



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Márcia Seixas de Castro

**UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DO RIZOMA DA *Curcuma zerumbet*
(Zingiberaceae) PARA PRODUÇÃO DE IOGURTE TERAPÊUTICO**

Manaus-AM, 2015

Márcia Seixas de Castro

**UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DO RIZOMA DA *Curcuma zerumbet*
(Zingiberaceae) PARA PRODUÇÃO DE IOGURTE TERAPÊUTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlo Cleomir de Souza Pinheiro

Co-orientadora: Dra. Helyde Albuquerque Marinho

Manaus-AM, 2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C355u Castro, Márcia Seixas de
UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DO RIZOMA DA Curcuma
zerumbet (Zingiberaceae) PARA PRODUÇÃO DE IOGURTE
TERAPÊUTICO / Márcia Seixas de Castro. 2015
143 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Carlos Cleomir de Souza Pinheiro
Coorientadora: Helyde Albuquerque Marinho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Alimentos Funcionais. 2. Curcuma zerumbet. 3. Iogurte. 4.
Extratos. I. Pinheiro, Carlos Cleomir de Souza II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

CASTRO, M.S. **Utilização dos extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae) para produção de iogurte terapêutico.** Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovado em: 30/10/2015

Banca Examinadora

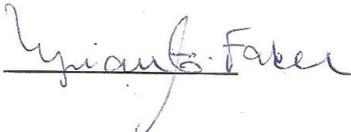
Prof.^a Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro Instituição: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Julgamento: APROVADO Assinatura: 

Prof.^a Dra. Rosany Piccolotto Carvalho Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Julgamento: Aprovado Assinatura: 

Prof.^a Dra. Myrian Abecassis Faber Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

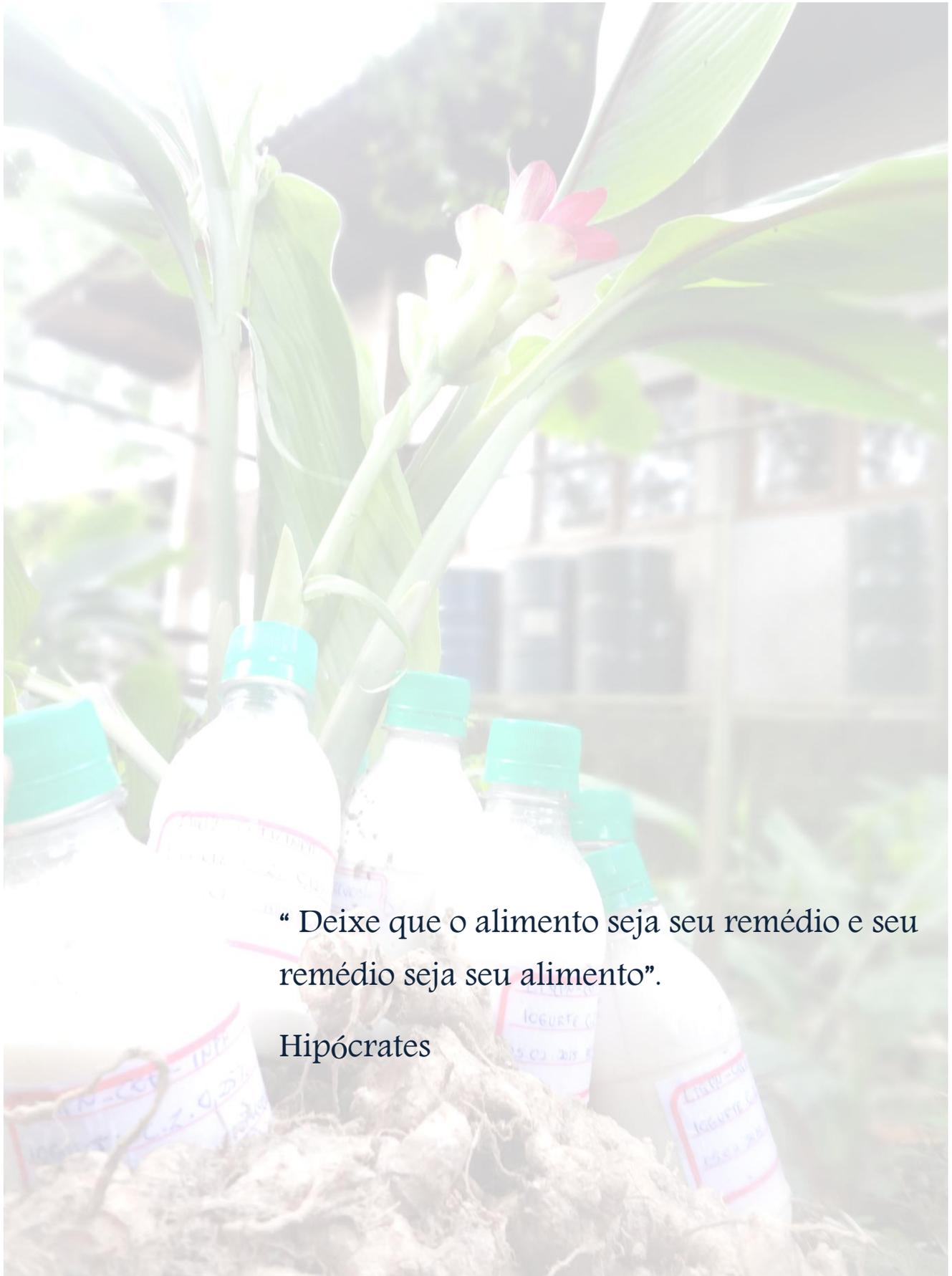
Julgamento: aprovada Assinatura: 

