



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JOSÉ HARDMAN SÁTIRO DE LUCENA FILHO

EXTRATO DOS FRUTOS DA *MOMORDICA CHARANTIA L.* APRESENTA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* SOBRE ESPÉCIES PADRÃO E
ISOLADOS MULTIRRESISTENTES

CAMPINA GRANDE - PB

2012.2

JOSÉ HARDMAN SÁTIRO DE LUCENA FILHO

EXTRATO DOS FRUTOS DA *MOMORDICA CHARANTIA L.* APRESENTA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* SOBRE ESPÉCIES PADRÃO E
ISOLADOS MULTIRRESISTENTES

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à coordenação do Curso de Bacharelado em
Odontologia pela Universidade Estadual da
Paraíba – UEPB como requisito para
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Edja Maria Melo de Brito Costa

Campina Grande-PB

2012.2

L935e

Lucena Filho, José Hardman Satiro de.

Extrato dos frutos da *Momordica charantia* L. apresenta atividade antimicrobiana in vitro sobre espécies padrão e isolados multirresistentes / Jose Hardman Satiro de Lucena Filho. – 2012.

35 f. : il. color

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.

“Orientação: Prof. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia”.

1. *Momordica charantia* L. 2. Fitoterápicos. 3. Efeito antimicrobiano. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

JOSÉ HARDMAN SÁTIRO DE LUCENA FILHO

EXTRATO DOS FRUTOS DA *MOMORDICA CHARANTIA L.* APRESENTA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* SOBRE ESPÉCIES PADRÃO E
ISOLADOS MULTIRRESISTENTES

APROVADO EM: 06/12/2012

Edja M. Melo de B. Costa.

Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa

Ana Claudia D. de Medeiros

Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros

Denize Nóbrega Diniz

Dra. Denize Nóbrega Diniz

Campina Grande-PB

2012.2

AGRADECIMENTOS

Existem momentos na vida que passam, mas que sempre irão permanecer em nossa memória, um deles é o ingresso na vida acadêmica, a essa conquista agradeço a Deus por me fortalecer e dá coragem de renunciar vários momentos de lazer para dedicar a minha construção profissional.

Agradeço aos meus pais, em especial, a minha mãe Izabel Derlange de Araújo Alves que, por mais desafiadora tenha sido a vida, sempre esteve ao meu lado acreditando e me incentivando nessa Jornada.

A minha irmã Flávia e meu irmão Flauber, os quais contribuíram incansavelmente a cada dia nessa caminhada e vivenciaram todos os momentos, sempre prontos a me ajudar.

A minha esposa Lidijany, por entender minha ausência e por sua presença constante em todos os momentos de alegria e tristeza no decorrer dessa Jornada.

A grande mestra e Doutora, Edja Maria Melo de Brito Costa, que me acolheu fazendo perceber que nem tudo é fácil de se adquirir, que quando realmente queremos alcançar algum objetivo devemos enfrentar sem medo, a ela agradeço de coração por ter me proporcionado grandes obstáculos que me fizeram cair e, ao mesmo tempo, erguer-me para concluir este trabalho, mostrando que os fracassos nos incentivam para se alcançar o sucesso.

A todas que fazem o (LABDEM), em especial a Ana Claudia Dantas de Medeiros, que nunca negara ajuda nas minhas limitações e sempre estivera apta a me ajudar, a você serei sempre grato por tudo.

Aos contemporâneos da UEPB, aos funcionários e professores que pela amizade e companheirismo, que estavam a nos atender nos momentos precisos.

Enfim, a todos que colaboraram na montagem desse quebra-cabeça que chega ao término e por isso eu agradeço eternamente a todos, pois as palavras são apenas registros dos meus sentimentos de gratidão.

RESUMO

A utilização das plantas medicinais com indicações para processos infecciosos representa grande importância nos dias atuais. Este estudo trata-se de avaliar “in vitro” a ação antimicrobiana do extrato etanólico da semente de *Momordica Charantia* L., com determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) de cepas padrão e isolados de bactérias multirresistentes e a concentração fungicida mínima (CFM) frente a diferentes espécies de *Candida*, utilizando o método da microdiluição. Todos os microrganismos apresentaram sensibilidade ao extrato. Os resultados deste estudo mostram a importância de se avaliar meios alternativos de combate ao desenvolvimento de resistência a drogas, particularmente em linhagens multirresistentes, contribuindo para uma melhor compreensão da atividade das plantas medicinais como antimicrobianos.

Palavras-chave: *Momordica charantia* L.; Fitoterápicos; Efeito antimicrobiano.

ABSTRACT

The use of medicinal plants with signs for infectious processes is very important nowadays. This study comes up to evaluate "in vitro" antimicrobial action of the ethanol extract of *Momordica charantia* L. seed determines the minimum inhibitory concentration (CIM), determines the minimum bactericidal concentration (CBM) of standard strains and multiresistant strains and determine the minimum fungicidal concentration (CFM) All microorganism showed sensitivity to the extract. The results of this study show the importance of evaluating alternative ways to combat development of drug resistance, particularly in multiresistant strains contributing to a better understanding of the activity of medicinal plants as antimicrobials.

