

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DE EXTRATO ETANÓLICO NEBULIZADO DE FOLHAS DA *Momordica charantia* L. FRENTE A CEPAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES

Natália Lira Messias; Angelica Pereira Ribeiro; Naara Felipe da Fônsaca; Paloma Nascimento Lima; Delcio de Castro Felismino

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

natxi_lira_messias@hotmail.com;angelyca.p07@gmail.com;naaraffelipe@gmail.com;
paloma.n.lima@hotmail.com;delciofelismino@gmail.com

Os estudos científicos vêm buscando estratégias que possam atuar como um produto inovador para combater a multirresistência. Constata-se a possibilidade de utilização de espécies vegetais para síntese de novos medicamentos antimicrobianos ou ainda como agentes capazes de modificar a resistência microbiana. Dentre as espécies vegetais, a *Momordica charantia* L. (melão-de-São Caetano), pertencente à família das Cucurbitaceae, planta originária da África, estando adaptadas as condições edafo-climáticas do Brasil. Indicada popularmente para variadas patologias, como o tratamento de gastrite, úlceras e infecções microbianas. Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de extrato etanólico nebulizado de folhas da *M. charantia* L. frente a cepas bacterianas de *Escherichia coli*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos/UEPB. As folhas de *M. charantia* foram submetidas ao processo de secagem e moagem. A partir desse material foi obtido o extrato etanólico, através do método de percolação. Para obtenção do extrato nebulizado foi utilizado o equipamento spray dryer. A suscetibilidade microbiana foi determinada pelo método de microdiluição. O perfil citotóxico foi determinado através da suspensão de hemácias. A CIM do antibiótico foi determinada na presença do microorganismo, em concentrações subinibitórias. A curva bacteriana frente aos referidos extratos foi avaliada pelo método de Peyret. Foram realizados os estudos dos parâmetros térmicos determinando a estabilidade do extrato nebulizado obtido, detectando possíveis interações químicas. Os resultados da avaliação microbiológica foram satisfatórios, sendo possível a indicação desse extrato como promissor para o desenvolvimento de podendo ser uma opção para o desenvolvimento de um fitoterápico com indicação para doenças infecciosas.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, *Escherichia coli*, Citotoxicidade

1. Introdução

O uso de antimicrobianos está cada vez mais disseminado, ocasionando o desenvolvimento de defesa dos micro-organismos frente aos agentes antimicrobianos, dando origem e evolução ao fenômeno da resistência microbiana. Esta é um mecanismo biológico natural, e pode ser atribuída a diversos fatores, segundo Floréz (1997), Freitas (2003), Melo (2012), inativação de antimicrobianos através de enzimas que modificam ou hidrolisam estes agentes; por alteração dos receptores-alvo, em decorrência da aquisição de um alvo com reduzida afinidade ao antimicrobiano ou através de mutação de genes que codifiquem este alvo ou por um acesso limitado dos antimicrobianos (FREITAS, 2003).

Com isso, os estudos científicos buscam estratégias para combater a multirresistência, vendo nos países tropicais e em desenvolvimento, como o Brasil, uma boa alternativa para a inovação com novos produtos com atividade antimicrobiana, oriundos de espécies vegetais (MARSH, 2010).

As plantas pertencentes ao nordeste brasileiro possuem múltiplos usos na medicina popular local. Esse uso baseia-se no conhecimento de raizeiros ou mesmo no que passa de geração em geração (AGRA, 2007). De acordo com Cowan (1999) e Loguercio (2005), inúmeras espécies vegetais são utilizadas com fins antimicrobianos, esta propriedade deve-se principalmente as substâncias bioativas, como é o caso dos polifenóis, alcaloides, entre outros. Muitas destas espécies foram avaliadas não só por sua atividade antimicrobiana direta, mas também como agentes modificadores de resistência (COUTINHO et al., 2012).

