, n. 2, p. S7087-S7093.
- ANDERSON, J. B. (2005). Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews | Microbiology**. v. 3, p. 547-556.
- ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J. W. et al. (2012). Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **Clin Infect Dis**. v. 54, p. 1110-1122.
- ARAI, R.; SUGITA, T.; NISHIKAWA, A. (2005). Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 38-41.
- ARKADER, R.; CARVALHO, W. B. (2006). Novos agentes para infecções fúngicas invasivas em pediatria. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v. 52, n. 1, p. 1-16.

BAL, K. E.; BAL, Y.; COTE, G.; CHAGNES, A. (2012). Morphology and antimicrobial properties of *Luffa cylindrica* fibers/chitosan biomaterial as micro-reservoirs for silver delivery. **Materials Letters**. v. 79, p. 238-241.

BALBANIL, A. P. S.; MONTOVANI, J. C. (2002). “*Natural*” medicines for allergic rhinitis. **Rev. bras. Alerg. Immunopatol.** v. 25, n. 6, p. 204-209.

BANSOND, S.; RAI, M. (2008). Antifungal activity of essentials oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**. v. 3, n. 2, p. 81-88.

BARCHIESI, F. DI FRANCESCO, L. F.; COMPAGNUCCI, P.; ARZENI, D.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. (1998). In-vitro interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 41, n. 1, p. 59-65.

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

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. (2004). Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 159-172.

BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. (2018). Activity of CD101, a long-acting echinocandin, against clinical isolates of *Candida auris*. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 90, n. 3, p. 196-197.

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

BRASIL. MS elabora **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS**. DAF/SCTIE/MS – RENISUS; Ministério da Saúde. Brasília, Distrito Federal, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf

BRASIL. **PORTARIA Nº 971, DE 03 DE MAIO DE 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2ª edição, 2015.

BRASIL. (2010). **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. (2008). Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileiro de Ciências Farmacêuticas**. v.44, n. 4, p. 631-636.

BRILHANTE, R. S.N.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; CAVALCANTE, C. S. P.; MEIRELES, T. E. F.; SIDRIM, J. J. C. (2005). Onychomycosis in Ceará (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 2, p. 131-135.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. (2012). The use of phytotherapy and medicinal plants in primary healthcare units in the cities of Cascavel and Foz do Iguaçu – Paraná: the viewpoint of health professionals. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 17, n. 10, p. 2675-2685.

BRUNKE, S.; HUBE, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. **Cell Microbiol.** v. 5, n. 15, p. 701-8.

BRUNTON, Laurence L. et al (Edt.). **Goodman & Gilman manual de farmacologia e terapêutica.** Porto Alegre: AMGH, 2010.

BROCK, A. C. K.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. (2003). Estudo morfo-anatômico e abordagem fitoquímica de frutos e sementes de *Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae. **Visão acadêmica.** v. 4, n. 1, p. 31-37.

BUKATSCH, F. (1972). Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos.** v.61, n.8, p.255.

CALVO, B.; MELO, A. S.; PEROZO-MENA, A.; HERNANDEZ, M.; FRANCISCO, E. C.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. (2016). First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **J. Infect.** v. 73, n. 4, p. 369-74.

CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B.; PIATTI, E. (2012). Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. **Food Chemistry.** v. 131, p. 493-495.

CAO, J. Q.; ZHANG, Y.; CUI, J. M.; ZHAO, Y. Q. (2011). Two new cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. **Chinese Chemical Letters.** v. 22, p. 583-586.

CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. (2017). *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Res Microbiol.** v. 168, n. 9-10, p. 802-810.

CHAVES, T. P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. **2012.**

CHEKROUN, E.; BENARIBA, N.; ADIDA, H.; BECHIRI, A.; AZZI, R.; DJAZIRI, R. (2015). Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae: *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. **Asian Pac Trop Dis.** Clinical Laboratory Standards Institute. v. 5, n. 8, p. 632-637.

CHEN, J.; TIAN, R.; QIU, M.; LU, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. (2008). Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry.** v. 69, p. 1043–1048.

CHEN, J. C.; LIU, W. Q.; LU, L.; QIU, M. H.; ZHENG, Y. T.; YANG, L. M.; ZHANG, X. M.; ZHOU, L.; LI, Z. R. (2009). Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*. **Phytochemistry**. v. 70, p. 133-140.

CHRISTODOULAKIS, N. S.; KOLLIA, K.; FASSEAS, C. (2011). Leaf structure and histochemistry of *Ecballium elaterium*(L.) A. Rich. (squirting cucumber). **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**. v. 203, n. 3, p. 191-197.

Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – Third Edition**. Document M27-A3. v. 28, n. 14, 2008.

Clinical Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement**. Document M100-S19. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. (2003). Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 5, p. 599-607.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; DE ALMEIDA MONFARDINI, L. P.; CUNHA, A. K.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. (2007). Estudo observacional prospectivo de candidemia em São Paulo, Brasil: taxa de incidência, epidemiologia e preditores de mortalidade. **Infect. Hosp Controle. Epidemiol.** v: 28, p. 570 -576.

COUTINHO, D.F.; FLORÊNCIO, J.C.; AGUIAR, L.R.; RODRIGUES, K.A.F.; VILANOVA, C.M.; BORBA, E.R.C. (2009) Estudo farmacobotânico das folhas de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Visão Acadêmica**. v.10, p.7-17.

COWEN, L. E. (2008). The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews | Microbiology**. v.6, p. 187-198.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHMA, K. (2018). *Candida albicans* – Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microb Pathog.** v. 117, p. 128- 138.

DAVID R, CARDE J.P. (1964). Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser D*. v. 258, p.1338-1340.

DEN HOLLANDER, J. G.; MOUTON, J. W.; VERBRUGH, H. A. (1998). Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 744-748.

DHIMAN, K.; GUPTA, A.; SHARMA, D.K.; GILL, N. S.; GOYAL, A. (2012). A review on the Medicinally Important Plants of the Family Cucurbitaceae. **Asian Journal of Clinical Nutrition**. v. 4, n. 1, p. 16-26.

DOKE, S. K.; RAUT, J. S.; DHAWALE, S.; KARUPPAYIL, S. M. (2014). Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. **J Gen Appl Microbiol.** v.60, p. 163-168.

DU, Q.; CUI, H. (2007). A new flavone glycoside from the fruits of *Luffa cylindrica*. **Fitoterapia.** v. 78, p. 609-610.

DU, Q.; XU, Y.; LI, L.; ZHAO, Y.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P. (2006). Antioxidant Constituents in the Fruits of *Luffa cylindrica* (L.)Roem. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, p. 4186-4190.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases.** v. 3, p. 685-702.

EKEKE, C.; AGOGBUA, J.; OKOLI, B. E. (2015). Comparative anatomy of tendril and fruit stalk in Cucurbitaceae Juss. from Nigeria. **Int. J. Bio. Chem. Sci.** v. 9, n. 4, p. 1875-7887.

EMAMI, S.; SHOJAPOUR, S.; FARAMARZI, M. A.; SAMADI, N.; IRANNEJAD, H. (2013). Synthesis, *in vitro* antifungal activity and *in silico* study of 3-(1,2,4-triazol-1-yl)flavanones. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 66, p.480–488.

FANG, E. F.; NG, T. B. (2011). Bitter gourd (*Momordica charantia*) is a cornucopia of health: a review of its credited anti diabetic, anti-HIV, and antitumor properties. **Curr. Mol. Med.** v. 11, n. 5, p. 417-36.

FANG, E. F.; NG, T. B. (2016). **Bitter Gourd (*Momordica charantia*) Oils.** Essencial oils in food preservation, flavor and safety. p. 253-257.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar. **Multiciência.** 2006.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. (2007). Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Ver. Bras. Enferm.** v. 61, n. 2, p. 201-8.

GABE, M.1968. **Techniques histologiques.** Paris: Masson & Cie.

GAO, W.; LING, J.; ZHONG, X.; LIU, W.; ZHANG, R.; YANG, H. et al. (1993). Characterization and mechanism studies. **FEBS Letters.** v. 347, p. 257-260.

GARCIA-EFFRON, G.; CHUA, D. J.; TOMADA, J. R.; DIPERSIO, J.; PERLIN, D. A.; GHANNOUM, M.; BONILLA, H. (2010). Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. **Antimicrobio Agents Chemother.** v. 54, p. 2225–2227.

GEISSMAN, T. A. (1964). New Substances of plant origin. **Annu. Rev. Pharmacol.** v.4, p. 305-316.

GIOVANNINI, P.; HOWES, M. J. R.; EDWARDS, S. E. (2016). Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 26, n. 184, p. 58-71.

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

HE, Q.; LI, Y.; LI, H.; ZHANG, P.; ZHANG, A.; YOU, L.; WU, H.; XIAO, P.; LIU, J. (2018). Hypolipidemic and antioxidant potential of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf in mice fed on a high-fat diet. **Park J Pharm Sci**. v. 31, n. 5, p. 1837-1843.

HSIAO, P. C.; LIAW, C. C.; HWANG, S. Y.; CHENG, H. L.; ZHANG, L. J.; SHEN, C. C.; HSU, F. L.; KUO, Y. H. (2013). Antiproliferative and hypoglycemic cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. **J. Agric. Food Chem.** v. 61, n. 12, p. 2979-86.

ILBOUDO, O.; BONZI, S.; TAPSOBA, I.; SOMDA, I.; BONZI-COULIBALY, Y. L. (2016). *In vitro* antifungal activity of flavonoid diglycosides of *Mentha piperita* and their oxime derivates against two cereals fungi. **C. R. Chimie**. v. 19, p. 857-867.

ISMAIL, M.; HUSSAIN, M.; DASTAGIR, M. G.; BLLAH, M.; QUADER, A. (2010). Phytochemical and antimicrobial investigation of *Luffa cylindrica*. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**. v. 9, n. 5, p. 327 - 332.

JENSEN, W. A. (1962). Botanical histochemistry, principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco.

JEYADEVI, R.; SIVASUDHA, T.; RAMESHKUMAR, A.; SANGEETHA, B.; ANANTH, D. A.; ASEERVATHAM, S. B. (2012). Nutritional constituents and medicinal values of *Momordica cymbalaria* (Athalakkai) – A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. S456- S461.

JIANG, Y.; PENG, X. R.; YU, M. Y.; WAN, L. S.; ZHU, G. L.; ZHAO, G. T.; ZHOU, L.; QIU, M. H.; LIU, J. (2016). Cucurbitane-type triterpenoids from the aerial parts of *Momordica charantia* L. **Phytochemistry Letters**. v. 16, p. 164-168.