KEYWORDS: *Momordica charantia* L.; Herbs; Antimicrobials effect

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 Momordica de Charantia L.....	12
3.2. Microorganismos.....	13
3.2.1. Bactérias.....	13
3.2.2 Leveduras.....	15
4. MATERIAL E MÉTODO	17
4.1 Coleta e identificação do Material Vegetal	17
4.2 Preparação do extrato vegetal	17
4. 3. Meios de cultura.....	18
4.3.1. Brain Heart Infusion (BHI Liquid) e Sabouraud Dextrose (SD Liquid medium).....	18
4.3.2. Brain Heart infusion Ágar (BHI agar) e Sabouraud Dextrose Ágar (SD Agar).....	18
4.4. Controles Utilizados.....	14
4.5. Cepas e leveduras.....	19
4.5.1 Fundos.....	19
4.5.2 Bactérias padrões.....	19
4.5.3. Bactérias multirresistentes.....	20
4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	20
4.6.1 .Preparação dos inóculos.....	21
4.6.1.1. Bactérias.....	21
4.6.1.2 Fungos.....	21
4.6.2. Preparação da Microplaca.....	22
4. 7. Determinação da Concentração Inibitória mínima (CIM).....	23
4. 8. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	25
5. RESULTADOS	26

6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento e a utilização de plantas medicinais no tratamento e prevenção de doenças encontram-se inseridos na história da humanidade desde a antiguidade, contribuindo nos mais diversos estágios de desenvolvimento da sociedade e sendo parte integrante da cultura de cada povo (JUNIOR et al. 2005).

Neste sentido, o Brasil é um país privilegiado por possuir cerca de 25% da flora mundial, tendo grande potencial para a formulação de novos fármacos, deste menos de 1% tiveram suas propriedades avaliadas cientificamente para possível ação medicinal (CASTILHO et al 2007; DRUMOND et al. 2004).

A crescente procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas medicinais vem se desenvolvendo nos últimos tempos em razão do elevado surgimento de microrganismos resistentes aos medicamentos já existentes (MENDES et al.2010). Como também, as precárias condições financeiras apresentadas pelo maior indigente da população brasileira torna-se um impasse para o uso de medicamentos industrializados e neste caso a utilização de plantas medicinais apresenta custo inferior e, conseqüentemente, mais acessível a essa população (LIMA JR et al 2006).

Trabalhos que buscam verificar o potencial antimicrobiano de plantas medicinais representam um desafio na descoberta e identificação de novos fármacos. Considerando que são escassos os estudos sobre o potencial biológico dos frutos da *Momordica de Charantia* L. (Melão-de-são-caetano), este trabalho tem como importância, avaliar a ação da mesma frente a microrganismo de interesse clínico, afim de agregar garantias científicas em relação ao uso de plantas medicinais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* do extrato etanólico de *Momordica de Charantia L* frente às cepas padrões e isolados multiresistentes.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *Momordica de Charantia L* frente às cepas padrões e isolados multiresistentes.
- Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM) do extrato frente às cepas que apresentarem sensibilidade.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Momordica charantia* L.

É uma espécie pertencente à família *Cucurbitáceae*. Representa uma espécie vegetal silvestre, encontrada em áreas urbanas e rurais (Ribeiro et al., 2004). É considerada uma planta daninha, trepadeira, bastante frequente em pomares, cafezais, sobre cercas e alambrados e em terrenos baldios. Ocorre virtualmente em todas as regiões habitadas do Brasil (Lorenzi, 2000). Historicamente, *Cucurbitáceae* representa uma das mais relevantes famílias das plantas utilizadas para a confecção de fitoterápicos (Lenzi et al., 2005). É utilizada comumente na medicina caseira em países como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru (Grover e Yadav, 2004).

No Brasil foi denominada popularmente como melão-de-são-caetano, erva-de-lavadeira, erva-de-são-vicente, fruta-de-cobra e melãozinho (SOUZA, 2001). No Nordeste brasileiro a *M. charantia* L. é encontrada em abundância, sendo descritas onze subespécies próprias da região (MATOS, 1997).

O popular melão-de-são-caetano é originário do leste indiano ou do sul da China (Robison et al. 1997). Teve sua denominação *Momordica* (significado na língua latina de “mordida”), em função das bordas das folhas, que denotam terem sido mordidas (Assubaie, 2004). Tem seu reconhecimento tido como “revolucionária” decorrente a sua versatilidade como produto alimentício e em aplicações terapêuticas (Assubaie e El-Garawany, 2004), onde é utilizada no tratamento de coceiras, sarnas e impinge (Lorenzi e Matos, 2002), nas alterações hiperglicêmicas (Batran et al. 2006) e no controle de doenças de plantas (Celoto et al. 2008).

Suas propriedades fenotípicas podem ser restringidas e influenciadas por fatores climáticos e pelo estágio de desenvolvimento da planta. Em contrapartida os indicadores moleculares, baseados em polimorfismos na sequência de DNA, são independentes das condições ambientais e proporcionam elevados níveis de polimorfismo (Dey et al. 2006)

Os frutos apresentam sementes vermelhas em função de um índice elevado de licopeno (Assubaie, 2004). São ricos em vitaminas, principalmente A, B1, B2 e a

vitamina-C, e apresentam diversos minerais (cálcio, magnésio, de fruto fresco). (Yuwai et al., 1991).

Baseados no uso da medicina popular, tem sido identificada a eficácia da *M. charantia* como antileucêmico, antidiabético, antitumor, hipotensivo, hipoglicêmico, imunomodulador (Beloin et al. 2005), inseticida, lactagogo, laxativo, purgativo, estomáquico, tônico, vermífugo (Assubaie, 2004), antimicrobiano, antiviral, antimutagênico, antioxidante, adstringente e propriedades (Campello, 2005), cicatrização de feridas e tratamento de úlceras pépticas (Grover, 2004).