A *Momordica charantia* L., conhecida popularmente por melão-de-São (FELISMINO; DANTAS, 2007), de crescimento rápido, comum em terrenos abandonados. (ROBINSON; DECKER-WALTERS, 1997). Indicada pela população para o tratamento de diversas patologias de origem microbiana (LORENZI; MATOS, 2000; DANTAS; FELISMINO; 2007).

As associações entre antibiótico e extrato vegetal podem ser feitas para obter uma otimização da ação do antibiótico, representando uma maior potência à uma pequena concentração da substância. Nesta perspectiva, as associações podem ser classificadas em sinergismo, quando os dois compostos interagem de forma positiva, diminuindo significativamente a concentração do antibiótico que está sendo resistido; indiferente, quando a interação dos compostos não apresenta mudanças significativas na concentração do antibiótico; e antagonismo, quando a associação causa um efeito negativo podendo dificultar a ação do antibiótico (MATIAS, 2013).

Baseando-se nas inúmeras indicações populares de uso terapêutico desta espécie, fazem-se necessários maiores estudos que demonstrem outras propriedades biológicas, como a atividade antimicrobiana e, indo mais além, avalie sua capacidade de modular a atividade de antibióticos específicos, possibilitando assim um uso seguro e eficaz da *M. charantia*.

Portanto, este estudo objetiva avaliar as atividades antimicrobianas e moduladora dos extratos fracionados de folhas da *M. charantia* frente à cepas bacterianas multirresistentes.

2. Metodologia

2.1. Local de estudos

A pesquisa foi realizada no Laboratório Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM), no Centro de Ciências e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba.

2.2. Obtenção do material vegetal

As folhas de *M. charantia* foram coletadas, a partir de plantas adultas selecionadas, respeitando suas características fitossanitárias, no município de Esperança, na região Semiárida do estado da Paraíba, a área foi selecionada após estudo prévio. A exsiccata foi depositada no Herbário Arruda Câmara/Universidade Estadual da Paraíba.

2.3. Obtenção dos extratos vegetais

As folhas foram embaladas em sacos de papel tipo Kraft, sendo, posteriormente, submetidas ao processo de secagem, em estufa de ventilação forçada, à uma temperatura de 40 ± 1 °C, até estabilização da umidade. Após a secagem, o material seco foi triturado em um moinho do tipo Willey®, no qual foi obtido um pó fino, o qual, posteriormente foi peneirado em tamis de numeração 10 mesh.

As folhas foram embaladas em sacos de papel tipo Kraft, sendo, posteriormente, submetidas ao processo de secagem, em estufa de ventilação forçada, à uma temperatura de 40 ± 1 °C, até estabilização da umidade. Após a secagem, o material seco foi triturado em um moinho do tipo Willey®, até a obtenção de um pó fino.

A partir do material moído e peneirado (pó) foi obtido o extrato etanólico a 96%, através do método por maceração a frio (PRISTA et al., 1990). Posteriormente, o extrato etanólico foi submetido ao processo de secagem no aparelho Spray drier.

2.4. Análise Microbiológica

2.4.1. Cepas microbianas

Na primeira fase, foram obtidos os isolados clínicos de *Escherichia coli*, a fim de conhecer o seu perfil de resistência, os mesmos foram analisados através de antibiograma (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI, 2005). Com base nos resultados foi selecionado o antibiótico Gentamicina o qual os micro-organismos mostraram sensibilidade.

2.4.2. Atividade antimicrobiana

A suspensão de cada micro-organismo foi obtida a partir da transferência de culturas crescidas sobre o meio de cultura Agar Nutrient, com alça estéril, para um tubo de ensaio contendo 3 mL de solução salina 0,9 % estéril. O inóculo microbiano foi padronizado de acordo com CLSI (2005), em espectrofotômetro com absorbância entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625 nm, de modo a obter-se uma preparação microbiana com concentração final próxima a 10^6 UFC.m.L⁻¹.

2.4.3. Teste de susceptibilidade microbiana

A susceptibilidade microbiana aos extratos foi determinada pelo método de micro diluição em caldo utilizando microplacas estéreis como descrito pelo CLSI (2003), com adaptações. Para *E. coli*, foi utilizado caldo Mueller Hinton.