JOHANSEN, D. A. (1940). **Plant Microtechnique**. Mc Graw Hill, New York.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, n. 3, p. 693-715.

JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1993.

KAO, T. H.; HUANG, C. W.; CHEN, B. H. (2012). Functional components in *Luffa cylindrica* and their effects on anti-inflammation of macrophage cells. **Food Chemistry**. v. 135, p. 386-395.

KAUR, I.; PURI, M.; AHMED, Z.; BLANCHET, F. P.; MANGEAT, B.; PIGUET, V. (2013). Inhibition of HIV-1 Replication by Balsamin, a Ribosome Inactivating Protein of *Momordica balsamina*. **Plos One**. v. 8, p. e73780.

KAUR, R.; DHAKAD, M. S.; GOYAL, R.; HAQUE, A.; MUKHOPADHYAY, G. (2016). Identification and Antifungal susceptibility testing of *Candida* species: a comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. **J. Glob. Infect. Dis.** v. 8, n. 4, p. 139-146.

KIM, K. B.; LEE, S.; KANG, I.; KIM, J. (2018). *Momordica charantia* Ethanol Extract Attenuates H₂O₂-Induced Cell Death by Its Antioxidant and Anti-Apoptotic Properties in Human Neuroblastoma SK-N-MC Cells. **Nutrients**. v. 10, p. 1368-1385.

KIM, H. J.; PARK, J. H. Y.; KIM, J. K. (2014). Cucurbitacin – I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. **Chemico-Biological Interactions**. v. 2019, p. 1-8.

KIMURA, M.; PARK, S.; SAKAI, R.; YAMASAKI, N.; FUNATSU, G. (1997). Primary structure of 6.5k-Arginine/Glutamate-rich polypeptide from the seeds of Sponge Gourd (*Luffa cylindrica*). **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 61, n. 6, p. 984-988.

KOOSHKI, P.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MAHMOUDABADI, A. Z. The patterns of colonization and antifungal susceptibility of *Candida*, isolated from preterm neonates in Khorramabad, South West of Iran. **J Mycol Med**. 2018.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. (1997). **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR, Rio de Janeiro.

KRAUTER, D. (1985). **Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte**. **Mikrokosmos**. v.74, p.231-233.

LEROY, O. L.; GANGNEUX, J. P.; MONTRAVERS, P.; MIRA, J. P.; GOUIN, F.; SOLLET, J. P.; CARLET, J.; REYNES, J.; ROSENHEIM, M.; REGNIER, B.; LORTHOLARY, O. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Crit Care Med**. v. 37, n. 5, p. 1612- 1618.

LI, F.; YANG, X.; XIA, H.; ZENG, R.; HU, W.; LI, Z.; ZHANG, Z. (2003) Purification and characterization of Luffin P1, a ribosome-inactivating peptide from the seeds of *Luffa cylindrica*. **Peptides**. v. 24, p. 799-805.

LI, P.; ZHU, N.; HU, M.; WU, H.; YU, T.; WU, T.; ZHANG, D.; SUN, Z.; YANG, J.; MA, G.; XU, X. (2017). New cucurbitane triterpenoids with cytotoxic activities from *Hemsleya penxianensis*. **Fitoterapia**. v. 120, p. 158-163.

LINS, S. R. O.; OLIVEIRA, S. M. A.; XAVIER, H. S.; RANDAU, K. P. (2012). Prospecção fitoquímica de extratos de plantas e controle da podridão peduncular em manga. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 7, n. 1, p. 97-103.

- LIU, C. H. YEN, M. H.; TSANG, S. F.; GAN, K. H.; HSU, H. Y.; LIN, C. N. (2010). Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. **Food Chemistry**. v. 118, p. 751-756.
- LU, P. L.; LIU, W. L.; LO, H. J.; WANG, F. D.; KO, W. C.; HSUEH, P. R.; HO, M. W.; LIU, C. E.; CHEN, Y. H.; CHEN, Y. C.; CHUANG, Y. C.; CHANG, S. C. (2017). Are we ready for the global emergence of multidrug-resistant *Candida auris* in Taiwan? **Journal of the Formosan Medical Association**. p. 1-9.
- LUCENA -FILHO, J. H. S.; LIMA, R. F.; MEDEIROS, A. C. D.; PEREIRA, J. V.; GRAVILLE-GARCIA, A. F.; COSTA, E. M. M. B. (2015). Antimicrobial potential of *Momordica charantia* L. against multiresistant standart species and clinical isolates. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. v. 16, n. 11, p. 854-858.
- Luffa* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17090>>. Acesso em: 08 Junho 2018.
- MALAIKOSHUNDAN, B.; VASEEHARAN, B.; VIJAYAKUMAR, S.; SUDHAKARAN, R.; GOBI, N.; SHANTHINI, G. (2016). Antibacterial and antibiofilm assessment of *Momordica charantia* fruit extract coated silver nanoparticle. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 8, p. 189-196.
- MACE, M. Z.; HOWELL, C. R. (1974). Histochemistry and identification of condensed tanin precursors in roots of cotton seedlings. **Can. J. Bot.**, v.52, p.2423-2426.
- MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3 ed. Fortaleza: UFC, 2007.
- MENON-MIYAKE, M. A.; SALDIVA, P. H. N.; LORENZI-FILHO, G.; FERREIRA, M. A.; BUTUGAN, O.; OLIVEIRA, R. C. (2005). Efeitos de *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato de rã: aspectos histológicos. **Ver Bras Otorrinolaringol**. v. 71, n. 2, p. 132-8.
- METCALFE, C. R.; CHALK, K. L. (1950). **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Clarendon, Oxford.
- MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. **J Agric Food Chem**. v. 49, p. 3106-3112.
- MIZUNO, S.; SONODA, M.; TAMURA, Y.; NISHINO, E.; SUZUKI, H.; SATO, T.; OIZUMI, T. (2015). Chiba Tendril-Less locus determines tendril organ identity in melon (*Cucumis melo* L.) and potentially encodes a tendril-specific TCP homolog. **BSJ**. v. 128, n. 6, p. 941-951.
- MODI, A.; KUMAR, V. (2014). *Luffa echinata* Roxb. – A review on its ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological perspective. **Asian Pacific Jounal of Tropical Disease**. v. 4, n. 1, p. S7-S12.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida*

species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. v. 2, p. 254-259.

MORETONI, C. B. **Avaliação fitoquímica e das atividades antioxidante, citotóxica e hipoglicemiante dos frutos de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**. 2008.

MUCCI, M. J.; CUESTAS, M. L.; LANDANBURU, M. F.; MUJICA, M. T. (2017). Prevalence of *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida Africana* in pregnant women suffering from vulvovaginal candidiasis in Argentina. **Rev Iberoam Micol**. v. 34, n. 2, p. 72-76.

MUTHUMANI, P.; MEERA, R.; MARY, S.; JEENAMATHEW; DEVI, P.; KAMESWARI B et al. (2010). Phytochemical Screening and Anti inflammatory, Bronchodilator and Antimicrobial activities of the Seeds of *Luffa cylindrica*. **RJPBCS**. v. 1, n. 4, p. 11-22.

MWAMBETE, K. D. (2009). The *in vitro* antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: A Tanzania medicinal plant. **Afr Health Sci**. v. 9, n. 1, p. 34-39.

NAGARANI, G.; ABIRAMI, A.; SIDDHURAJU, P. (2014). A comparative study on antioxidant potentials, inhibitory activities against key enzymes related to metabolic syndrome, and anti-inflammatory activity of leaf extract from different *Momordica* species. **Food Sci. Hum**. v. 3, p. 36–46.

NAGAO, T.; TANAKA, R.; IWASE, Y.; HANAZONO, H.; OKABE, H. (1991). Studies on the constituents of *Luffa acutangula* Roxb. I. Structures of acutosides A--G, oleanane-type triterpene saponins isolated from the herb. **Chem Pharm Bull**. v. 39, n. 3, p. 599-606.

NAMI, S.; AGHEBATI-MALEKI, A.; MOROVATI, H.; AGHEBATI-MALEKI, L. (2019a). Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 110, p. 857-868.

NAMI, S.; MOHAMMADI, R.; VAKILI, M.; KHEZRIPOUR, K.; MIRZAEI, H.; MOROVATI, H. (2019b). Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 109, p. 333-344.

NG, Y. M.; YANG, Y.; SZE, K. H. ZHANG, X.; ZHENG, U. T.; SHAW, P. C. (2011) Structural characterization and anti-HIV-1 activities of arginine/glutamate-rich polypeptide Luffin P1 from the seeds of sponge gourd (*Luffa cylindrica*). **Journal of Structural Biology**. v. 174, p. 164-172.

NICOLA, A. M., ALBUQUERQUE, P., PAES, H. C., FERNANDES, L., COSTA, F. F., KIOSHIMA, E. S. et al. (2018). *Antifungal drugs: New insights in research & development*. **Pharmacology & Therapeutics**. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.10.008

OBOH, I. O.; ALUYOR, E. O. (2009). *Luffa cylindrica* – an emerging cash crop. **Afr. J. Agric. Res**. v. 4, n. 8, p. 684-688.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report of the International Conference on Primary Health Care, jointly sponsored by the World Health Organization and the United

Nations Children's Fund, Alma-Ata – URSS, 6 to 12 September 1978.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEL=KO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 2, p. 301-307.

OYETAYO, F. L.; OYETAYO, V. O.; AJEWOLE, V. (2007). Phytochemical profile and antibacterial properties os the seed and leaf of rhe Luffa Plant (*Luffa cylindric*). **J. Pharmacol. Toxicol.** v.2, n. 6, p. 586-589.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. (2017). Software for molecular docking: a review. **Biophys Rev.** v. 9, p. 91-102.

PALAMTHODI, S.; LELE, S. S. (2014). Nutraceutical applications of gourd family vegetables: *Benincasa hispida*, *Lagenaria siceraria* and *Momordica charantia*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**. v. 4, n. 1, p. 15-21.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K.; J. R. CALANDRA, T. F.; EDWARDS, J. E. et al. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.** v. 48, p. 503-35.

PARIS, H. S.; TADMOR, Y.; SCHAFFER, A. A. **Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber**. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 2^a ed., v. 3, 2017.