Os extratos aquoso, etanólico e metanólico de *M. charantia* têm demonstrado atividade antimicrobiana de largo espectro de ação (KHAN, 1998; PEREIRA et al. 2006), com atividade contra *Escherichia coli* (OMEREGBE et al., 1996), *Helicobacter pylori* (YESILADA et al., 1999) e *Staphylococcus aureus* (PEREIRA et al. 2006).

No Brasil, o Melão-de-São-Caetano é abundante e muito usado na medicina popular, especialmente nordestina. No entanto, sua composição química e propriedades farmacológicas têm sido pouco estudadas no Brasil, ainda que a planta nos últimos 25 anos tenha recebido uma maior atenção dos pesquisadores orientais, devido à descoberta da presença em suas sementes de uma substância proteica inativadora de ribossomos e com atividade imunossupressora (Lorenzi, 2000).

3.2 MICRORGANISMOS

3.2.1 Bactérias

a) *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* pertence a família Enterobacteriaceae, sendo bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativo (BRASIL, 2005). Considerando o seu risco para seres humanos, crescente atenção epidemiológica tem sido observada (ACHA et al. 2003). Estima-se que 5,5% dos surtos são provocadas por bactérias do grupo coliforme, onde tem como principal agente etiológico a *E. coli*, representando assim o terceiro maior causador de surtos (Brasil, 2005). No contexto da infestação patógena a *E. coli* é tida como uma das mais expressivas na contaminação fecal, provavelmente, pela facilidade de sua comprovação diagnóstica (FORSYTHE, 2002), cujos sinais e sintomas incluem febre, cólica, vômito, diarreias, mal estar e calafrios (SILVA JR, 2005).

O principal habitat da *E. coli* é o trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria dos sorogrupos de *E. coli* faz parte da microbiota comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da microbiotaintestinal.

b) *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* são cocos Gram-negativos (GALES et al. 2003), responsável por infecções graves em seres humanos, podendo conduzir até a morte do paciente (MENDES et al 2006). A *P. aeruginosa* apresenta enzimas capazes de promover hidrólise das cefalosporinas, penicilinas e carbapenemos, o que confere sua resistência a estes antibióticos (SADER, 2004).

Os primeiros relatos de isolados de *P. aeruginosa* no Brasil se deu em São Paulo (LEE et al 2003). O seu aumento significativo em unidades de terapia intensiva (UTIs) causou uma série de preocupação (MORAES et al 2002), por representar o principal fator de risco para as infecções isoladas frente ao uso de antibióticos em grandes quantidades (GRAF et al 2009).

c) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram positivos, facultativos, imóveis, amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele (TORTORA et al. 2000) e da cavidade bucal (GREGORIO et al. 2006; PEREIRA, M et al. 2009).

A patogênese de *S. aureus* é condicionada aos fatores de virulência na forma de toxinas, enzimas e outras proteínas associadas à parede celular, mediados por genes plasmidiais ou cromossômicos, que combinados conduzem à doença. O *S. aureus* utiliza diferentes estratégias para sobrepujar as defesas microambientais do hospedeiro infectado e potencialmente colonizar os tecidos (PEREIRA, M et al. 2008).

O *S. aureus* representa o agente causador mais comum dentre as infecções piogênicas, tais como: endocardite, meningite, pericardite, infecções pulmonares (JAWETZ et al. 2000, ACHA et al. 2003, KONEMAN et al. 2008), sendo identificado

como um dos principais fatores de risco para a infecções em pacientes cirúrgicos ou em hemodiálises (SILVA, 2004, BRASIL. 2005). É responsável por cerca de 11,7% dos surtos das infecções, cujos sintomas são restritos basicamente a náuseas, com rara ocorrência de diarreias e ausência de febre na maioria dos relatos (FRANCO et al. 2005). Além disso, o *S. aureus* exerce papel importante na indução e exacerbação das doenças inflamatórias (KONEMAN et al. 2008).

d) *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis é uma bactéria Gram negativa, encontrada regularmente nos intestinos do homem. Causa infecções principalmente no trato urinário, sendo a primeira causa de infecções comunitárias e a segunda associada a infecções hospitalares. Estes microrganismos hidrolisam uréia formando amônia, tornando assim a urina dos pacientes com infecções crônicas muito alcalinas, fato que favorece formação de cálculos renais devido à diminuição da solubilização do cálcio. Bactérias do gênero *Proteus* apresentam resistência natural às polimixinas, um grupo de antibiótico bastante ativo contra as demais enterobactérias e outros Gram negativos (ANWAR et al., 2003).

e) *Providencia rettgeri*

Providencia rettgeri é um gênero de bactérias Gram negativas, móveis, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Comumente associada à infecções do trato urinário na comunidade sadia e em pacientes com cateter. Podem causar infecções oportunistas variadas em pacientes hospitalizados, com queimaduras, lesões cutâneas, ferimentos cirúrgicos e septicemia (ALMEIDA, et. al.,2009)

3.2.2. Leveduras

As leveduras são tidas como microrganismos onipresentes em nosso ambiente. Apesar de milhares de espécies existentes, a maioria é saprofítica do solo ou agente patogênico vegetal. Apenas 300 espécies são descritas como capazes de causar patologias em animais (KRIZNIK et al 2005). Destas, cerca de 150 compõem a microbiota bucal normal, sendo considerados importantes patógenos,

com destaque para as espécies do gênero *Candida*, como a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermonde*. A *C. albicans* é responsável por infecções superficial e sistêmica (KRIZNIK et al 2005). É um dos principais patógenos da mucosa (CALDERONE 2002) e constitui a espécie mais prevalente nas infecções oportunistas (PEREIRA, M et al. 2010), especialmente em pacientes imunocomprometidos (HUNG et al. 2005).