Na segunda fase, a propensão microbiana foi determinada pelo método de micro diluição em caldo utilizando microplacas estéreis como descrito por CLSI (2005), com adaptações. A técnica de diluição em caldo é relacionada entre a proporção de crescimento dos micro-organismos testados no meio líquido e a concentração de substância utilizada, neste caso o extrato e suas respectivas frações. Foram realizadas diluições seriadas do extrato, logo após a diluição, as placas foram incubadas a 37 °C/24h, sendo os ensaios realizados em triplicata.

O crescimento microbiano foi indicado através da utilização de resazurina, um corante azul não-fluorescente e não-tóxico que se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina por oxidoredutases dentro das células microbianas viáveis (PALOMINO et al., 2002; SARKER et al., 2007; ANG et al., 2010). Foram adicionados 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% em cada poço, e incubação a temperatura ambiente/2h.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada com leitura visual observando a mudança de coloração da resazurina, de azul para rosa, caracterizada pela reação de redução no corante, indicou a presença de células microbianas viáveis. Dessa forma foi possível determinar a CIM, representando a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano.

Controles do meio de cultura, do inóculo microbiano, do diluente e apenas dos extratos de plantas foram incluídos no experimento e os ensaios realizados em triplicata.

2.4. Citotoxicidade

A preparação de hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz Silva et al. (2000), seguidas de algumas modificações. O sangue doado pelo Laboratório de Análise Clínicas em tubo com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada três vezes com solução salina 1%. As hemácias foram novamente suspendidas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 5%. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL da suspensão de hemácias a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções teste nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ em tubos de ensaio, os quais foram deixados em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, sendo retirado o sobrenadante retirado para a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu* UV mini – 1240) em um comprimento de onda de 504 nm (CRUZ SILVA et al, 2001). O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o negativo foi a solução salina 1%. A análise foi feita em triplicata. O potencial hemolisante das substâncias em cada concentração foi calculado conforme a equação abaixo:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph = Potencial hemolisante

Ae = Absorbância da amostra testada

Ab = Branco da amostra testada

At = Absorbância do controle positivo

2.5. Análise Térmica

Os estudos dos parâmetros térmicos serão realizados com a finalidade de determinar a estabilidade do extrato nebulizado obtido e dos excipientes utilizados, com a finalidade de se detectar possíveis interações químicas.

A curva de análise térmica diferencial (DTA) foi obtida num calorímetro, marca TA, no qual será utilizado um fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, como gás de purga da amostra. A programação utilizada foi de 25 até 500 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. A massa utilizada foi de 2,0 ± 0,2 mg, a qual foi acondicionada num porta amostra de alumínio.

Para obtenção da curva termogravimétrica (TG) isotérmica e não-isotérmica, utilizou-se uma termo balança, marca TA, com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até temperatura de 900 °C, numa atmosfera de ar com fluxo constante de 10 mL.min⁻¹. A massa utilizada foi de 8,0 ± 2,0 mg, a qual foi acondicionada num porta amostra de alumina. Os dados foram analisados usando o *software* da TA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Teste de Suscetibilidade

A medicina tradicional em alguns aspectos é ineficaz devido às infecções causadas pelos mecanismos de resistências desenvolvidos por alguns micro-organismos. Atualmente, a produção de novos antibióticos contra esses agentes baseia-se em pesquisas com produtos naturais. Os resultados positivos obtidos neste teste de ação antimicrobiana do extrato de *M. charantia* L numa concentração inibitória mínima de 0,1875 mg/ml corroboraram com os autores que já defendiam o potencial farmacológico ativo das plantas medicinais (LEELAPRAKASH, 2011; RAMAN; LAU, 1996; BASCH, 2003).

A avaliação antimicrobiana foi eficaz para identificar a concentração inibitória mínima do extrato de *M. charantia* L. frente à cepa padrão *Escherichia coli* (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade microbiológica do extrato e suas frações, e Gentamicina frente a cepa resistente *Escherichia coli*.