Prof.^a Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Julgamento: Aprovado Assinatura: 

Prof.^a Dra. Helyde Albuquerque Marinho Instituição: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

Julgamento: Aprovada Assinatura: 



“ Deixe que o alimento seja seu remédio e seu remédio seja seu alimento”.

Hipócrates

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por ter me dado a oportunidade de chegar a este patamar de conhecimento, pois sem ele não seria nada. O senhor é a minha fortaleza!

Ao Professor Dr. Carlos Cleomir, pela orientação sempre amigável, pelos ensinamentos sábios e éticos, pelo incentivo profissional, pelo respeito e dedicação ao estudo realizado.

À professora Dra. Helyde Marinho, que me incentivou desde a iniciação científica, pela compreensão, pela amizade e pelo amor.

À professora Dra. Ornella Porcu, que pouco me conhecia, estendeu-me as mãos para me ajudar no que foi possível.

Ao professor Dr. Fernando Marques e todos do seu laboratório por terem estendido a mão para me ajudar nas análises histológicas;

Aos meus pais, Bento Memória e Dalva Castro, por terem me dado a oportunidade de sonhar, estudar e nunca desistir. O que sou hoje devo a eles, por profetizarem sempre bênçãos a minha vida, amo vocês!

Ao meu esposo, Sóstenes Bader, pela sua compreensão e nunca reclamar das minhas ausências nas horas de estudo, te amo!

Aos meus alunos, Rodrigo Queiroz e Márcia Moura, pela dedicação e ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos Patrick Gomes e Daniely Machado, por sempre estarem comigo. Amo vocês!

Ao Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, por disponibilizar instalações e matérias para a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo incentivo a pesquisa e bolsa de fomento.

E por fim, agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Muito Obrigada....

RESUMO

Utilização dos extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae) para produção de iogurte terapêutico. MÁRCIA SEIXAS DE CASTRO. Orientador: Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 2015.

A tendência de hábitos mais saudáveis, as indústrias precisam inovar ou desenvolver produtos com características especiais, que promovam saúde e surpreendam o consumidor os chamados alimentos funcionais. O objetivo deste trabalho foi elaborar iogurte terapêutico com extratos do rizoma de *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae. Foram realizadas análises fitoquímicas e físico-químicas do extrato aquoso e hidroalcoólico obtidos do rizoma de *C. zerumbet*. Após esta etapa, foram realizados testes de toxicidade subaguda e farmacológicos como atividade antiúlcera, anti-inflamatória e/ou analgésica com diferentes doses. Para o desenvolvimento tecnológico do iogurte, foram testadas concentrações diferentes do extrato aquoso e hidroalcoólico. Após foram analisadas atividades fitoquímicas, físico-químicas, análises microbiológicas, contagem de bactéria láctea e pH durante o período de estocagem (dia: 0, 7, 14, 28 e 35) e para saber a aceitação deste produto terapêutico foi realizado análise sensorial. Nos testes farmacológicos foram utilizados camundongos e ratos obtidos no Biotério Central do INPA. Ambos os extratos (aquoso e hidroalcoólico) apresentaram componentes bioativos de interesse nutricional e funcional como flavonoides ($60,2 \pm 0,02$; $65,75 \pm 1,25$), antocianinas ($13,49 \pm 1,25$; $18,56 \pm 0,05$) e compostos fenólicos ($5,81 \pm 0,09$; $9,29 \pm 0,05$), além dos curcuminoides: curcumina e dimetoxicurcumina; e/ou curzerenona, compostos com propriedades farmacológicas. Atividade antiúlcera do extrato aquoso apresentou efeito a partir da dose 50 mg/Kg inibindo 57 % enquanto a dose 3500 mg/Kg inibiu 94 % a formação de úlceras por etanol nos animais, apresentando efeito dose-dependente. No entanto, a atividade antiúlcera do extrato hidroalcoólico apresentou efeito a partir da dose de 50 mg/Kg com 80 % de inibição de ulceração gástrica por etanol. O extrato aquoso e hidroalcoólico nas doses de 100, 500 1.500 mg/kg apresentaram atividades analgésica e anti-inflamatória em dose dependente testada. As composições físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes formulados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela Legislação do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. As bactérias lácteas presentes nos iogurtes sobreviveram por um período de 35 dias de armazenamento. Os iogurtes terapêuticos apresentaram gastroproteção com concentrações de 0,25 % de extrato aquoso e hidroalcoólico. No entanto, o iogurte mais aceito com escala hedônica de 7,2 foi o formulado com 0,12 % de extrato hidroalcoólico. Estes resultados indicam que estes extratos são potentes suplementos ou ingredientes para serem adicionados em iogurte e obterem propriedades terapêuticas.