A emergência das leveduras tidas como não *C.albicans* tornou-se uma preocupação na área da saúde, uma vez que podem ser altamente resistentes a antifúngicos, como é o caso da *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e a *C. guilliermonde* (PASQUALOTTO et al. 2005, PASQUALOTTO et al. 2006).

A *C. glabrata* surge como a segunda causa mais comum de candidose invasiva (PFALLER E DIEKEMA 2007). Muitos isolados apresentam resistência, enquanto outros facilmente desenvolvem resistência após tratamento (BENNETT et al. 2004). No Brasil, foi verificada a sua ocorrência em 2,49 casos para cada 1.000 internações hospitalares. (Colombo et a. 2006).

A *C. guilliermonde* é um componente da microbiota humana, raramente isolada de pacientes, devido a sua baixa virulência (ARENDRUP et al. 2002, ANTUNES et al. 2004). Em função disto, é menos estudado, em relação as outras espécies de *Candida* (COLOMBO et al. 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (fruto) da *Momordica Charantia L.* foi adquirido através da coleta direta, na região do alto Mesorregião do Sertão Paraibano, no município de Malta-PB (6° 54' 14" S, 37° 31' 19" W) (Figura 1), cuja exsicata foi depositada no laboratório de Botânica da UEPB.



Figura 1. Obtenção do fruto da *Momordica Charantia L.*

4. 2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

Após coleta e limpeza, os frutos foram acondicionados em sacos de papel, deixados na estufa de fluxo de ar contínuo a 40°C, por um período de sete dias. Após secagem, o material foi moído e imerso em álcool etanólico a 96%, na proporção de 1:3, por 72 horas em temperatura ambiente, para obtenção do extrato, pela técnica da maceração. O extrato era filtrado e armazenado em frasco de vidro, protegido da luz, na geladeira. Este processo de submersão, maceração e filtração foi realizado por três vezes, com intervalos de 72 horas. O filtrado total foi então concentrado a baixa pressão entre (40° e 43°), em evaporador rotativo, até a evaporação de total do solvente. O concentrado foi seco em estufa por 72hs a 40° e posteriormente pesado e diluído em água destilada estéril, na proporção mg/mL, de 1:1. Esta substância foi utilizado em todas as análises de atividade antimicrobiana

deste estudo, respeitando as recomendações da CLSI de 2012, para as análises de microdiluição em caldo.

4. 3. MEIOS DE CULTURA

4.3.1. Brain Heart Infusion (BHI Liquid) e Sabouraud Dextrose (SD Liquid medium)

O *BHI Liquid* e o *SD Liquid medium* foram empregados para os ensaios da Concentração Inibitória Mínima em microdiluição em caldo para as bactérias e leveduras, respectivamente, conforme orientação do fabricante HIMEDIA®. Preparou-se o meio duplamente concentrado, conforme a metodologia preconizada pela CLSI 2012. Após o seu preparo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.3.2. Brain Heart infusion Ágar (BHI agar) e Sabouraud Dextrose Ágar (SD Agar)

O *BHI Agar* e o *SD Agar* foram empregados, respectivamente, para determinar à Concentração Bactericida Mínima e Fungicida Mínima, cujo preparo foi de acordo com a orientação do fabricante HIMEDIA®. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida, em placas de Petri 90x15 lisa foram distribuídos 20 ml do meio. Após o processo de geleificação, as placas foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e armazenadas na geladeira até a sua utilização.

4.4. CONTROLES UTILIZADOS

- Clorexidina 0,12% (controle negativo empregado nas bactérias padrão)
- Ciprofloxacino 10% (controle negativo utilizado nas bactérias multirresistentes)
- Nistatina (controle negativo utilizado nas leveduras)
- Álcool etílico 96% (controle solvente utilizado em bactérias e fungos)

4.5. CEPAS E LEVEDURAS

Foram testadas cepas padrão (*American Type Colection Culture–ATCC*) de bactéria Gram positiva e Gram negativas recomendadas para testes de sensibilidade (CLSI, 2012). As bactérias multiresistentes foram isoladas de pacientes, hospitalizados e doadas para este estudo por uma microbiologista. As leveduras selecionadas representam os patógenos mais comuns de infecção oportunista na cavidade bucal. Todas as cepas padrão foram cedidas pela FIOCRUZ.

4.5.1 Bactérias padrões

- *Eucherichia coli* (ATCC 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

4.5.2. Bactérias multirresistentes

- *Proteus mirabilis* (PNCQ)
- *Providência rettgeri* (PNCQ)
- *Eucherichia coli* (PNCQ)

Tabeba 1- Apresentação do antibiograma das bactérias multirresistentes utilizadas no presente trabalho.

Antibióticos	<i>P.rettgeri</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.mirabilis</i>
SUT (Sulfametoxazol)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CIP (Ciprofloxacino)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CFL (Cefalotina)	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE	SENSÍVEL
GEN (Gentamicina)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
AMP (Ampicilina)	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE
AMI (Amicacina)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CPM (Cefepima)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
TET (Tetraciclina)	RESISTENTE	SENSÍVEL	RESISTENTE
CRO (Ceftriaxona)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
AMC (Amoxicilina + Ác. Clavurônico)	RESISTENTE	RESISTENTE	RESISTENTE
CFO (Cefoxitina)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CAZ (Ceftazidime)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
CLO (Clorafenicol)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
ATM (Aztreonam)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
PIT (Pipenocitalina)	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL

4.5.3 Leveduras

- *Candida albicans* (ATCC 18804)
- *Candida glabrata*
- *Candida guilliermond* (ATCC 6260)
- *Candida krusei* (ATCC 34135)
- *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)
- *Candida tropicalis*

4.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Momordica Charantia L.* foi empregado o método de microdiluição em caldo,

conforme metodologia descrita por Lima et al. 2006 e Santos et al. 2007. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da UEPB, cujos ensaios foram realizados em triplicata.