PARKASH, A.; NG, T. B.; TSO, W. W. (2002). Isolation and characterization of luffacylin, a ribosome inactivating peptide with anti-fungal activity from sponge gourd (*Luffa cylindrica*) seeds. **Peptides**. v. 23, p. 1019-1024.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L. et al. (2008). Global Antifungal Surveillance Group Candida krusei, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol.** v. 6, n. 2, p. 515-521.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. (2010). Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **J Clin Microbiol.** v. 48, p. 1366- 77.

PRABHAKAR, K.; KUMAR, L. S.; RAJENDTAN, S.; CHANDRASEKARAN, M.; BHASKAR, K.; SAJIT KHAN, A. K. (2008). Antifungal activity of Plant Extracts against *Candida* species from oral lesions. **Idian J Pharm Sci.** v. 70, n. 6, p. 801-803.

PEREZ, J. L.; JAYAPRAKASHA, G. K.; ROSBY, K.; PATIL, B. S. (2019). Evaluation of bitter melon (*Momordica charantia*) cultivars grown in Texas and lebelos of various phytonutrients. **J Sci Food Agric.** v. 99, n. 1, p. 379-390.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect Dis.** v. 17, n. 12, p. e383-e392.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v. 20, n. 4, p. 751-762.

POZNER, R. (1998). Revision del Genero Cucurbitella (Cucurbitaceae). **Missouri Botanical Garden.** v. 85, n. 3, p. 425-439.

PUTIGNANI, L.; DEL CHIERICO, F.; ONORI, M.; MANCINELLI, L.; ARGENTIERI, M.; BERNASCHI, P.; COLTELLA, L.; LUCIGNANO, B.; PANSANI, L.; RANNO, S.; RUSSO, C.; URBANI, A.; FEDERICIBD, G.; MENICHELLA, D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems Online Publication.** 2010.

RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. (2016). Promise of bitter melon (*Momordica charantia* bioactives in cancer prevention and therapy. **Semin Cancer Biol.** v. 40, n. 41, p. 116-129.

RANDAU, K. P. et. al. (2004). Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 14, n. 2, p. 89-96.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia.** Elsevier, 7ª ed. 2012.

RICHARDSON, R. R.; RICHARDSON, M. D. (2017). Systemic fungal infections. **Medicine.** v. 42, n. 12, p. 757-762.

RAVEN | **Biologia vegetal** / Ray F. Evert e Susan E. Eichhorn; revisão técnica Jane Elizabeth Kraus; tradução Ana Claudia M. Vieira... [et.al.]. – 8. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

RAY, R. B.; RAYCHOUDHURI, A.; STEELE, R.; NERURKAR, P. (2010). Bitter Melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. **Cancer Res.** v. 70, n. 5, p. 1925-1931.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. (2010). Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Cad. Pesq.** v. 17, n. 2, p. 69-76.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. (2010). Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caiocó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Ver. Bras. Pl. Med.** v. 12, n. 1, p. 31-42.

RUS, L. M.; IELCIU, I.; PALTINEAN, R.; VLASE, L.; STEFANESCU, C.; CRISAN, G. (2015). Morphological and Histo-Anatomical Study of *Bryonia alba* L. (Cucurbitaceae). **Not Bot Horti Agrobi.** v. 43, n. 1, p. 47-52.

SÁ, R.D.; CADENA, M.B.; PADILHA, R.J.R.; ALVES, L.C.; RANDAU, K.P. (2018). Anatomical study and characterization of metabolites in leaves of *Momordica charantia* L. **Pharmacogn. J.** v. 66, p. 1-4.

SALIHU, T.; OLUKUNLE, J. O.; ADENUBI, O. T.; MBAOJI, C.; ZARMA, M. H. (2018). Ethnomedicinal plant species commonly used to manage arthritis in North-West Nigeria. **South African Journal of Botany.** v. 118, p. 33-43.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; TINTINO, S. R.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; GUEDES, G. M. M.; SANTOS, F. A. V.; SOUSA, A. C.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. (2012). Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. **Pharmaceutical Biology.** v.50, n. 2, p.162-166.

SAV, H.; BARIS, A.; TURAN, D.; ANTINBAS, R.; SEN, S. (2018). The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. **Microbial Pathogenesis.** v. 116, p. 257-262.

SASS, J. E. (1951). **Botanical microtechnique.** The Iowa State College Press, Ames, Second Edition.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. (2005), Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 96, p. 563-568.

SHAH, J. J.; JACOB, R. (1969). Development and Structure of Phloem in the Petiole of *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. And *Momordica charantia* L. **Annals of Botany.** v. 33, p. 855-863.

SILVA, D. R.; SARDI, J. C. O.; FREIRES, I. A.; SILVA, A. C. B.; ROSALEN, P. L. (2019). *In silico* approaches for screening molecular targets in *Candida albicans*: A proteomic insight into drug discovery and development. **European Journal of Pharmacology.** v. 842, p. 64-69.

SILVA, G.S. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies de *Candida* de interesse médico. **UEPB. 2012.**

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (2001). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* **3.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC.**

SIVASANKARI, B.; ANANDHARAJ, M.; GUNASEKARAN, P. (2014). A new flavone glycoside from the fruits of *Luffa cylindrica*. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 153, p. 408-423.

SOUZA, M. F.; MANGANOTTI, S. A.; SOUZA, P. N. S.; MEIRA, M. R.; MATOS, C. C.; MARTINS, E. R. (2011). Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenácea* DC. **Biometas.** v. 24, n. 1, p. 9-14.

SOUZA, V. C. FLORES, T. B.; LORENZI, H. (2013). **Introdução à botânica: morfologia.**

[S.I: s.n.].

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. (2016). Nosocomial Fungal Infections. Epidemiology, infection control, and prevention. **Infect Dis Clin N Am.** v. 30, p. 1023-1052.

SUN, F.; SUN, S.; ZHU, L.; DUAN, C.; ZHU, Z. (2019). Confirmation of *Fusarium oxysporum* as a causal agent of mung bean wilt in China. **Crop Protection.** v. 117, p. 77-85.

SVOBODOVA, B.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; HELENO, S.; ALVES, M. J.; WALCOTT, S.; BITTOVA, M.; KUBAN, V.; FERREIRA, I. C. F. R. (2016). Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. **Industrial Crops and Products.** v. 95, p. 365-373.

THAKUR, G. S.; BAG, M.; SANODIYA, B. S.; BHADAURIYA, P.; DEBNATH, M.; PRASAD, G. B. K. S.; BISEN, P. S. (2009). *Momordica balsamina*: A Medicinal and Nutraceutical Plant for Health Care Management. **Current Pharmaceutical Biotechnology.** v. 10, p. 667-682.

The Plant List, disponível em: <http://www.theplantlist.org/>, acessado em 11 de março de 2018.

UMEHARA, M.; YAMAMOTO, T.; ITO, R.; NONAKA, S.; YANAE, K.; SAI, M. (2018). Effects of phenolic constituents of *Luffa cylindrica* on UVB-damaged mouse skin and on dome formation by MDCK I cells. **Journal of Functional Foods.** v. 40, p. 477-483.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. (2005). Plantas Medicinais: Cura segura? **Quim. Nova.** v. 28, n. 3, p. 519-528.

VAZQUEZ, J. A.; MICELI, M. H.; ALANGADEN, G. (2013). Invasive fungi infections in transplant recipients. **Ther Adv Infect Dis.** v. 1, n. 3, p. 85-105.

VIGNON, M. R.; GEY, C. (1997). Isolation, ¹H and ¹³C NMR studies of (4-Omethyl-d-glucurono)-d-xylans from lu€ a fruit @bres, jute bast @bres and mucilage of quince tree seeds. **Carbohydrate Research.** v. 307, p. 107-111.

VILLALOBOS, J. M.; CASTRO, J. A.; AVILÉS, A.; PELÁEZ, M. C.; SOMOGYI, T.; SANDOVAL, L. (2016). *Candida parapsilosis*: a major cause of bloodstream in a tertiary care hospital in Costa Rica. **Rev. chil. Infectol.** v. 33, n. 2, p. 159-165.

WADOOD, A.; GHUFRAN, M.; JAMAL, S. B.; NAEEM, M.; KHAN, A.; GHAFFAR, R. et al. (2013). Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. **Biochem Anal Biochem.** v. 2, n. 4, p. 1-4.

WANG, Q.; WU, X.; SHI, F.; LIU, Y. (2019). Comparison of antidiabetic effects of saponins and polysaccharides from *Momordica charantia* L. in STZ-induced type 2 diabetic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 109, p. 744-750.

WANG, S.; ZHENG, Y.; XIANG, F.; LI, S.; YANG, G. (2016). Antifungal activity of

Momordica charantia seed extracts toward the pathogenic fungus *Fusarium solani* L. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 24, n. 4, p. 881-887.

YALDIZ, G.; SEKEROGLU, N.; KULAT, M.; DEMIRKOL, G. (2015). 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.

YANAGIDA, A. (2000). Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutants streptococci. **Journal Agricola Food Chemical**. v. 48, p. 5666- 5671.

YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S.; WANG, J.; NARUT, T.; OKUYAMA, T. (1991). Structures of two new fibrinolytic saponins from the seed of *Luffa cylindrica* Roem. **Chem. Pharm. Bull.** v. 39, n. 5, p. 1185-1188.

YUE, J.; SUN, Y.; XU, J.; CAO, J.; CHEN, G.; ZHANG, H. et al. (2019). Cucurbitane triterpenoids from the fruit of *Momordica charantia* L. and their anti-hepatic fibrosis and anti-hepatoma activities. **Phytochemistry**. v. 157, p. 21-27.

ZHANG, L. J.; LIAW, C. C.; HSIAO, P. C.; HUANG, H. C.; LIN, M. J.; LIN, Z. H.; HSU, F. L.; KUO, Y. H. (2014). Cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia* and their hypoglycemic and cytotoxic activities. **Journal of Functional Food**. v.6, p. 564-574.

ZHU, N.; SUN, Z.; HU, M.; LI, Y.; ZHANG, D.; WU, H.; TIAN, Y.; LI, P.; YANG, J.; MA, G.; XU, X. (2018). Cucurbitane-type triterpenes from the tubers of *Hemsleya penxianensis* and their bioactive activity. **Phytochemistry**. v. 147, p. 49- 56.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. (2016). Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **J Mycol Med**. v. 37, n. 1, p. 1-19.