Palavras-chave: *Curcuma zerumbet*, alimento funcional, extratos.

ABSTRACT

The Use of extracts from the rhizome of *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae) for the production of therapeutic yogurt. MÁRCIA SEIXAS DE CASTRO. Advisor: Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro. Thesis of Doctorate. Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Amazon - UFAM, 2014.

Keywords: *Curcuma zerumbet*, functional food, extracts.

Due to the ongoing healthier habits trend, industries need to innovate or create products bearing special characteristics, which will promote health and surprise the consumer, the so called functional foods. The objective of the present work was to elaborate therapeutic yogurt with extracts from the rhizome of *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae. We performed phytochemical and physical-chemical analyses of the aqueous and hydroalcoholic extract obtained from the rhizome of *C. zerumbet*. Next, we carried out subacute toxicity and pharmacological tests such as anti-ulcer, anti-inflammatory and/or analgesic activity with different doses. Different, aqueous and hydroalcoholic extract concentrations were analyzed for the yogurt technological development. Following this we carried out phytochemical, physical-chemical activities and microbiological analyses, counting of the lacteal bacterium and pH during the storing period (on day: 0, 7, 14, 28 and 35) and the sensorial analysis was performed so as to find out the acceptance of this therapeutic product. Mice and rats obtained from the INPA Central Animal Laboratory were utilized in the pharmacological tests. Both aqueous and hydroalcoholic extracts presented bioactive compounds, flavonoids (60.2 ± 0.02 ; 65.75 ± 1.25), anthocyanins (13.49 ± 1.25 ; 18.56 ± 0.05) and phenolic compounds (5.81 ± 0.09 ; 9.29 ± 0.05), of nutritional and functional interest in addition to the curcuminoids: curcumin and dimetoxicurcumin; and/or curzerenone, pharmacological properties-bearing compounds. The anti-ulcer activity of the aqueous extract effect from the 50 mg/Kg dose onward inhibiting 57 % while the 3500 mg/Kg dose inhibited the formation of ulcers by ethanol in animals by 94 %, presenting a dose-dependent effect. However, the anti-ulcer activity of the hydroalcoholic extract presented effect from 50 mg/Kg dose onwards with 80 % of inhibition of gastric ulceration by ethanol. Both aqueous and hydroalcoholic extract in the doses of 100, 500 and 1,500 mg/kg presented analgesic and anti-inflammatory activities in the tested dependent dose. The physical-chemical and microbiological compositions of the formulated yogurts were within the standards established by the legislation of the Fermented Milks Quality and Identity Technical Ruling. The lacteal bacteria present in the yogurt survived for a 35-day storing period. The therapeutic yogurts presented gastro protection with 0.25 % aqueous and hydroalcoholic extract concentration. Nevertheless, the most accepted yogurt with a 7.2 hedonic range showed to be the formulation with 0.12 % of hydroalcoholic extract. These findings indicate these extracts to be potent supplements or ingredients to be added in yogurts for obtaining therapeutic properties.

Keywords: *Curcuma zerumbet*, functional food, extracts.