Amostras	CIM mg/ml
E.E	0,1875
GENT	0,0125

E.E: extrato etanólico; GENT: Gentamicina.

Observa-se que a concentração inibitória mínima apresentada foi de 0,1875 (g/mL). O antibiótico utilizado como controle positivo foi testado anteriormente em antibiograma e apresentou sensibilidade ao micro-organismo em teste. Apresentando assim, CIM em todas as concentrações diluídas na placa.

Diante disso, as atividades evidenciadas pelo extrato na concentração de 3 mg/ml é uma colaboração para a defesa do potencial farmacológico ativo das plantas medicinais.

3.2. Teste de Citotoxicidade

Estudos toxicológicos in vitro se tornam uma opção na triagem em busca de plantas que possuam efeitos tóxicos, além de diminuir custos, obter respostas rápidas e colaborar com o princípio dos 3 “erres” (reduction, refinement e replacement) - redução, refinamento e substituição (BEDNARCZUK et al., 2010).

Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos popularmente pelas pessoas, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010; MARTINS et al., 2012;).

O extrato submetido ao teste (Tabela 2) não apresentou citotoxicidade significativa nas concentrações testadas. Iniciou-se com uma concentração de 50 mg/mL, a qual é superior a concentração utilizada no ensaio microbiológico, apresentando um potencial hemolisante de menos que 20% em relação ao controle positivo de referência. Enquanto as concentrações decrescentes à inicial o potencial hemolisante apresenta-se inferior. Desse modo, é possível observar que o pH da CIM (0,1875 mg/mL, Tabela 1) é mínimo, menos que 1%.

Tabela 1. Dados da Citotoxicidade de *Momordica charantia*.

Concentrações (mg/mL)	Potencial hemolisante (%)
50,000	17,05
25,000	3,37
12,500	4,50
6,250	1,60
3,125	1,40
1,560	1,01
0,780	0,98
0,390	0,90

3.3. Análise Térmica

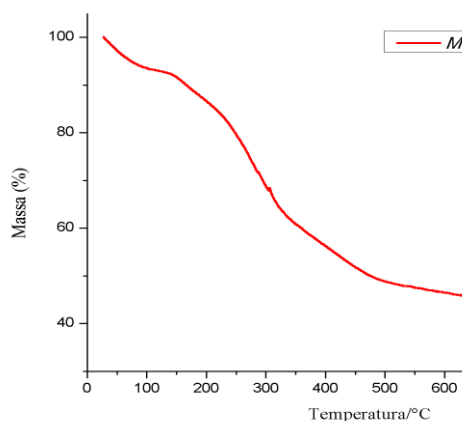
Segundo Dweck e Sampaio (2004), Garcia et al. (2004), Santos et al. (2004) e Garcia et al. (2007), os métodos termoanalíticos apresentam vantagens pois são rápidos, precisos e sensíveis, e necessitam de uma pequena quantidade de amostra.

Ao serem analisados os resultados da Termogravimetria (TG, Tabela 4) referentes a decomposição do extrato de *Momordica charantia*, constata-se que o extrato etanólico apresentou uma perda de massa em três eventos, variando entre -6,773 a -20,508 %, ao elevar a temperatura inicial de 35,64 °C a uma temperatura final de 340,14 °C, respectivamente. Ao observar o gráfico 1, verifica-se que a perda de massa do extrato é diretamente proporcional ao aumento de temperatura, o que se confirma pela representação de uma curva decrescente, e que durante 10 minutos de aquecimento, a uma temperatura de 900°C foi suficiente para uma decomposição do extrato, havendo uma perda de massa total de -20,508%. Segundo Silva (2005), ao estudar a erva de santa maria da espécie *Chenopodium ambrosoides*, afirmou que as transferências internas de massa são influenciadas por dois fenômenos particularmente importantes nos produtos biológicos: a migração dos solutos e a deformação do produto, demonstrando tais transferências em curvas também decrescentes. Esses resultados foram explicados também em estudos realizados por Strumillo e Kudra (1986) ao estudar condutividade térmica de sólidos porosos úmidos.