ZUBAIR, M. F.; ATOLANI, O.; IBRAHIM, S. O.; OGUNTOYE, O. S.; ABDULRAHIM, H. A.; OYEGOKE, R. A. et al. (2018). **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. v. 9, p. 35-41.

APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA *PHARMACOGNOSY JOURNAL*

Anatomical and histochemical characterization of leaves of *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.

ABSTRACT

Background: *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. (Cucurbitaceae), is an herbaceous plant used for food as compose salads and do sweets, and also used in traditional medicine as treat parasitic infections and intestinal diseases. Although this information's, there are not many relates about anatomic characters for use in your quality control. **Objective:** The aim was investigating the anatomical forms of petiole and leaf blade and characterizing the metabolites in leaves of *L. clindrica*. **Materials and Methods:** Semipermanent histological slides were prepared for analysis of petiole and leaf blade in optical microscopy. Histochemical tests were also performed in the leaf blade. **Results:** The anatomical characterization revealed information about the type of trichomes, cuticle, vascular bundles and arrangement of the tissues that determine the botanical identity of this specie. It was also identifying, for the first time, the presence of two types of trichomes in both of leaves faces. The histochemistry allowed determining which metabolites secondaries are in leaf blade and also their location. **Conclusion:** The study described new characters for *L. cylindrica* and the results provide support to quality control of the specie.

KEYWORDS: Anatomy, Cucurbitaceae, Histochemistry, *Luffa cylindrica*.

INTRODUCTION

The Cucurbitaceae family have 134 genera and encompass over 965 species. The principal's genera about to the family are *Bryonopsis*, *Citrullus*, *Corallocarpus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Momorica* and *Trichosanthes* and they can be cultivated in the tropics,

subtropics, arid and temperate regions ^[1-3].

The cucurbits are herbaceous. The most species having large leaves, the foliage is whole or deep lobes, and they can be climbing or creeping plants. The flowers having different sexes and a big inferior ovary. After fertilization the ovary develops into a fruit processing hard exocarp, fleshy mesocarp, and endocarp ^[4-5].

Many cucurbits' fruits have been ingredient for the culinary and are eaten when immature or mature by salads, sweets, desserts or pickled ^[6-7].

Besides being food, some species are often used for popular medicine in the world as in America, Africa and Asia continent too ^[12-13]. The principal parts to treat icterus, gastric diseases, diabetes, sinusitis, lung diseases, fever, cancer, inflammation, skin infections, pain, among others are roots, leaves, fruits and seeds ^[8-13].

Brazil has some cucurbit genera. Around 28 genera and 160 species in all states in the country. Among them, *Luffa* is a genus it's had two species: *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. and *Luffa operculata* (L.) Cogn ^[14].

Luffa cylindrica is popularly known as Bucha and its root, leaves, fruits and seeds have been used to treat infections and gastric disease ^[15-16]. The leaves are used in Guinea Bissau to intestinal diseases, fever and malaria to ^[17], in Bolivia to anuria ^[18], in Cuba to parasitic infections ^[19], in India to indigestion ^[20] and in Pakistan as laxative ^[21]. Although the medicine use of Cucurbitaceae family has been much reported in the literature, the quality control about many members of its family are not too reported. Therefore, the aim of this research is made the anatomic and histochemistry characterization of leaves of *L. cylindrica* in order to expend pharmacobotanic information about species of Cucurbitaceae family.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Adult leaves of specimens of *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem., Cucurbitaceae, were collected in the city of Aliança, Pernambuco, Brazil. A voucher specimen was deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima of the Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), under collection number 92082.

Anatomical characterization

Cross-sections were obtained by hand, using a common razor blade, at the middle region of petiole and leaf blade fixed in FAA 50 ^[22]. Leaf blade paradermal sections were also performed on the adaxial and abaxial surfaces. All sections were clarified with sodium hypochlorite solution (50%) ^[23], followed by washing with distilled water. Lastly, cross-sections were stained with safranin and astra blue ^[24] and paradermal sections were stained with methylene blue (1%) ^[25]. Semipermanent histological slides were prepared to contain the sections of botanical material, following common plant anatomy procedures ^[22,26]. The analysis of the slides was conducted using a polarized microscope (Leica DM750M) coupled with a digital camera (Leica ICC50 W), through images processed in software (LAS EZ).

Histochemical characterization

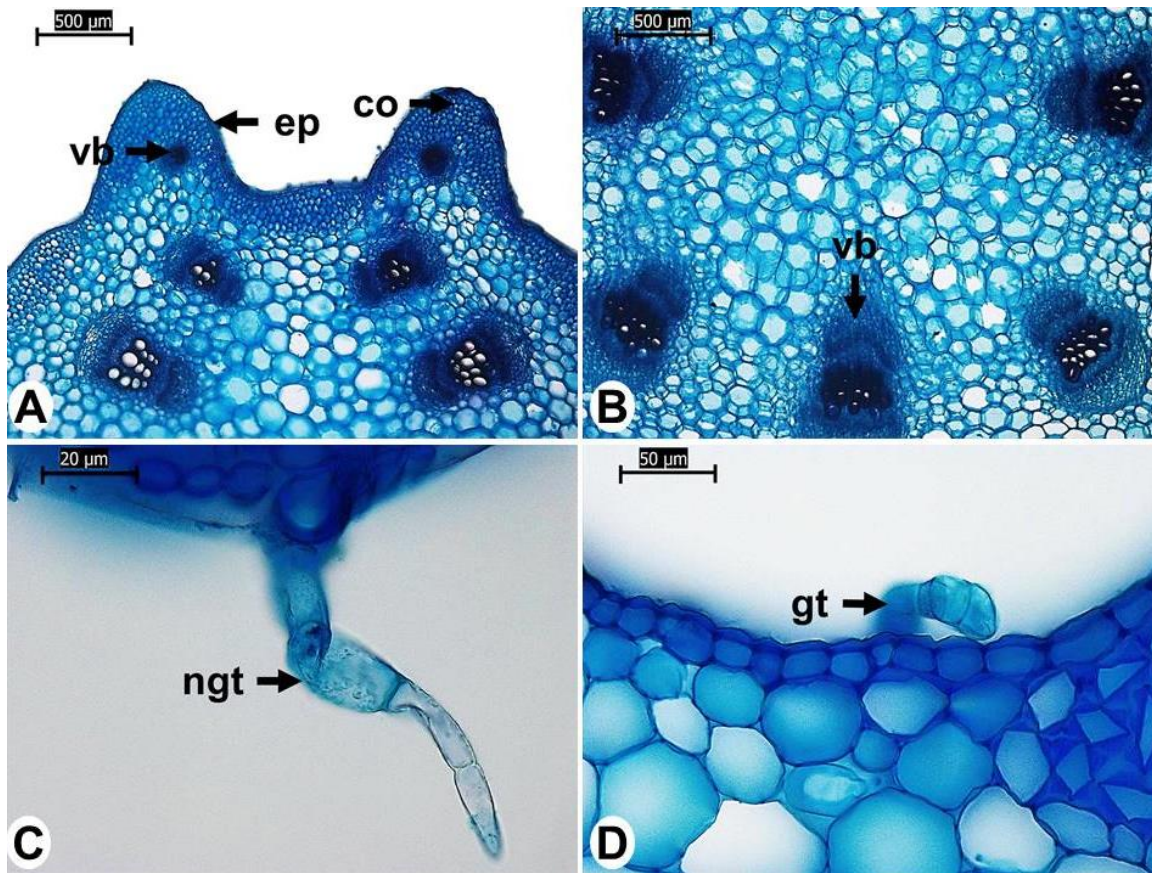
Histochemical tests were made on cross-sections of fresh leaf blades obtained by hand, using a common razor blade ^[22]. The specific reagents used were: potassium dichromate (10%) for

phenolic compounds ^[27], Dragendorff's reagent for detecting alkaloids ^[28], vanillin-chloridric acid for tannins ^[29], antimony trichloride for triterpenes and steroids ^[30], Nadi reagent for essential oils ^[31], Sudan III for lipophilic substances ^[26], phloroglucinol for lignin ^[22], Lugol's iodine reagent for starch ^[22]. Controls were performed in parallel with the tests and semipermanent histological slides were prepared containing the cross-sections ^[22,26], which were analyzed under an optical microscope (Alltion).

RESULTS

In transverse section the *L. cylindrica*'s petiole has rounded form with two ribs in adaxial face (Figure 1A,B). Its show an epidermis with a single stratum of cells covered for fine cuticle (Figure A). This specie present two types of trichomes: the tector trichomes and the glandular trichomes. The tector trichomes are pluricellular uniseriate, and the glandular trichome has peduncle and apex both of them multicellular (Figure 1C,D). The collenchyma has an angular form and its constitution is thereabout four to five cell layers (Figure 1A). About the vascular sistem, them composed to eleven bicollateral vascular bundles, being two bundles are in two ribs on adaxial face (Figure 1A) and nine bundles are in central region of petiole like a ring (Figure 1B).

FIGURE 1. Cross-sections of the petiole of *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.

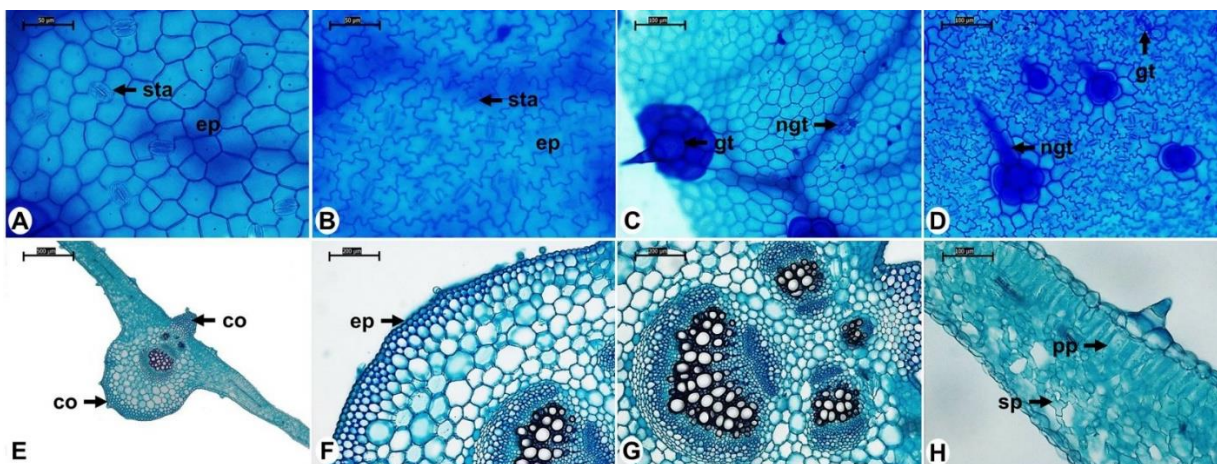


A,B. general view. C. non-glandular trichome. D. glandular trichome. co: collenchyma, ep: epidermis, gt: glandular trichome, ngt: non-glandular trichome, vb: vascular bundle.