4.6.1 .Preparação dos inóculos

4.6.1.1. Bactérias

As bactérias foram replicadas em tubos de ensaios contendo (BHI Liquid) estéril e incubadas em estufa de cultura a 37°C por um período de 24 horas. Decorrido o tempo, foram semeadas em placa petri de 90x15 lisa, contendo BHI ágar e reincubadas em estufa de cultura a 37°C por mais 24 horas. Decorridas as 24 horas de crescimento bacteriano, foi iniciado o preparo das suspensões bacterianas (inóculo). Foi transferida com auxílio de uma alçada colônias de cada espécie bacteriana da placa de Petri para tubos de ensaio estéreis com tampa contendo 5 ml solução salina (0,85%) esterilizada. Cada suspensão foi homogenizada no vórtex por 1 minuto, ajustando sua absorbância entre 0,08% a 0,10% e transparência de 85% a 625 nm, com o auxílio de um espectrômetro, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ céls/mL. A suspensão 1×10^8 UFC/mL foi diluída de 1:20 para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC/mL. Quando 10ul dessa suspensão foi inoculado no caldo, a concentração final de bactérias do teste foi de aproximadamente 5×10^4 UFC/poço, no método de microdiluição. O volume do meio adicionado no poço foi de 100 ul e o volume do inóculo 10ul. O inóculo microbiano foi padronizado de acordo com o CLSI, M7-A6, vol. 23, n. 2 (2012).

4.6.1.2 Leveduras

As leveduras foram replicadas em tubos de ensaios contendo (SD Liquid medium) estéril e incubadas em estufa de cultura a 30°C por um período de 48 horas. Decorrido o tempo, foram semeadas em placa petri de 90x15 lisa, contendo 20ml de SD ágar, e reincubadas em estufa de cultura a 30°C por mais 48 horas. Decorridas as 48 horas de crescimento fungicida, foi iniciado o preparo das

suspensões fungicida (inóculo). Foi transferida com auxílio de uma alçada colônias de cada espécie fungicida da placa de Petri para tubos de ensaio estéreis com tampa contendo 5 ml solução salina (0,85%) esterilizada. Cada suspensão foi homogenizada no vórtex por 1 minuto, ajustando sua absorbância a 0,10% e transparência de 85% a 530 nm, com o auxílio de um espectrômetro, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ céls/mL. O volume do meio no poço foi de 100ul e o volume de inóculo 10ul. A suspensão 1×10^8 UFC/mL foi diluída de 1:20 para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC/mL. Quando 10ul dessa suspensão foi inoculado no caldo, a concentração final das leveduras foi de aproximadamente 5×10^4 UFC/poço. O inóculo microbiano foi padronizado conforme descrito no CLSI, M27-A, v. 25, n.1 (2012).

4.6.2. Preparação da Microplaca

Para o teste de microdiluição foram usadas microplacas de 96 cavidades, com fundo em forma de “U” e com tampa (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). As colunas “1” e “12” e linhas A, B e C receberam o controle positivo (100 ul de meio de cultura + 10 ul do inóculo), as linhas D e E o controle do meio de cultura (100 ul do meio de cultura), as linhas F, G e H receberam o controle negativo (100ul do meio de cultura + 20ul do antibiótico + 10 ul do inóculo). Para as colunas “2” , “3”, “4”, “9”, “10” e “11”, foram realizados a avaliação do extrato. Foram distribuídos 100 µL do meio de cultura nos orifícios de cada coluna, em seguida 100ul do extrato no primeiro orifício da placa. Realizou-se a diluição seriada, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada (1º orifício) para a cavidade sucessora ficando nas concentrações, 0,50mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,062 mg/mL; 0,031; 0,015 mg/mL; 0,007 mg/mL e 0,003 mg/mL respectivamente. Ao final da microdiluição seriada eram desprezados 100ul da solução (meio + inoculo). Por último, eram acrescentados 10ul do inoculo. Nas colunas “5” e “8” foram utilizadas para controle do solvente, onde foram distribuídos 100 µL do meio de cultura e 100ul do álcool etanólico a 96% no primeiro orifício da placa, e depois realizadas diluições seriadas, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, sendo no final desprezados um volume de 100ul. As microplacas das bactérias foram incubadas a 37°C durante 24 horas, e as microplacas das leveduras foram incubadas a 25°C, durante 48horas. A figura 3

explicita o esquema da preparação das microplacas. Em cada placa foram analisados dois microrganismos simultaneamente, ficando da coluna 1 a 5 para uma espécie e da coluna 8 a 12 para outra.

Figura 3. Representação esquemática da técnica da microdiluição em caldo, utilizada na pesquisa.

X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
B	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
C	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
D	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
E	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
F	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
G	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■
H	■	■	■	■	■	□	□	■	■	■	■	■

Legenda:

- Controle positivo (meio 100ul + inoculo 10ul)
- Controle Meio (meio 100ul)
- Controle negativo (meio 100ul + antibiótico 20ul + inoculo 10ul)
- Avaliação do extrato [100ul meio + 100ul extrato + inoculo 10ul]
- Controle o solvente [100ul meio + 100ul solvente + 10ul inoculo]
- Não foram utilizados.