Tabela 4. Dados de TG referentes a decomposição do extrato vegetal de *Momordica charantia*.

Amostra	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Perda de massa (%)
Primeiro Evento	35,64	65,13	6,773
Segundo Evento	231,61	285,67	-20,494
Terceiro Evento	306,49	340,14	-20,508

Gráfico 1. Curva de Termogravimetria (TG) referente a decomposição do extrato de *Momordica charantia*.



A curva de análise térmica diferencial (DTA), (Gráfico 2 e Tabela 5) expressa os eventos decorrentes dos processos de transições de fases do extrato em função da temperatura. O primeiro pico endotérmico ocorreu em 106,61 °C (ΔH -221 J/g), sendo possivelmente decorrente da perda de constituintes voláteis presentes na amostra, tendo em vista que o extrato foi obtido a partir de uma solução etanólica. O processo de decomposição do extrato é melhor visualizado nos eventos seguintes, no intervalo entre 133,27°C e 147,68°C ocorre um segundo pico 137,90°C endotérmico (ΔH -221 J/g) o qual está relacionado com o início da decomposição térmica representado na curva TG. O terceiro evento ocorreu entre 226,17°C e 350,31°C, em um pico exotérmico (ΔH 739,64 J/g). Os eventos de decomposição térmica estão provavelmente relacionados à presença de metabólitos secundários presentes no extrato vegetal. Resultados confirmados no estudo realizado por Barbosa (2016), ao estudar a planta *Schinopsis brasiliensis* pertence à família botânica Anacardiaceae, também sugere a presença de metabólitos secundários para a explicação dos resultados obtidos.

Gráfico 2. Curva referente a DTA do extrato de *Momordica charantia*.

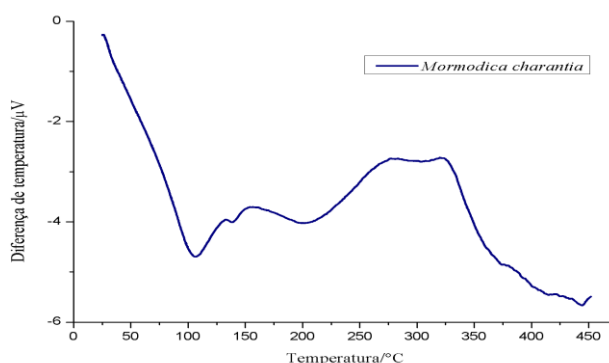


Tabela 1. Dados de DTA referentes ao extrato nebulizado de *Momordica charantia*.

Amostra	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Temperatura Pico (°C)	ΔH (J/g)
Primeiro Evento	78,14	129,46	106,61	-221
Segundo Evento	133,27	147,68	137,90	-5,16
Terceiro Evento	226,17	350,31	320,13	739,64

A análise térmica é explicada como um conjunto de técnicas que permite avaliar as propriedades físicas de um fármaco ou droga vegetal enquanto ele é submetido a uma programação controlada de temperatura. A TG e a DTA são utilizados em estudos farmacêuticos para a caracterização de fármacos,

determinação do grau de pureza, identificação de polimorfismo, avaliação da estabilidade e na decomposição térmica (MENDONÇA et al., 2013). Dessa forma, para a farmacêutica, as técnicas termoanalíticas são utilizadas em estudos de pré-formulação, fornecendo dados de fusão, degradação, decomposição, cristalização e transições vítreas das substâncias (ALVES-SILVA et al., 2014). Além disso, são aplicadas em estudos de estabilidade, pureza, cinética de degradação, caracterização e determinação de umidade (OLIVEIRA et al., 2011). As técnicas mais amplamente empregadas são: a Calorimetria Exploratória Diferencial, Análise Térmica Diferencial e Termogravimetria.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de plantas medicinais são essenciais no processo de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. O estudo microbiológico, aliado a citotoxicidade do extrato corroboram ao conhecimento mais fundamentado para a utilização da planta *Momordica charantia*. Este estudo enfatizou a importância da utilização de técnicas termo analíticas a fim de conhecer as interações térmicas do extrato ao submeter-se a uma determinada temperatura.