The leaf blade, in frontal view, is amphistomatic with anomocytic stomata (Figure 2A,B). The epidermis cells have cell wall with straight or slightly sinuous contour on adaxial face (Figure 2A), although the abaxial face it has a strongly sinuous cell wall epidermic (Figure 2B), and both of them leaf blade faces have the same types of trichomes seen at petiole (Figure 2C,D). On transverse section, the midrib has biconvex form (Figure 2E). Its epidermis is uniseriate with fine cuticle (Figure 2F). The collenchyma is angular composed to eight to ten cells layer in adaxial face and two to three cells layer in abaxial face (Figure 2E). The vascular system are made with bundles arranged in ring form as the petiole, however in midrib are just four bundles (Figure 2G). About the bundle distribution, three of them are bicollateral and one is come back to adaxial face and it is collateral. The mesophyll tissues are called dorsiventral

with one layer of palisade parenchyma and its spongy parenchyma has brachiform cells (Figure 2H).

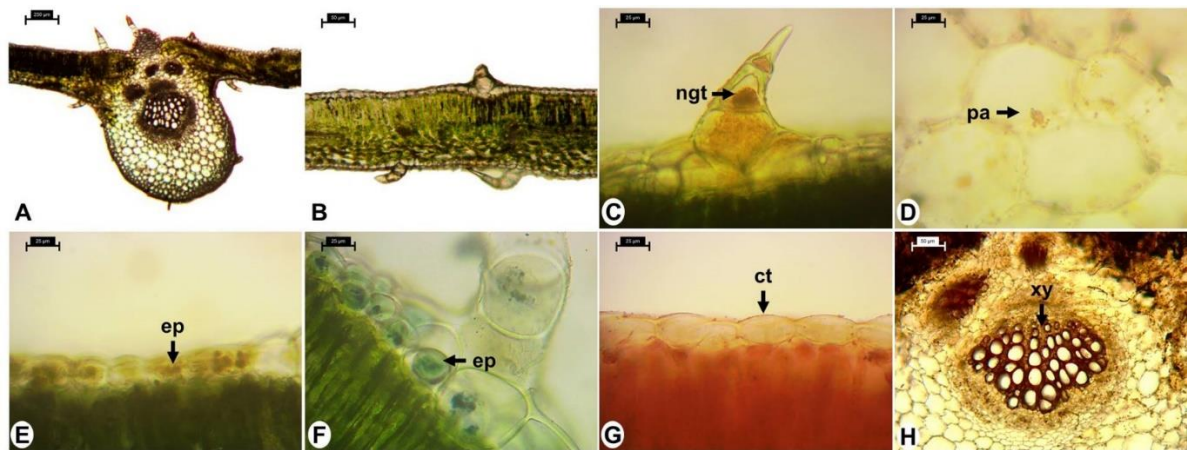
FIGURE 2. Frontal view and cross-sections of the leaf blade of *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem



A,C. adaxial surface. B,D. abaxial surface. E,F,G. midrib. H. mesophyll. co: collenchyma, ep: epidermis, gt: glandular trichome, ngt: non-glandular trichome, pp: palisade parenchyma, sp: spongy parenchyma, sta: stomata.

The Figure 3A and 3B show the transverse section of leaf blade without addition of reagent. After the addition of reagents to identify secondary metabolites were obtained these results: Phenolic compounds were found in tector trichomes (Figure 3C). Alkaloids were seen in parenchyma of the midrib (Figure 3D). Triterpenes, steroids and essential oils were evidenced in epidermic cells (Figure 3E,F). The reagent Sudan III revealed lipophilic compounds in cuticle (Figure 3G) and the Phloroglucinol showed the existence of lignin in xylem (Figure 3H). Negative results were identified for tannins and starch.

FIGURE 3. Histochemistry of the leaf blade of *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.



A,B. control. C. potassium dichromate (10%). D. Dragendorff's reagent. E. antimony trichloride. F. Nadi reagent. G. Sudan III. H. phloroglucinol. ct: cuticle, ep: epidermis, ngt: non-glandular trichome, pa: parenchyma, xy: xylem.

DISCUSSION/ CONCLUSION

The petiole form found in *L. cylindrica* is different between other species of Cucurbitaceae family. Rus *et al.*^[32] found a semicircular outline, laterally compressed in *Bryonia alba* L. In *Momordica charantia* L., Sá *et al.*^[33] observed a convex outline with two ribs on the adaxial surface and a triangular outline on the abaxial surface. *M. tuberosa* Cogn. revealed a convex outline on the adaxial surface and triangular outline on the abaxial surface^[34]. In relation to the presence of colenchyma in petiole, its tissue also have been observed in *B. alba* and in some species of *Momordica*^[35]. In these two cases, Aguoru and Okoli verified the quantity of colenchyma layer and this can be a key to difference with other^[35]. They described about the numbers of bicollateral vascular bundles of the petiole too, and they identified the variation between six and eighteen bundles in it to^[35]. Săvulescu and Hoza^[36] found seven bicollateral bundles in the central region of the petiole and two bicollateral bundles in the ribs of *M. charantia*, while Sá *et al.*^[33] visualized five bicollateral bundles in the central region of the petiole and two bicollateral bundles in the ribs of *M. charantia*. Rus *et al.*^[32] found nine

bicollateral bundles in *B. alba*, being two situated near the compression.

The vascular bundles quantity is also variate in leaf blade of Cucurbitaceae species. Ajuru and Okoli^[37] identified eight bicollateral bundles of the *Cucumis melo* L., four in *Cucurbita moschata* Duchesne and two in *Cucumeropsis mannii* Naudin. Mohammed and Guma^[38] reported the presence of seven bicollateral bundles in *Citrullus*' and *Cucurbita*'s species, three in *Cucumis* and four in *Luffa*'s species. Although the presence of bicollateral bundles in the family are comum^[39], in this research was identified just one collateral vascular bundle in the leaf blade of *L. cylindrica*. Collateral vascular bundles have been also identified in *B. alba*^[32] and *M. charantia*^[40].

Non-glandular and glandular trichomes are common in the family Cucurbitaceae and, in this study, they were found in the petiole and leaf blade of *L. cylindrica*. Some researches relative to leaf blade to *Luffa* species mentioned just the presence of tector trichomes as *L. acutangular* (L.) Roxb., *L. echinate* Roxb.; *L. cylindrica*^[37] and *L. aegyptiaca*^[38]. Alves *et al.*^[41] described tector and glandular trichomes in *L. aegyptiaca* and Rus *et al.*^[32] in *B. alba*. Thus, in this work is possible to note the first description about the presence of tector and glandular trichomes in *L. cylindrica*. Alves *et al.*^[41] also show the *L. aegyptiaca* own its leaf blade in anphiestomatic form with anomocitics stomatas. However, a useful cacacter to diference it between *L. cylindrica* is *L. aegyptiaca* has colenchyma tissues just in adaxial face in the midrib, while *L. cylindrica* show colenchyma in both of faces^[38]. In relation to mesophyl, *C. melo*, *C. moschata* and *C. mannii* both of them have palisade parenchyma constituited for two to three cell layers^[37]. Phytochemistre studys demonstrated the presence of phenolic compostes, alkaloides, terpenes and steroides in leaves of *L. cylindrica*^[42-44], corroboraring with results found through histochemistry tests in this study. The presence of tannines in leaves of this espécie is divergent, because them are not evidenced in the present research and in the Aboh *et al.*^[43] either, but Partap *et al.*^[42] found them. In relation to

metabolites flavonoides, tannins, alkaloides and terpenes all has been identified in *L. acutalanga* and *L. aegyptiaca*^[37].

After the anatomic analyse about the petiole and leaf blade of *L. cylindrica* this research show for once time the presence of tector and glandular trichomes in both of faces of leaves to this specie and can demonstre the importance about the anatomic studies to difference species to the same genus and macroscopic similar forms.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Dhiman K, Gupta A, Sharma DK, Gill NS, Goyal A. A review on the medicinally important plants of the family Cucurbitaceae. Asia J Clin Nutr 2012;4:16-26.
2. The Plant List. Version 1.1. Published on the Internet. 2013.
3. Paris HS, Tadmor Y, Schaffer AA. Cucurbitaceae Melons, Squash, Cucumber. Encyclopedia of Applied Plant Sciences 2017;3:209-217.
4. Joly AB. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1993.
5. Souza VC, Flores TB, Lorenzi H. Introdução à botânica: morfologia. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2013.
6. Lorenzi H, Lacerda MTC, Bacher LB. Frutas no Brasil: nativas e exóticas (de consumo in natura). São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2015.

7. Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
8. Coe FG. Rama midwifery in eastern Nicaragua. *J Ethnopharmacol* 2008;117:136-157.
9. Ribeiro RV, Bieski IGC, Balogun SO, Martins DTO. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2017;205:69-102.
10. Amujoyegbe OO, Idu M, Agbedahunsi JM, Erhabor JO. Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the management of sickle cell disorder in Southern Nigeria. *J Ethnopharmacol* 2016;185:347-360.
11. Kidane B, Andel T, Maesen LJG, Asfaw Z. Use and management of traditional medicinal plants by Maale and Ari ethnic communities in southern Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomed* 2014;10:46.
12. Sharma J, Gairola S, Gaur RD, Painuli RM. The treatment of jaundice with medicinal plants in indigenous communities of the Sub-Himalayan region of Uttarakhand, India. *J Ethnopharmacol* 2012;143:262-291.
13. Hong L, Guo Z, Huang K, Wei S, Liu B, Meng S, et al. Ethnobotanical study on medicinal plants used by Maonan people in China. *J Ethnobiol Ethnomed* 2015;11:32.
14. Gomes-Klein VL, Lima LFP, Gomes-Costa GA, Medeiros ES. Cucurbitaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.
15. Coelho-Ferreira M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J Ethnopharmacol* 2009;126:159-175.
16. Bolson M, Hefler SR, Dall EI, Chaves O, Junior AG, Junior ELC. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2015;161:1-10.
17. Catarino L, Havik PJ, Romeiras MM. Medicinal plants of Guinea-Bissau: Therapeutic

- applications, ethnic diversity and knowledge transfer. *J Ethnopharmacol* 2016;183:71-94.
18. Bourdy G, Michel LC, Roca-Coulthard A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno-Guaraní (Bolivian Chaco). *J Ethnopharmacol* 2004;91:189-208.
 19. Cano JH, Volpato G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol* 2004;90:293-316.
 20. Chander MP, Kartick C, Vijayachari, P. Ethnomedicinal knowledge among Karens of Andaman & Nicobar Islands, India. *J Ethnopharmacol* 2015;162:127-133.
 21. Ishtiaq M, Mahmood A, Maqbool M. Indigenous knowledge of medicinal plants from Sudhanoti district (AJK), Pakistan *J Ethnopharmacol* 2015;168:201-207.
 22. Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill; 1940.
 23. Kraus JE, Arduin M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR; 1997.
 24. Bukatsch F. Bemerkungen zur doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 1972;61:255.
 25. Krauter D. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. *Mikrokosmos*, 1985;74:231-233.
 26. Sass JE. *Botanical microtechnique*. Ames: Iowa State College Press; 1951.
 27. Gabe M. *Techniques histologiques*. Paris: Masson & Cie; 1968.
 28. Yoder LR, Mahlberg PG. Reactions of alkaloid and histochemical indicators in laticifers and specialized parenchyma cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). *Am J Bot* 1976;63:1167-1173.
 29. Mace MZ, Howell CR. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. *Can J Bot* 1974;52:2423-2426.
 30. Mace ME, Bell AA, Stipanovic RD. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in root of cotton seedlings. *Phytopathology* 1974;64:1297-1302.

31. David R, Carde J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. C. R. Acad. Sci. Paris, ser D 1964;258:1338-1340.
32. Rus L, Ielciu II, Păltinean R, Vlase L, Ștefănescu C, Crișan G. Morphological and histo-anatomical study of *Bryonia alba* L.(Cucurbitaceae). Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca 2015;43:47-52.
33. Sá RD, Cadena MB, Padilha RJR, Alves LC, Randau KP. Anatomical study and characterization of metabolites in leaves of *Momordica charantia* L. Pharmacogn. J 2018;66:1-4.
34. Kumar P, Rao D, Bilakanti L, Setty R. (2010). Pharmacognostical studies on *Momordica tuberosa* Cogn. Pharmacogn J 2010;2:28-33.
35. Aguoru CU, Okoli BE. Comparative stem and petiole anatomy of West African species of *Momordica* L (Cucurbitaceae). Afr J Plant Sci 2012;6:403-409.
36. Săvulescu E, Hoza G. Research results regarding the anatomy of *Momordica charantia* L. specie. Lucrări științifice USAMVB, Seria B, LIV 2010;694-700.
37. Ajuru MG, Okoli BE. Comparative vegetative anatomy of some species of the Family Cucurbitaceae Juss in Nigeria. Res J Bot 2013;1:15-23.
38. Mohammed IA, Guma AGN. Anatomical diversity among certain genera of family Cucurbitaceae. Int J Res Stud Biosci 2015;3:85-91.
39. Metcalfe CR, and Chalk L. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press; 1950.
40. Coutinho DF, Florêncio JC, Aguiar LR, Rodrigues KAF, Vilanova CM, Borba ERC. Estudo farmacobotânico das folhas de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). Visão Acadêmica 2009;10:7-17.
41. Alves RM, Inacio EM, Monquero PA, Meneghin SP, Hirata ACS. Leaf-surface

characterization and the effects of the herbicide saflufenacil on the leaves of weeds. Rev Bras Ciênc Agr 2014;9:550-555.

42. Partap S, Kumar S, Kumar A, Sharma NK, Jha KK. In-vitro anthelmintic activity of *Luffa cylindrica* leaves in Indian adult earthworm. J. Pharmacogn. Phytochem 2012;1:27-30.

43. Aboh MI, Oladosu P, Adeshina G, Olayinka B, Olonitola S.O. Phytochemical screening and antifungal activity of leaves extracts of *Luffa cylindrica* (Roem). Afr J Microbiol Res 2017;11:1681-1687.

44. Abdel- Salam IM, Ashmawy AM, Hilal AM, Eldahshan OA, Ashour M. Chemical composition of aqueous- ethanol extract of *Luffa cylindrica* leaves and its effect on representation of caspase 8, caspase 3 and the proliferation marker Ki67 in intrinsic molecular sub- types of breast cancer in vitro. Chem Biodivers 2018; 15:e1800045.

45. Suradkar VB, Wankhade BB, Patil SH, Narkhede NN, Bhokare, ID. Quantitative determination of some phytochemical contents of various plant seeds and leaves of water, ethanol and methanol extracts. Int J Inf Res Rev 2017:4261-4264.

46. Mankilik M, Mikailu A, Mhya DH. Phytochemical content and antimicrobial activities of *Luffa aegyptiaca* (Sponge gourd) leaves extracts. Int J Res Pharm Biosci 2014;1:1-4.

47. Mhya DH, Mankilik M. Phytochemical screening of aqueous extract of *Luffa aegyptiaca* (sponge gourd) leave sample from Northern Nigeria: A short communication. Int J Pharm Sci Res 2014;5:344-345.

APÊNDICE B - PUBLICAÇÃO EM ANAIS

XXV Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais

PT.10.032 - Caracterização histoquímica da lâmina foliar de *Luffa cylindrica* (L.)

M.Roem. Vieira LEB1, Santos DM1, Silva AS1, Cavalcanti GS1, Barbosa JWB1, Sá RD1, Randau KP1 - 1 Universidade Federal de Pernambuco - Laboratório de

Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas

Palavras-chave: *Luffa cylindrica*; histoquímica; microscopia.

Introdução: A família Cucurbitaceae possui cerca de 134 gêneros e aproximadamente 965 espécies que se distribuem em locais de climas subtropical, tropical, árido e temperado. São plantas herbáceas, geralmente com folhas grandes, com lobos profundos, flores de sexos separados e frutos do tipo pepônio. Pertencente a esta família, *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. é uma planta de característica anual, rasteira e/ou trepadeira, cultivada na Ásia, Índia, Brasil e Estados Unidos da América. Tem como nomes populares maxixão, bucha e é utilizada pela população para tratar constipação, problemas no trato gastrointestinal e alergias. Estudos relatam metabólitos secundários na espécie, como polifenóis e flavonoides. No intuito de localizar estes e outros compostos, o presente estudo teve o objetivo realizar a histoquímica na lâmina foliar de *L. cylindrica*.

Materiais e Métodos: A espécie foi coletada em Aliança-PE, no mês de Abril/2018. Uma exsiccata foi encaminhada ao herbário Dárdano de Andrade Lima para legitimação da identificação botânica. Secções transversais de lâminas foliares frescas, obtidas à mão livre, foram submetidas à reagentes específicos: dicromato de potássio (10%) para compostos fenólicos; Sudan III para substâncias lipofílicas; Dragendorff para alcaloides; tricloreto de antimônio para triterpenos e esteroides; vanilina clorídrica para taninos condensados; floroglucinol para lignina; e Lugol para amido. As imagens digitais foram capturadas por câmera digital acoplada a microscópio óptico (Alltion) e processadas no programa Toup View Image.

Resultados e Discussão: Compostos fenólicos foram encontrados nos tricomas e compostos lipofílicos foram evidenciados na cutícula. Alcaloides foram observados no parênquima da nervura central. Esses metabólitos são relatados na literatura em espécies de Cucurbitaceae através de estudos fitoquímicos. Triterpenos e esteroides foram visualizados nas células epidérmicas. Muitos terpenos já foram isolados e caracterizados em membros da família, sendo as cucurbitacinas os terpenos mais conhecidos. Lignina foi evidenciada no xilema. Os testes histoquímicos para taninos condensados e amido foram negativos.

Conclusão: Os resultados obtidos agregam conhecimentos novos na literatura sobre *L. cylindrica* e contribuem no estabelecimento de parâmetros de qualidade para a espécie

Apoio: CAPES.

APÊNDECE C - 5º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

5º EBIT ÁREA DE SUBMISSÃO: Produtos naturais e química medicinal

USO DE ESPÉCIES DE Cucurbitaceae EM PESQUISA ANTIVIRAL HIV/AIDS.

L.E.B.VIEIRA¹, I. B. SILVA¹, K. P. RANDAU¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: lais-bernardo1@hotmail.com

RESUMO – *Espécies de plantas do gênero Cucurbitaceae apresentam substâncias com potenciais atividades frente várias doenças, dentre elas está a ação anti-HIV, a partir de mecanismos como a inibição da transcriptase reversa. Frente isto a presente revisão integrativa teve com foco verificar quais espécies da família Cucurbitaceae são utilizadas em pesquisas contra o HIV. Para isso bases de dados foram selecionadas e descritores junto a operadores booleanos utilizados na busca dos artigos. Após a seleção destes e a compilação dos resultados pode-se verificar que as espécies Momorica charantia L. e Momordica balsamina L. foram as mais evidenciadas, apresentando compostos ativos anti-HIV como a proteína MAP30 e a proteína inativadora de ribossomo tipo I balsamina, respectivamente. Com isto, estas espécies são potenciais candidatos a fármacos no combate a esta infecção.*

Palavras-chave: Momordica charantia. Momordica balsamina. MAP30. Balsamina

ABSTRACT - *Plant species of the genus Cucurbitaceae present substances with potential activities against various diseases, among them is anti-HIV action, from mechanisms such as inhibition of reverse transcriptase. About this, the present integrative review was aimed at verifying which species of the Cucurbitaceae family are used in research against HIV. For this purpose, databases were selected and descriptors were used with boolean operators to search for articles. After the selection of these and the compilation of the results it can be verified that the species Momorica charantia L. and Momordica balsamina L. were the most evidenced, presenting anti- HIV active compounds such as protein MAP30 and inactivating protein type I ribosome balsamina, respectively. With this, these species are potential drug candidates in the fight against this infection.*

Keywords: Momordica charantia. Momordica balsamina. MAP30. Balsamin

1. INTRODUÇÃO

Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) são àquelas transmitidas por contato sexual, com ausência de preservativos, onde bactérias, vírus e outros microrganismos são disseminados (BRASIL, 2017).