4. 7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM do extrato etanólico da *Momordica de Charante L.* foi realizada pelo método visual, utilizando-se do preparo da microplaca, conforme descrito anteriormente, onde foram avaliados a presença ou não de agregados de células na porção inferior do orifício da placa. A CIM foi considerada aquela menor concentração do extrato capaz de inibir visivelmente o crescimento dos microrganismos.

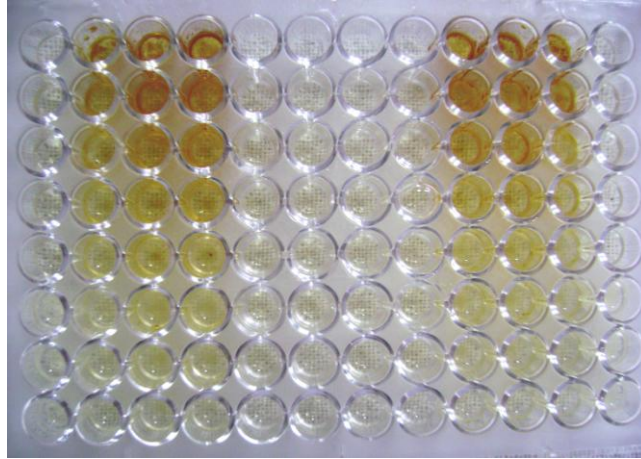


Figura 4. Representação da avaliação visual, da técnica da microdiluição em caldo (BHI Liquid), decorridas 24 horas de incubação a 37°C.

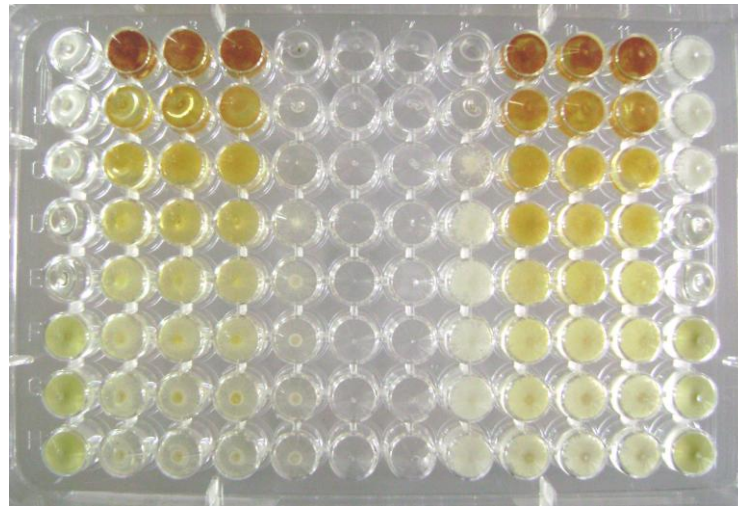


Figura 5. Representação da avaliação visual, da técnica da microdiluição em caldo (SD liquid médium), decorridas 48 horas de incubação a 25°C.

Para ratificação da existência de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias foi dispensada uma alíquota de 10 μ L do corante Rezasurina na concentração de 0,001% em água destilada estéril em todas as cavidades utilizadas da microplaca (inclusive nos controles), As placas foram incubadas por 24 horas e 48 horas para as bactérias e leveduras, respectivamente. Este corante é capaz de distinguir as amostras com microrganismos viáveis, através da coloração vermelha, daquelas sem vida microbiana, coradas de azul.

4. 8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Para determinação da CBM e da CFM, o resultado correspondente à CIM e outras quatro concentrações (duas mais concentradas e duas em menor concentração em relação à CIM), além dos controles positivos foram subcultivados em placas de Brain Heart infusion ágar (BHI ágar) e Sabouraud Dextrose ágar (SD ágar), respectivamente, desprovido de qualquer antimicrobiano. Após 24 horas de incubação a 37 °C para as bactérias e 48 horas a 30°C, para leveduras, as leituras das placas foram obtidas baseando-se no crescimento dos controles, sendo considerada CBM e CFM a menor concentração do extrato que impediu o crescimento visível do cultivo.

|

5. RESULTADOS

Através da técnica de microdiluição em caldo verificou-se a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *Momordica Charantia* L, sobre todas as cepas e leveduras estudadas no presente trabalho. Os resultados demonstraram maior sensibilidade dos isolados multirresistentes ao extrato, quando comparadas com as cepas padrão (Tabela 2). Em relação as leveduras, o extrato apresentou melhores resultados frente as espécies de *C. guillermondi* e *C. parapsiplosis* (Tabela 3).

Tabela 2- Apresentação da atividade antibacteriana do extrato *Momordica Charantia* L frente às espécies estudadas.

	CEPAS PADRÃO			CEPAS MULTIRRESISTENTES		
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>E. coli</i>
CIM*	0,062	0,031	0,062	0,003	0,007	0,031
CBM*	0,125	0,062	0,062	0,007	0,007	0,062
Controle negativo**	S	S	S	S	S	S
Controle solvente***	R	R	R	R	R	R

*concentração em mg/mL

** S (sensível)

*** R (resistentes)

Tabela 3- Apresentação da atividade fungicida do extrato *Momordica Charantia L* frente às espécies de *Candida* estudadas.

	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS					
	<i>Candida guilliermondi</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsiplosis</i>	<i>Candida glabata</i>
CIM*	0,031	0,125	0,062	0,062	0,015	0,031
CFM*	0,031	0,125	0,125	0,062	0,031	0,062
Controle negativo**	S	S	S	S	S	S
Controle solvente***	R	R	R	R	R	R

*concentração em mg/mL

** S (sensível)

*** R (resistentes)

6. DISCUSSÃO

A utilização dos produtos naturais no meio odontológico tem crescido nos últimos anos devido à busca por novos fármacos com maior atividade terapêutica, menor toxicidade, melhor biocompatibilidade e menor custo. Aceitação popular dos fitoterápicos reflete boas perspectivas no mercado de produtos odontológicos que contem substâncias naturais (ACRA, 2007).