LISTA DE FIGURAS

	Pg
Figura 1: Classificação dos compostos bioativos.	36
Figura 2: <i>Curcuma zerumbet</i> Zingiberaceae.	40
Figura 3: Estruturas químicas de alguns componentes ativos dos óleos essenciais da <i>Curcuma zerumbet</i> : furanodieno (1), furanodienona (2), curcumenona (3), curcumanolida (4), curcumenol (5), zederona (6), curzerenona (7), curzeona (8) e germacrona (9).	41
Figura 4: (A) Mapa do município Careiro da Várzea- AM; (B) Exsicata da <i>Curcuma zerumbet</i> depositada no Herbário do Inpa.	45
Figura 5: (a) Rizomas da <i>Curcuma zerumbet</i> ; (b) rizomas com corte transversal.	46
Figura 6: Fluxograma das análises qualitativas para detectar as diferentes classes de metabólitos secundários.	48
Figura 7: Fluxograma das análises quantitativas dos extratos do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	48
Figura 8: Fluxograma das análises físico-químicos dos extratos (aquoso e hidralcoólico) do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	49
Figura 9: Aplicação do extrato do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> por via intraperitoneal em camundongo.	54
Figura 10: Campo-aberto utilizado para análise de testes gerais após aplicação do extrato do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	55
Figura 11: Aplicação do extrato do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> por via oral em camundongo.	57
Figura 12: Camundongo apresentando contorção abdominal após a aplicação do extrato do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	58
Figura 13: Estimulação da dor através da pressão aplicada à pata dos ratos pelo aparelho Analgesy Meter.	59
Figura 14: Experimento de edema de pata induzido por carragenina. (A) Administração subplantar de carragenina; (B) Medição do edema com auxílio de um paquímetro.	60
Figura 15: Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de iogurtes.	62
Figura 16: Fluxograma do preparo do iogurte de extratos do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	63

Figura 17:	Cromatograma dos compostos químicos do óleo do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	70
Figura 18:	CCD do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> revelado em iodo ressublinado.	71
Figura 19:	CCD do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> revelado UV em banda 254 nm.	71
Figura 20:	CCD do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> revelado em UV banda 254 nm.	72
Figura 21:	Curva TG do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	78
Figura 22:	Curva DSC do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	79
Figura 23:	Curva DTA do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	79
Figura 24:	Curvas TG/DTA do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	80
Figura 25:	Curva TG do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> obtido sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	81
Figura 26:	Curva DSC do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	81
Figura 27:	Curva DTA do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	82
Figura 28:	Curva TG/DTA do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ .	82
Figura 29:	Avaliação dos pesos dos animais durante 28 dias de tratamento por via oral do extrato aquoso da <i>Curcuma zerumbet</i> .	92
Figura 30:	Avaliação dos pesos dos animais durante 28 dias de tratamento por via oral do extrato hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> .	92
Figura 31:	Atividade antiúlcera do extrato aquoso do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> , administrado via oral em relação à ulceração induzida por etanol em camundongos.	94
Figura 32:	Atividade antiúlcera do extrato hidroalcoólico do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> , administrado via oral em relação à ulceração induzida por etanol em camundongos.	94

- Figura 33:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a indometacina (25 mg/kg) no modelo de contorções abdominais, administrado por via oral.* Diferença significativa em relação ao controle positivo (indometacina) ($p < 0,05$). **97**
- Figura 34:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a indometacina (25 mg/kg) no modelo de contorções abdominais, administrado por via oral.*Diferença significativa em relação ao controle positivo (indometacina) ($p < 0,05$). **98**
- Figura 35:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo de Placa Quente, administrada por via oral. *Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$). **100**
- Figura 36:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo de Placa Quente, administrada por via oral. *Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$). **101**
- Figura 37:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo Analgesímetro, administrada por via oral. *Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$). **102**
- Figura 38:** Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo Analgesímetro, administrada por via oral. *Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$). **103**
- Figura 39:** Percentual do aumento do volume da pata em função do tempo (min) em ratos inoculados com carragenina (30 μ /pata). Os animais foram tratados por via oral com extrato aquoso do rizoma de *Curcuma zerumbet* 60 minutos antes após a aplicação do estímulo. **105**
- Figura 40:** Percentual do aumento do volume da pata em função do tempo (min) em ratos inoculados com carragenina (30 μ /pata). Os animais foram tratados por via oral com extrato hidroalcoólico do rizoma de *Curcuma zerumbet* 60 minutos antes após a aplicação do estímulo. **106**
- Figura 41:** Iogurtes formulados com os extratos aquoso e hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet*. **107**
- Figura 42:** Comparação da viabilidade das bactérias lácteas nos iogurtes formulados durante 35 dias de armazenamento mantidos sob refrigeração (4 °C). I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do **110**

rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

- Figura 43:** Valores de pH dos iogurtes em refrigeração (4° C) durante 35 dias de armazenamento. I.N. (iogurte natural); I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **112**
- Figura 44:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar; (b) fotomicrografia do estômago (10x), coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **113**
- Figura 45:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por ranitidina com áreas microhemorrágicas (setas); (b) fotomicrografia do estômago (20x), coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **114**
- Figura 46:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar com lesões evidentes (setas) induzidas por etanol; (b) fotomicrografia do estômago (20x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório); Hp (hiperemia). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **115**
- Figura 47:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.A. 0,12 % (iogurte com 0,12 % de extrato aquoso); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório); Hp (hiperemia). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **116**
- Figura 48:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.A. 0,25 % (iogurte com 0,25 % de extrato aquoso); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **117**
- Figura 49:** Atividade antiúlcera dos iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % de extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* administrado via oral. I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **117**
- Figura 50:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino **118**

Wistar tratado por via oral com I.E.H. 0,12 % (iogurte com 0,12 % de extrato hidroalcoólico); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

- Figura 51:** (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.H. 0,25 % (iogurte com 0,25 % de extrato hidroalcoólico); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015. **119**
- Figura 52:** Atividade antiúlcera dos iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % de extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* administrado via oral. I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **119**
- Figura 53:** Médias de aceitação dos iogurtes obtidos na análise sensorial. Pares de médias com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **121**

LISTA DE TABELAS

	Pg
Tabela 1: Fitoconstituintes e suas propriedades funcionais.	34
Tabela 2: Rendimentos dos extratos e óleos essenciais da <i>Curcuma zerumbet</i> .	68
Tabela 3: Identificação dos constituintes ativos do óleo da <i>Curcuma zerumbet</i> detectados por CG-MS.	69
Tabela 4: Perfil fitoquímico qualitativo dos extratos aquoso e hidroalcoólico da <i>Curcuma zerumbet</i> .	72
Tabela 5: Média e desvio \pm padrão do teor de constituintes no extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma de <i>Curcuma zerumbet</i> .	74
Tabela 6: Composição centesimal resultante do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	75
Tabela 7: Concentração de microminerais e macrominerais do rizoma seco da <i>Curcuma zerumbet</i> .	76
Tabela 8: Colorimetria do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> .	77
Tabela 9: Análise microbiológica dos extratos do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> utilizada nos ensaios farmacológicos.	83
Tabela 10: Citotoxicidade em larvas de <i>Artemia salina</i> nos extratos de <i>Curcuma zerumbet</i> .	84
Tabela 11: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via intraperitoneal do extrato aquoso do rizoma de <i>Curcuma zerumbet</i> .	85
Tabela 12: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via oral do extrato aquoso do rizoma de <i>Curcuma zerumbet</i> .	86
Tabela 13: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via intraperitoneal do extrato hidroalcoólico do rizoma de <i>Curcuma zerumbet</i> .	87
Tabela 14: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via oral do extrato hidroalcoólico do rizoma de <i>Curcuma zerumbet</i> .	87
Tabela 15: Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar após aplicação por via oral do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da <i>Curcuma zerumbet</i> durante 28 dias de tratamento.	89
Tabela 16: Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar após aplicação por via oral do extrato aquoso e hidroalcoólico durante 28 dias de	91

tratamento.

- Tabela 17:** Efeito do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* nas doses de 250-1000 mg/Kg administrado por via oral na resposta dor induzida pelo ácido acético 2%. **96**
- Tabela 18:** Efeito do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* nas doses de 250-1000 mg/Kg administrado por via oral na resposta dor induzida pelo ácido acético 2 %. **97**
- Tabela 19:** Efeito da administração oral do extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* no tempo de resposta dos animais no modelo da placa quente. **100**
- Tabela 20:** Efeito da administração oral do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* no tempo de resposta dos animais no modelo da placa quente. **101**
- Tabela 21:** Percentual de tumefação das patas dos animais obtida para a análise anti-inflamatória do extrato aquoso de *Curcuma zerumbet* administrada por via oral. **105**
- Tabela 22:** Percentual de tumefação das patas dos animais para a análise anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Curcuma zerumbet* administrada por via oral. **106**
- Tabela 23:** Composição físico-química dos iogurtes formulados com os extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **108**
- Tabela 24:** Análise microbiológica dos iogurtes. **109**