Quanto as infecções virais, o vírus da imunodeficiência humana – HIV - foi identificado em 36,7 milhões de pessoas no fim de 2016 e, neste mesmo ano, 1 milhão morreram por causas relacionadas a ele, mantendo-o, assim, como um grande problema de saúde pública global (WHO, 2017).

O tratamento deste vírus ainda é de forma paliativa, através de medicamentos antirretrovirais eficazes (ARV) que controlam a infecção e proporcionam a estas pessoas o desfrute de uma vida saudável, longa e produtiva (WHO, 2017).

Entretanto, estão sendo relatadas na literatura, o surgimento de resistência do vírus, de forma adquirida, para os que já fazem o tratamento, e de forma transmitida àqueles recentemente infectados (PHILIPS *et al.*, 2010; CLUTTER *et al.*, 2016).

Este desenvolvimento de resistência estimulou a busca por novas alternativas de tratamento viral, como o uso de plantas medicinais. Dentre as plantas utilizadas, a família Cucurbitaceae apresenta espécies com ações frente várias doenças (CHEN *et al.*, 2008; CHINSENBUR *et al.*, 2015; CHINSENBUR, 2016; WANG *et al.*, 2017).

A ação anti-HIV desta família está presente em espécies como *Momordica charantia* L., *Momordica balsamina* L. e *Trichosanthes kirilowii* Maxim, devido a presença de metabólitos secundários em várias partes da planta como as folhas, o fruto e a semente (CHEN *et al.*, 2008; CHEN; LIU; LU *et al.*, 2009; CHINSENBUR *et al.*, 2015).

Por meio dessas informações enriquecedoras e atuais sobre a família Cucurbitaceae, o presente trabalho realizou uma revisão integrativa para compilar resultados sobre as espécies com ação anti-HIV como forma de auxiliar a comunidade científica na identificação destes dados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de abordagem qualitativa que revisou a literatura para identificar artigos científicos que abordassem as espécies da família Cucurbitaceae quanto ao uso antiviral frente HIV/AIDS. Realizou-se uma revisão integrativa, definida como um instrumento de obtenção, identificação, análise e síntese da literatura direcionada a um tema específico. Este estudo foi composto por seis etapas: identificação do tema ou questionamento da revisão integrativa; amostragem ou busca na literatura; categorização dos estudos; avaliação dos estudos incluídos na revisão; interpretação dos resultados e síntese do conhecimento evidenciado nos artigos analisados ou apresentação da revisão integrativa (MENDES;

SILVEIRA; GALVÃO, 2008).

O estudo ocorreu nos meses de outubro à novembro de 2017, tendo como questão de pesquisa: Quais espécies da família Cucurbitaceae são utilizadas em pesquisas contra HIV? A coleta de artigos foi realizada nas bases de dados: Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e PubMed, utilizando-se como descritores de assunto “HIV”, “Cucurbitaceae” e “Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS)”. Para a busca, foi utilizado o booleano “AND”, artigos escritos nos idiomas inglês e português, num período de 10 (dez) anos, que estivessem disponíveis *online*.

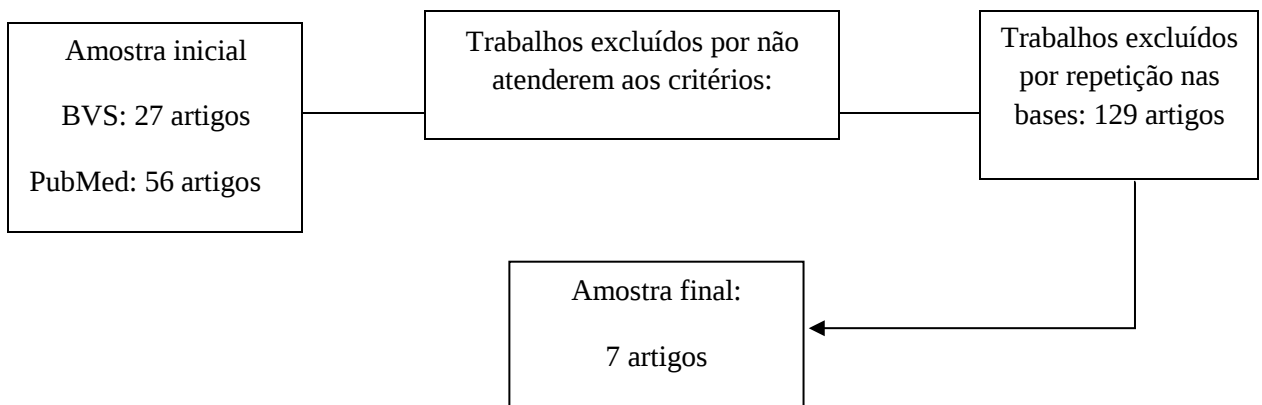
Como critérios de exclusão publicações no formato teses, dissertações, capítulos de livro, as que não tinham relação com o tema da pesquisa, bem como trabalhos em outros idiomas e fora do período estabelecido, além dos que não estivessem disponíveis na íntegra. Tomou-se o cuidado em excluir os artigos que se repetiam entre as bases.

Visando à sistematização dos dados, foi desenvolvido um instrumento de coleta contendo: título, autor, ano da publicação, objetivo, resultado e conclusão do estudo. Após coleta dos dados, foi caracterizado o *scopus* de análise. Os artigos foram comparados e agrupados por similaridade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do levantamento de artigos na literatura, foi realizado a seleção destes a partir dos critérios de inclusão e exclusão para posterior análise das informações, obtendo-se um total de 644 artigos conforme Figura 1.

Figura 1- Fluxograma de seleção de artigos.



Posterior a seleção dos artigos, foram compilados resultados, evidenciados conforme a Tabela 1, contendo as variáveis analisadas para melhor entendimento do assunto quanto a atividade anti-HIV de espécies da família Cucurbitaceae.

Tabela 1. Distribuição da amostra de estudo quanto as variáveis: autor, ano, objetivo, resultados frente atividade anti-HIV e conclusão.

Autor/Ano	Espécie	Objetivo	Resultados Anti-HIV	Conclusão
Fang, E.F.; Ng, T.B. 2011	<i>M. charantia</i>	Focar na eficácia e mecanismos de atividades anti-diabética, anti-HIV e antitumoral, com intenção fornecer para pessoas com interesse em <i>Momordica charantia</i>	O MAP30, proteína inativadora de ribossomo tipo I (RIP I), inibiu infecções do HIV-1 em linfócitos T, monócitos e replicações do HIV em células já infectadas. Mecanismo associado à sua ligação e inativação do DNA viral por repetição de terminações longas de HIV-1 e por inibição da integrase e transcriptase reversa.	A magnitude mundial da infecção por AIDS e a ausência de vacinas contra esta doença representa uma urgência em busca de novos medicamentos. Estima-se que o uso dos compostos do melão-amargo ou MAP30, especialmente, sejam promissores e necessitam de mais ensaios clínicos.
Kaur, I.; Puri, M.; Ahmed, Z.; Blanchet, F. P.; Mangeat, B.; Piguet, V. 2013	<i>M. balsamina</i>	Investigar atividade anti-HIV-1 de balsamina purificada	Balsamina reduziu drasticamente a replicação viral em ensaios com linhagens de células Jukart T, através do monitoramento das proteínas virais p24 e transcriptase reversa. Quando testada frente células T CD4+, inibiu a replicação do HIV-1, sem afetar a viabilidade celular.	Houve atividade antiviral de Balsamina frente HIV-1 em células T CD4+ inibindo a replicação do vírus, sua ação é estável ao longo do tempo, com ausência de resistência emergente e que a inibição não se deve a um efeito citotóxico.
Palamthodi, S.; Lele, S. S. 2014	<i>M. charantia</i>	Testar extratos de partes de três diferentes vegetais da família Cucurbitaceae - <i>Benicasa hispida</i> , <i>Lagenaria siceraria</i> e <i>Momordica charantia</i> - frente várias doenças.	Evidenciou que <i>M. charantia</i> , a partir de isolados fitoquímicos, apresentou atividade anti-HIV. Alfa e beta momorcarina inibem a enzima integrase do HIV-1, lecitina inibe a transcriptase reversa e a proteína <i>Momordica</i> anti-HIV (MAP30) inibe a transcriptase reversa e proteínas do núcleo viral. Outra proteína - MRK29 - apresentou também atividades frente a transcriptase reversa viral em 50%	Os vegetais da família Cucurbitaceae são bem conhecidos quanto seus valores medicinais e pesquisas científicas estão extensivas estão sendo feitas nesta área para identificação de compostos bioativos. Entretanto, pesquisas em terapia baseada em evidência são poucas, sendo estas necessárias.

Nagarani, G.; Abirami, A.; Siddhuraju, P. 2014	<i>M.</i> <i>charantia</i> , <i>M.</i> <i>balsamina</i>	Comparar e destacar os valores nutricionais, a fitoquímica e os efeitos fisiológicos de espécies de <i>Momordica</i> selvagens com variedades desconhecidas	MAP30 e a proteína inativadora de ribossomos tipo I (RIP-I) apresentaram atividade anti-HIV. A polpa de fruta de <i>Momordica</i> <i>balsamina</i> teve atividade eficaz contra HIV-1 e estimulou o aumento de células T CD4+ nas duas primeiras semanas em teste <i>in vivo</i> .	As espécies selvagens de espécie <i>Momordica</i> apresentam fitocompostos em potencial para o tratamento de diversas doenças, mas estudos são escassos. A revisão trouxe informações para futuras investigações.
Thiruvengal, da M.; Rekha, K.; Chung, I. M. 2015	<i>M. dioica</i>	Avaliar atividade antioxidante e antimicrobiana e produção de compostos fenólicos de raízes transgênicas de <i>M. dioica</i> .	Derivados de flavonoides de raízes transgênicas apresentaram atividade antiviral frente vários vírus, dentre eles o HIV.	Grupos fenólicos foram maiores nas raízes transgênicas e que estes resultados podem usados de forma eficaz para a cura de doenças incluindo as virais.
Diaz, J. H. 2016	<i>M. balsamina</i>	Apresentar as plantas comestíveis e medicinais exóticas que estão incluídas nas américas e outras partes do mundo.	Momordina obtida de <i>Momordica balsamina</i> demostrou propriedades de inibição ribossomal, semelhante a ricina. A <i>balsamina</i> , demonstrou inibição da replicação do HIV-1 em células T CD4+.	Apesar dos efeitos antimicrobianos de <i>M.</i> <i>balsamina</i> , sua ingestão pode ocasionar efeitos indesejados no trato gastrointestinal e hipoglicemia.
Raina, K.; Kumar, D.; Agarwal, R. 2016	<i>M.</i> <i>charantia</i>	Revisão de literatura baseada nos componentes de <i>M.</i> <i>charantia</i> e seus benefícios	A proteína MAP30 apresentou atividade anti- HIV <i>in vitro</i> causando inativação do DNA e ribossomos virais, sinergismo com outras drogas para regulação da replicação do HIV.	Apesar de haver várias pesquisas sobre o fruto da <i>M. charantia</i> , é necessário saber qual eficácia este fruto tem frente as doenças.