Considerando que as principais doenças que acometem a cavidade bucal são de origem microbiana é recomendável o uso de substâncias que tenham efeito microbicida sobre microrganismos, especialmente, aqueles causadores da cárie, doença periodontal e candidose. (MODESTO et al 2001).

A *M. charantia* L. foi alvo de estudo e apresentou resultados positivos a atividade bactericida na técnica de microdiluição. A atividade antimicrobiana dos frutos desta planta foi anteriormente constatada por He (1998), quando utilizou cepas padrão das espécies em estudo, através da técnica do poço. Utilizando outras espécies, Dias et al (2000) também encontraram atividade antifúngica e bactericida do extrato desta planta. Por outro lado, Elizabeth et al (2009) não encontrou atividade para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Esta diferença de resultados pode ser atribuída a vários fatores, entre eles a técnica utilizada. A microdiluição em caldo tem sido considerada um excelente método para analisar a atividade de antimicrobianos, com maior sensibilidade quando comparados aos outros métodos (ANDEWS 2001; ALVES et al 2008).

Os resultados encontrados no presente trabalho denotam eficácia do extrato da *M. charantia* L em baixas concentrações, tanto para as bactérias como para as leveduras, os quais apontam a necessidade de mais estudos, com vistas ao desenvolvimento de um produto farmacêutico para uso na clínica odontológica. Siani (2003) justifica a sua aplicação, em decorrência do baixo custo e baixos efeitos colaterais.

Destacam-se os resultados encontrados com os isolados multirresistentes, que apresentaram suscetibilidade ao extrato em concentrações mais baixas do que aquelas evidenciadas com as cepas padrão. A resistência aos antimicrobianos tem sido associada à formação de enzimas, às alterações de receptores e ao acesso limitado aos antibióticos (TORTORA et al. 2003).

7. CONCLUSÃO

O extrato etanólico dos frutos da *M. charantia* L. apresentou eficácia “in vitro” contra todas as espécies testadas, com melhor ação frente aos isolados resistentes, o que constitui perspectivas importantes para obtenção de antibióticos.

Ratifica-se a importância de estudos com a planta em questão, no sentido de definir suas características fitoquímicas, mecanismo de ação, toxicidade, entre outros, com definição da sua potencialidade terapêutica.

REFERÊNCIAS

Acha, PN; Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 ed. V1p. Washington, D.C.:OPAS, p 248-249, 2003

Almeida M.T.G., Bertelli E.C.P., Rossit A.R.B., Bertollo E.M.G., Martinez M.B. infecções hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. Arq Cienc Saude . jul-set, 2009.

Alves E.G. Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Química Nova, 31(5): 1224-9, 2008

Andrews JM, Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 48(1): 5-16, 2001

Antunes, AGV; Pasqualotto, AC; DIAZ MC; d'AZEVEDO, PA & SEVERO, LC - Candidemia em um hospital terciário brasileiro:. Distribuição de espécies e padrões de susceptibilidade antifúngica Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 46: 239-241, 2004.

Arendrup, M.; Horn, T. & Frimodt-MOLLER N. - In vivo patogenicidade de oito clinicamente relevante *Candida* espécies em um modelo animal. Infecção, 30: 286-291., 2002

Assubaie, N. F. E El-Garawany, M. M.. Evaluation of Some Important Chemical Constituents of *Momordica charantia* Cultivated in Hofuf, Saudi Arabia Journal of Biological Sciences, 4, 628-630. 2004

Batran, S.A.E.S. et al. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, v.108, n.2, p.236-42, 2006.

Beloin, N.; Gbeassor, M.; Akpagana, K.; Hudson, J.; Soussa, K.; Koumaglo, K.; Arnason, J. T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 29, p. 49-55. 2005.

Bennett JE, Izumikawa K, KA Marr 2004. Mecanismo de resistência aumentada fluconazol em *Candida glabrata* durante a profilaxia. *Antimicrob Agents Chemother* 48 : 1773-1777.

Calderone RA. *Candida e candidíase*. 1^a ed. Washington (DC): Imprensa ASM; 2002.

Celoto, M.I.B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.30, n.1, p.1-5, 2008.

Chon C H, Lai FC, Shortliffe LMD. Pediatric Urinary Tract Infections. *Ped Clin N Amer*; v48:1441-59, 2001.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D, J Morgan, o Estudo Candidemia Rede Brasileira de 2006. *Epidemiologia de candidemia no Brasil: a vigilância sentinela nacional de candidemia em 11 centros médicos*. *J Clin Microbiol* 44 : 2816-2823.

Colombo, Al; Nakagawa, Z.; Valdetaro, F. et al. - perfil de susceptibilidade de 200 isolados da corrente sanguínea de *Candida* spp. coletados de brasileiros hospitais terciários. *Med. MyCol*, 41: 235-239., 2003

Dey, S. S.; Singh, A. K.; Chandel, D.; Behera, T. K. Genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits. *Scientia Horticulturae*. Vol. 109, p. 21-28. 2006.

Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2004; 4(1):33-8.

Ethnopharmacology, v.64, p.199-206, 1999.

Forsythe, SJ; Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Arthmed 2002.

Franco, BDG. Microbiologia de Alimentos, São Paulo, Atheneu, 2005, 182 p.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Divulgação em distintas regiões brasileiras de uma epidemia carbapenem resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- β SPM-lactamase. J Antimicrob Chemoter 2003; 52:699-702.