LISTA DE ABREVIações

AF	Alimentos funcionais
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa-espectroscopia de massa
COX-2	Ciclo-oxigenase -2
CzA	Extrato aquoso de <i>Curcuma zerumbet</i>
CzH	Extrato hidroalcoólico de <i>Curcuma zerumbet</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
HE	Hematoxilina e eosina
I.E.A. 0,12 %	logurte com 0,12 % de extrato aquoso
I.E.A. 0,25 %	logurte com 0,25 % de extrato aquoso
I.E.H. 0,12 %	logurte com 0, 12 % de extrato hidroalcoólico
I.E.H. 0,25 %	logurte com 0,25 % de extrato hidroalcoólico
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
I.N.	logurte natural
I.P.	Intraperitoneal
Mc	Mucosa
Mmc	Muscular da mucosa
Ms	Muscular própria
NF_κB	Fator de transcrição nuclear Kappa
NMDA	Receptor ionotrópico n-metil-d-aspartato
NNP	Número mais provável
R_F	Índice de retenção

SMc	Submucosa
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
V.o.	Via oral
PGE₂	Prostaglandina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
a*	coordenada a
a_w	atividade da água
b*	coordenada b
L*	luminosidade
%	por cento
Fe	ferro
Zn	zinco
Mn	manganês
P	fósforo
K	potássio
Ca	cálcio
Mg	magnésio

SUMÁRIO

	Pg
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Geral	25
2.2. Específicos	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. Alimentos Funcionais	27
3.2. Iogurte	31
3.3. Fitoconstituintes	34
3.4. Família Zingiberaceae	37
3.5. Gênero <i>Curcuma</i>	38
3.6. <i>Curcuma zerumbet</i> Zingiberaceae	39
4. METODOLOGIA	45
4.1. Material	45
4.2. Obtenção e Caracterização de Matéria-prima Vegetal	45
4.2.1. Coleta e Herborização da <i>Curcuma zerumbet</i> (Zingiberaceae)	45
4.2.2. Elaboração dos Extratos	46
4.2.3. Caracterização Fitoquímica dos Extratos	47
4.3. Análises Físico-químicas da Matéria-prima Vegetal	49
4.4. Determinação da Atividade de Água	50
4.5. Determinação da Cor	50
4.6. Análise Térmica dos Extratos	50
4.7. Análises Microbiológicas dos Extratos	51
4.8. Análises Biológicas e Farmacológicas dos Extratos	53

4.8.1.	Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	53
4.8.2.	Avaliação Comportamental e Sistemática – Atividade Exploratória	54
4.8.3.	Análise Toxicidade Subaguda dos Extratos	55
4.8.4.	Avaliação da Atividade Antiúlcera dos Extratos-Lesão Gástrica Induzida por Etanol	56
4.8.5.	Atividades Anti-inflamatória e/ou Analgésica	57
4.8.5.1.	Contorções Abdominais produzidas pelo Acido Acético 2%	57
4.8.5.2.	Teste da Placa Quente	58
4.8.5.3.	Analgesímetro	59
4.8.5.4.	Determinação da atividade antiedematogênica dos extratos da <i>Curcuma zerumbet</i> - Edema induzido por carragenina.	60
4.9.	Análise Estatística	61
4.10.	Desenvolvimento do iogurte	61
4.10.1.	Elaboração do logurte	61
4.11.	Processamento dos logurtes	62
4.12.	Análises Físico-químicas do Leite	63
4.13.	Análises Físico-químicas dos logurtes	64
4.14.	Análises Microbiológicas dos logurtes	64
4.15.	Contagem Total de Bactérias Lácticas	64
4.16.	Avaliação da Atividade Antiúlcera dos logurtes Formulados	64
4.17.	Análise Sensorial	65
4.18.	Análise Estatística	65
5.	RESULTADO E DISCUSSÕES	68
5.1.	Rendimento dos Extratos e de Óleo essencial	68
5.2.	Caracterização Fitoquímicas dos Extratos	68
5.3.	Análises Físico-químicas da Matéria-prima Vegetal	75
5.4.	Determinação da Atividade de Água	76
5.5.	Determinação da Cor	77