Ação anti-HIV de espécies do gênero *Momordica* (Cucurbitaceae)

Todos os trabalhos abordaram, dentre várias doenças, estudos frente ação anti-HIV de espécies de plantas do gênero *Momordica* (Cucurbitaceae). Majoritariamente evidenciou-se *Momordica charantia* L. como principal agente antiviral, detentora de moléculas viáveis para o vírus da imunodeficiência humana - HIV.

Fang e Ng (2011), ao realizarem uma revisão de literatura frente ações medicinais de *M. charantia*, descreveram esta espécie como Cornucópia da Saúde visto suas atividades bem consolidadas pela comunidade científica. Nesta revisão há a abordagem da proteína *Momordica* anti-HIV - MAP30- relatado desde 1990, classificado como uma proteína inativadora de ribossomos tipo I (RIP I).

Este composto pode inibir infecções do HIV-1 em linfócitos T, monócitos e a replicação do vírus em células infectadas por sua ligação ao DNA viral, adicionando repetições longas terminais, impedindo a integração do DNA do HIV ao genoma do hospedeiro e também pela inibição da integrase e transcriptase reversa do HIV-1. A proteína recombinante MAP30 (re-MAP30) apresentou atividade semelhante a nativa. Neste levantamento são evidenciadas algumas outras moléculas homólogas ao MAP30 – α -momorcarina e β -momorcarina – que também apresentam atividade em potencial para o HIV.

Outro estudo realizado por Palantholi e Lele (2014) trazem informações que corroboram com os autores acima por meio de uma revisão de literatura. A partir de extratos de folhas de *M. charantia*, foram evidenciadas várias classes de metabólitos secundários e pela fitoquímica identificados. Dentre eles estavam o MAP30, discutido também pelos autores Fang e Ng (2011), alfa e beta-momorcarina que apresentam atividade anti-HIV por meio de inibição da integrase do HIV-1, lecitina com ação de inibição da transcriptase reversa e a proteína MRK29, obtida de sementes e frutos maduros, a qual tem atividade em 50% para inibição da transcriptase reversa.

Nagarani *et al.* (2014) e Raina *et al.* (2016) também evidenciaram em seus estudos a proteína MAP30 quanto a eficácia de sua atividade anti-HIV.

Em um novo estudo realizado por Kaur *et al.* (2013), a atividade anti-HIV foi reportada a outra espécie do gênero *Momordica* – *Momordica balsamina*. De suas sementes foi isolada a Balsamina – uma RIP I. Testes para verificação da ação anti-HIV foram realizados em linhagens de células Jurkat T, onde resultou em diminuição >99% do vírus no ensaio de transcriptase reversa e confirmados pelo *Western blotting*. Quanto a IC50, demonstrou resultados dose-dependentes – 10,2nM e teve sua TC50 próximo de 6,25 μ M frente a droga padrão Zidovudina - 329 μ M. Algo interessante analisado ocorreu pela análise resistência a substância pelo vírus, haja visto sua potencial forma de mutação, onde viu-se que não foi desenvolvida alguma forma de resistência emergente.

Quando testada frente células T CD4+ com HVI-1 em replicação, também apresentou atividade dose-dependente e não desenvolveu efeitos deletérios as linhagens. Sua TC50 foi de 8,75 μ M em comparação a Zidovudina - 31 μ M. A partir dos resultados que o estudo compilou, chegaram a conclusão de que a balsamina é um potente inibidor do HIV-1 em replicação e que elas não afetam a viabilidade celular.

Nagarani *et al* (2014) relatou também a atividade anti-HIV de *M. balsamina* como também sua ação de estímulo ao crescimento de células T CD4+ em testes *in vivo* em ratos, nas duas primeiras

semanas de tratamento.

Esta ação também foi descrita por Diaz (2016) ao realizar um levantamento sobre duas espécies – *M. charantia* e *M. balsamina* – quanto suas características como também suas propriedades medicinais. Ele trouxe a atividade anti-HIV de dois compostos da *M. balsamina*, a momordina, onde descreve sua propriedade inativadora de ribossomos – RIP - como também fala da balsamina com ação de inibição do HIV em experimentos em células CD4+ onde relata que houve ausência de efeitos tóxicos.

Thiruvengadam *et al.* (2015), no entanto, buscou a verificação de atividades da espécie *Momordica dioica*. Esta é também pertencente a família Cucurbitaceae e tem grande valor nutricional além de ser utilizada na medicina tradicional. É nativa de regiões tropicais como África, Ásia e América do Sul.

O estudo foi realizado em raízes peludas de *M. dioica* onde estas eram induzidas a um melhoramento por *Agrobacterium rhizogenes* para potencializar seu sistema biotecnológico e assim avaliar a formação de metabólitos secundários e sua atividade, dentre as quais, a antimicrobiana.

Os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides e seus derivados, apresentaram ação frente uma variedade de vírus, dentre eles, o HIV, de modo superior quando comparado as raízes não-modificada. Assim o autor diz que estes resultados demonstraram a ação das raízes peludas de modo eficaz e que o uso destas modificações pode ser adotado.

Ao analisar os resultados da pesquisa quanto a ação anti-HIV-1, verifica-se que as espécies do gênero *Momordica* são potenciais candidatas a futuros fármacos para tratamento de infecções contra o HIV, evitando assim a AIDS. Apresentam moléculas viáveis de diversas partes da planta, muitas com elucidação estrutural realizada, o que possibilita estudos *in silico* para verificação de potenciais locais de ligação a estrutura viral do HIV. Mas, direcionamentos para estudos *in vivo* são necessários para verificação destas atividades, como forma de analisar de modo sistêmico as ações destas moléculas para determinação da farmacocinética e farmacodinâmica.

4. CONCLUSÃO

Os levantamentos de dados a partir dos artigos selecionados traz a comunidade científica um olhar diferenciado às espécies da família Cucurbitaceae, principalmente as pertencentes a espécie *Momordica*, frente o HIV, visto que há moléculas com estruturas definidas e com ação em potencial para o combate deste vírus, com efeitos citotóxicos baixos quando comparados a drogas padrão de tratamento.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais, 2017. [citado em 16 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-sao-ist>.

CHEN, J.; TIAN, R.; QIU, M.; LU, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**. v. 69, p. 1043–

1048, 2008.

CHEN, J. C.; LIU, W. Q.; LU, L.; QIU, M. H.; ZHENG, Y. T.; YANG, L. M.; ZHANG, X. M.; ZHOU, L.; LI, Z. R. Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*. **Phytochemistry**. v. 70, p. 133-140, 2009.

CHINSEMBU, K. C.; HIJARUNGURU, A.; MBANGU, A. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in the management of HIV/AIDS opportunistic diseases in Rundu, Kavango East Region, Namibia. **South African Journal of Botany**. v. 100, p. 33-42, 2015.

CHINSEMBU, K. C. Ethnobotanical study of medicinal flora utilised by traditional healers in the management of sexually transmitted infections in Sesheke District, Western Province, Zambia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, p. 268-274, 2016.

CLUTTER, D. S.; JORDAN, M. R.; BERTAGNOLIO, S.; SHAFER, R. W. HIV-1 drug resistance and resistance testing. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 46, p. 292–307, 2016.

DIAZ, J. H. Picking edible and medicinal plants: exotic “apples” and “pears”. **Wilderness & Environmental Medicine**. v. 27, p. 168-170, 2016.

FANG, E.F.; NG, T.B. Bitter Gourd (*Momordica charantia*) is a Cornucopia of Health: A Review of its Credited Antidiabetic, Anti-HIV, and Antitumor Properties. **Current Molecular Medicine**. v. 11, p. 417-436, 2011.

KAUR, I.; PURI, M.; AHMED, Z.; BLANCHET, F. P.; MANGEAT, B.; PIGUET, V. Inhibition of HIV-1 Replication by Balsamin, a Ribosome Inactivating Protein of *Momordica balsamina*. **Plos One**. v. 8, p. e73780, 2013.

NAGARANI, G.; ABIRAMI, A.; SIDDHURAJU, P. Food prospects and nutraceutical attributes of *Momordica* species: Apotential tropical bioresources – A review. **Food Sci. Hum. Wellness**. v. 3, p. 117-126, 2014.

PALAMTHODI, S.; LELE, S. S. Nutraceutical applications of gourd family vegetables: *Benincasa hispida*, *Lagenaria siceraria* and *Momordica charantia*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. v. 4, p. 15-21, 2014.

PHILLIPS, A. N.; CAMBIANO, V.; MINERS, A.; REVILL, P.; PILLAY, D.; LUNDGREN, J. D.; BENNETT, D.; RAIZES, E.; NAKAGAWA, F.; DE LUCA, A.; VITORIA, M.; BARCAROLO, J.; PERRIENS, J.; JORDAN, M. R.; BERTAGNOLIO, S. Effectiveness and cost-effectiveness of potential responses to future high levels of transmitted HIV drug resistance in antiretroviral drug-naïve populations beginning treatment: modelling study and economic analysis. **The Lancet**. v. 1, p. e85-e93, 2014.

RAINA, K.; KUMAR, D.; AGARWAL, R. Promise of bitter melon (*Momordica charantia*) bioactives in cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**. v. 40-41, p. 116- 129, 2016.

THIRUVENGADAM, M.; REKHA, K.; CHUNG, I. M. Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb. ex. willd) for the assessment of phenolic compounds and biological activities. **Scientia Horticulturae**. v. 198, p. 132-141, 2016.

WANG, S.; LI, Z.; YANG, G.; HOB, C. T.; LI, S. *Momordica charantia*: a popular health- promoting vegetable with multifunctionality. **Food and Function**. v. 8, p. 1749-1762, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [citado em julho de 2017].
Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.