Os resultados obtidos indicam que o extrato testado possui um perfil de inibição frente à cepa de *Escherichia coli*, demonstrado através da concentração inibitória mínima obtida em análise. O extrato em estudo não apresenta um potencial de citotoxicidade considerável, uma vez que os seus percentuais hemolisantes foram relativamente baixos. Os parâmetros térmicos permitiram a avaliação do extrato quanto à sua perda de massa, como também a transição de fases do extrato em função da temperatura. É importante que exista a continuidade desse estudo a fim de expandir informações sobre a planta de *Momordica charantia* como alternativa de utilidade para fins terapêuticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA; FREITAS; BARBOSA FILHO. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALVES-SILVA, I.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; LIMA, E. M.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Preformulation studies of itraconazole associated with benzimidazole and pharmaceutical excipients. **Thermochimica Acta**.v.575, p.29– 33, 2014.

BASCH, E; GABARDI, S; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health and Systemic Pharmacology**. v . 65, p. 356-359, 2003.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. USA: Sixth Edition, 2003.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo, v. 25 n. 1, 2005.

COUTINHO, H. D. M. Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**, v. 41, n. 1, p. 67–72, 2012.

COUTINHO, H. D. M; COTSA, J. G. M ; FALCÃO- SILVA, V. S. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Aliment**, 41(1): 67-72; 2012.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564- 583, 1999.

DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; DANTAS, G. D. S. Plantas medicinais. **O raizeiro**. Campina Grande: EDUEP, 2007. p. 57-404

FREITAS, D. B. Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas e ação sobre plasmídios em amostras de *Staphylococcus aureus* humanas e bovina. [dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2003.

GARCIA, C. C.; FRANCO, P. I. B. M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; LELES, M. I. G. Thermal Stability Studies of some Cerrado Plants Oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p.645-648, 2007.

G. LEELAPRAKASH, J. C. R. *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Momordica Charantia* Leaves. **Pharmacophore**, 2011.

J. C. O. SANTOS, I. M. G. SANTOS, M. M. CONCEJO, S. L. Thermoanalytical, kinetic and rheological parameters of commercial edible vegetable oils. **Thermal Analysis and Calorimetry**, 75 (2004) 419

J. DWECK ; M. S. SAMPAIO, J. .Analysis of the Thermal Decomposition of Comercial Vegetable Oils in air by Simultaneous TG/DTA. **Thermal Analysis and Calorimetry**, 75 (2004) 385.

J. FLORÉZ. La Farmacología: concepto y objetivos. J. FLÓREZ. **Farmacologia Humana**. 3º ed. Barcelona, España. Masson. 1997.

J. U. GARCIA, H. I.; SANTOS, A. P.; FIALHO, F. L. T.; GARRO, N. R.; ANTONIOSI FILHO ; M. I. G. LELES. Study of the thermal stability of fish oils under nitrogen atmosphere. **Eclética Química**, 29 (2004) 41.

MARSH, P. D. Controlling the Oral Biofilm with Antimicrobials. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 1, p. 11- 15, 2010.

MARTINS, ALMEIDA, MONTEIRO. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**. São Paulo, v. 13, n. 1, p. 75-9, jan/mar. 2012.

MENDONÇA, C. M. S.; LIMA, I. P. DE B.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1-9, 2013.

MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. F. M.; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, p. 1-11, 2014.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.34, p. 1224-1230, 2011.

PALOMINO, J. C.; ANANDI M.; CAMACHO M. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2720–2722, 2002.

PRISTA, L. N. ALVES. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3 ed. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**, vol. 1, 1990.

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

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

SILVA, F. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento. 2005. 152p. **Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola)** - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

STRUMILLO, C.: KUDRA, T. Drying: principles applications and design. 1ed., **Gordon and Breach Science Publishers**, 1986, 448p.