5.6.	Análise Térmica dos Extratos	78
5.7.	Análises Microbiológicas dos Extratos	83
5.8.	Análises Biológicas e Farmacológicas dos Extratos	84
5.8.1.	Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	84
5.8.2.	Avaliação Comportamental e Sistêmica – Atividade Exploratória	85
5.8.3.	Análise Toxicidade Subaguda dos Extratos	88
5.8.4.	Atividade Antiúlcera dos Extratos - Lesão Gástrica Induzida por Etanol	93
5.8.5.	Atividades Anti-inflamatória e/ou Analgésica	96
5.8.5.1.	Contorções Abdominais produzidas pelo Ácido Acético 2 %	96
5.8.5.2.	Teste da Placa Quente	99
5.8.5.3.	Analgesímetro	102
5.8.5.4.	Determinação da atividade antiedematogênica do extrato da <i>Curcuma zerumbet</i> – Edema induzido por carragenina	104
5.9.	Desenvolvimento do logurte	107
5.9.1.	Análises Físico-químicas dos logurtes	108
5.9.2.	Análise Microbiológica dos logurtes	109
5.9.3.	Contagem Total de Bactérias Lácteas	110
5.10.	Avaliação da Atividade Antiúlcera dos logurtes	112
5.11.	Avaliação Sensorial dos logurtes Obtidos	121
6.	CONCLUSÕES	125
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
	APÊNDICES	
	ANEXOS	

*INTRODUÇÃO/
JUSTIFICATIVA*

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

O uso dos alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado (BICUDO et al., 2012). Assim, as partes de vegetais com valor nutricional e que apresentem benefícios para a saúde humana tem sido usados em vários produtos alimentícios.

O consumo de vegetais tem sido associado a uma dieta saudável devido seu potencial nutritivo. Estes alimentos contêm diferentes metabólitos, muitos dos quais desempenham funções biológicas (COSTA; ROSA, 2010).

O uso de vegetais para a cura de doenças e outros males são encontrados desde 50.000 anos atrás e atualmente novos avanços no desenvolvimento de drogas, nutrientes e extratos extraídos de plantas vasculares como suplemento alimentício esta em crescimento (MARQUES, 2011).

Extratos de plantas em associação com a suplementação alimentar pode exercer efeitos benéficos nos desequilíbrios gastrintestinais, nos processo inflamatórios e estresse oxidativo (BRASIL, 2006). Constituindo assim, alimentos terapêuticos de fácil acesso a população.

Atualmente, o mercado consumidor busca cada vez mais produtos funcionais, com boa qualidade e alto valor nutricional. A pesquisa de 2004 da Instituição Americana Health Focus, indicou que 44 % dos consumidores escolhem o alimento com base na relação que o mesmo tem com a saúde.

Visando acompanhar o crescimento desse seguimento de mercado, a produção de iogurte vem atender aos novos hábitos de consumo da população mundial, tornando-se uma alternativa saudável, com um alto valor nutricional, funcional e sensorial. Uma vez, que é o mais acessível e consumido pela população (GUGGISBERG; EBERHARD; ALBRECHT, 2007).

Esta imagem positiva pode aumentar ainda mais com adição de ingredientes funcionais como os extratos da planta *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae, planta com propriedades medicinais, utilizada desde a Idade Média como condimento, corante, aromatizante e fins terapêuticos (LI et al., 2011).

A análise fitoquímica desta espécie indicou que a composição química desta espécie presente no Brasil é similar àquela existente em outros países (NAVARRO et al., 2002).

Os principais princípios ativos desta planta são terpenoides, especialmente sesquiterpenoides como furanodieno e furanodienona, curcumenona, curcumanolida, curcumenol, zederona, curzerenona, curzeona e germacrona (AZAM; NOMAN; AMIN, 2014). Possui como composto majoritário o curzerenona, este apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (SOSHI; MATHELA, 2012).

As raízes de *C. zerumbet* são utilizadas tradicionalmente como carminativo e estimulante digestivo. Ela atua principalmente no trato digestivo, promovendo seu bom funcionamento, pois inibe a secreção do ácido gástrico e aumenta a secreção biliar, evitando azia e má digestão, prisão de ventre, cólicas e gases intestinais e estomacais. Indicada na redução do risco e tratamento de úlceras gástricas e duodenais, bem como nas doenças do fígado. Em ensaios com animais, a planta apresentou efeito colerético, espasmolítico e antiácido leve (RAJASEKARAN, 2011; KIMURA; SUMIYOSHI; TAMAKI, 2013).

Devido à tendência de hábitos mais saudáveis, as indústrias precisam inovar ou desenvolver produtos com características especiais, que promovam saúde e antecipem essa necessidade para surpreender o consumidor. Assim, o objetivo deste trabalho é elaborar iogurte terapêutico com extratos da planta *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae, além de oferecer a população uma nova forma de prevenir doenças e promover saúde a partir de alimentos e contribuir para o desenvolvimento sustentável da Amazônia através da agricultura desta espécie.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver um iogurte terapêutico à base de extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae).