Germano, PML.; Germano, MIS.; Higiene e vigilância sanitária de alimentos: quantidade de matéria prima; doenças transmitidas por alimentos; treinamento de recursos humanos. 2ª ver. Ampl. São Paulo: Livraria Varele, 2003, 655p.

Gräf T, Fuentefria DB, Corção G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase bla SPM-1 in Amostras Clínicas. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41:306-308.

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

HE, Y. B. Antimicrobial activity of *Momordica charantia*. Food Science, v. 19, n. 3, p. 34-36, 1998.

Hung CC, Yang YL, TL Lauderdale, Clifford McDonald L, C Hsiao, Cheng H, et al. Colonização do vírus da imunodeficiência humana infectados pacientes ambulatoriais em Taiwan, com espécies de *Candida*. J Clin Microbiol 2005; 43:1600-1603.

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

Kriznik A, Bouillot M, Coulon J, F. Gaboriaud especificidade morfológica de levedura *Candida albicans* e filamentosas forma sobre as propriedades da superfície. Biologias 2005; 328:928-935.

Lee K, Lim YS, Young D, Yum JH, Chong Avaliação Y. do Teste de Hodge ea Imipenem-EDTA Teste Synergy duplo-disco para diferenciar de metalo- β -lactamase-

produtores isolados de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 43:4623-4629.

Leite, K. L.; Nunes-Pinheiro, D. C. S.; Campello, C. C. Efeito gastroprotetor do extrato hexânico de partes aéreas de *Momordica charantia*. *Ciência Animal*, 15(1):15-20,2005.

Lenzi, M.; Orth, A. I.; Guerra, T. M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, V.28, n.3, p.505-313, jul.-set. 2005.

Lima MRF, Luna JS, Santos AF. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105:137-14.

Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2000, 3^o ed. 640p.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 544p.

Loureiro MM, Moraes BA, Mendonça VLF, Quadra MRR, Pinheiro GS, MD Asensi *Pseudomonas aeruginosa*: Estudo da resistência aos antibióticos e tipagem molecular em casos de infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Rio de Janeiro, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:387-394.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2 ed. Fortaleza: Imprensa Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, SILVA RMF, Rolim-Neto PJ, Barbosa WLR, VIEIRA JMS. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Vol. 32, No 1 (2011).

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. *J Bras Patol Med Laboratorial* 2006; 42:103-113.

Omogbe, R.E., Ikuebe, O.M., Ihimire, I.G. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *African Journal of Medical Science*, v.25, p.373-375, 1996.

Pasqualotto, AC; Nedel, WL; MACHADO, TS & SEVERO, LC - Fatores de risco e de resultados para candidemia nosocomial avanço *J. Infectar*, 52: . 216-222, 2006

Pasqualotto, AC; Nedel, WL; MACHADO, TS & SEVERO, LC - Um estudo comparativo de fatores de risco e de resultado, em ambulatório-hospitalar adquirida candidemia e *J. Hosp. Infect*, 60: . 129-134, 2005

Pereira M SV, Maia RR, Higino JS, Siqueira-Júnior JP, Albuquerque ACL, Pereira LF, Macedo-Costa MR, Pereira AV. EFEITO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DE *Momordica charantia* LINN ISOLADO E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS SOBRE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES; ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido, v.04, 12-17, 2008.

Pereira, L. F. Efeito antimicrobiano dos extratos de *Momordica charantia* Linn. e *Psidium Gecajava* Linn. isolados e em associação sobre linhagens de *Staphylococcus aureus*. In: Anais do XIV encontro de iniciação científica da UFPB, 2006.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, Diekema DJ 2004. In vitro atividades de voriconazol, posaconazol e fluconazol contra 4.169 isolados clínicos de *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans* coletados em 2001 e 2002, no mundial ARTEMIS programa de vigilância anti-fúngico. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48: 201-205.

Ribeiro, L. F.C.; Mello, A. P. A.; Bedendo, I. P.; Kitajima, E. W.; Massola Júnior, N. S.. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) no estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, 30, 3. 2004.

Robinson, R. W.; Decker-Walters, D. S. Cucurbits. New York: Cab International, 1997. SAS Institute Inc. SAS Onlinedoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. PIM, VIM e SPMs: a diversidade de metalo- β -lactamases produzidas por carbapenem resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital brasileiro. *Clin Infect Microbiol* 2004; 11:73-76.

Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Rev Bras Farmacogn.* 2007; 17(2):215-9.

Senanayake, G. V. K.; Maruyama, M.; Shibuya, K.; Sakono, M.; Fukuda, N.; Morishita, T.; Yukizaki, C.; Kawano, M.; Ohta, H.. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 257–262. 2004.

Siani AC. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptori; 2003.

Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

Silva JR., EA. *Manual de controle higiênico- sanitário em serviços de alimentação*. 6ª Ed. São Paulo Valera, valera, p. 623

Souza, J.A.L. *Plantas medicinais usadas como anti-helmínticas: estudo químico de *Spigelia anthelmia* Linn.* Fortaleza. Monografia (Bacharelado em Química), Universidade Estadual do Ceará, 2001.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed. 2003. Traditional medicine in Turkey IX: folk medicine in north-west Anatólia. *Journal of Universitária*, Universidade Federal do Ceará, 1997.

Yesilada, E.; Sezik, E.; Honda, G.; Takaishi, Y.; Takeda, Y.; Tanaka, T.

Yuwai, K. E.; Rao, K. S., Kaluwin, C.; Jones, G. P.; Riwet; D. E. Chemical Composition of *Momordica charantia* L. Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1762-1763. 1991.