2.2. Específicos

- Caracterizar os constituintes químicos, propriedades físico-químicas dos extratos do rizoma da *C. zerumbet*;
- Avaliar a toxicidade dos extratos do rizoma da *C.zerumbet*;
- Caracterizar atividade anti-úlceras, anti-inflamatória e/ou analgésica dos extratos do rizoma da *C. zerumbet*;
- Desenvolver uma formulação para um iogurte terapêutico;
- Caracterizar o comportamento físico-químico do iogurte (padrão e formulado);
- Estudar o comportamento químico e contagem de bactérias lácteas durante o período de estocagem (dia(d): 0d, 7d, 21d, e 28d);
- Efetuar análises microbiológica e sensorial (aceitabilidade) do iogurte (formulado).

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Alimentos Funcionais

Nas últimas décadas, novas tecnologias, como a biotecnologia habilitaram os cientistas de alimentos a planejar novos produtos saudáveis. Hoje se observa que os alimentos não possuem como função apenas saciar a fome, como também devendo nutrir, fornecer vitaminas, minerais, aminoácidos e propriedades terapêuticas.

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios está se tornando cada vez mais desafiador, à medida que se procura atender à demanda dos consumidores por produtos que sejam além de saudáveis e atrativos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008), tornando-se dessa forma conhecidos como alimentos funcionais ou nutracêuticos.

Em 1920 os cientistas começaram a pesquisar e foram capazes de isolar componentes dos alimentos, realizar experiências clínicas e laboratoriais para comprovar eficácia dos nutracêuticos (WRIGHT, 2006). No entanto, neste período a grande preocupação em relação aos alimentos era que estes deveriam ser abundantes para a população.

No ano de 1960 os meios de comunicação começaram a alertar a população a respeito da relação existente entre algumas enfermidades e a ingestão de gorduras. Nesse período, que se estendeu até à década de 1980 a ênfase das pesquisas era descobrir como alimentos podiam provocar certas doenças (FRANCO, 2006).

O termo Alimentos Funcionais ou Nutracêuticos (*Foods for Specified Health Use-FOSHU*), foi inicialmente proposto no Japão em meados de 1980, em função de uma população crescente de idosos e da preocupação na prevenção das doenças crônicas e degenerativas, fruto de estudos colaborativos entre o governo, as universidades e fabricantes de alimentos (DIAS; REIS, 2002).

Em 1984, o Ministério da Educação japonês criou um departamento chamado “Análise Sistemática e Desenvolvimento das Funções dos Alimentos”, que financiou as pesquisas desta área (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

A partir de 1990, o conceito de alimentos funcionais começou a ser difundido nos Estados Unidos, quando o Instituto Nacional do Câncer deu início a um projeto denominado Programa de Alimentos Projetados (*Designer Food Program*) com investimento de 20 milhões de dólares destinados às realizações de pesquisas sobre componentes de alimentos naturais, principalmente os que apresentassem atividades anticancerígenas (BRÔRING; CLOUTIER; LEKER, 2006).

Vários fatores têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos funcionais, sendo um deles o aumento da consciência dos consumidores, desejando melhorar a qualidade de vida, e a opção optam hábitos saudáveis.

Os alimentos funcionais apresentam propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (DEVICICH; PEDERSEN; PETRIE, 2007).

Pode-se dizer que são todos os alimentos ou bebidas, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005).

A regulamentação no Brasil iniciou na década de 90 pelo Ministério da Saúde, onde já existia pedido de análises para fins de registros de produtos que poderiam reduzir o risco de doenças e outros que alegavam a cura, tratamento e prevenção de doenças (BRASIL, 2002).

Pela existência desses novos alimentos no mercado em 1999 foram propostas normas e regulamentação por meio da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), que publicou quatro Resoluções - 16, 17, 18 e 19 e por meio da portaria Normativa instituiu a Comissão de Assessoramento Tecno-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) com a função de subsidiar a Diretoria de Alimentos e Toxicologia nas decisões relacionadas a esse tema (ANVISA, 1999).

As resoluções estão assim definidas como: a Resolução N.16 regulamenta procedimentos para registro de alimentos e/ou novos ingredientes; a RN.17 as diretrizes básicas para avaliação de riscos e segurança dos alimentos; a RN.18 diretrizes básicas para análises e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos e a RN.19 procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde em sua rotulagem (ANVISA, 1999).

Com o avanço das tecnologias e as novas técnicas de pesquisas em alimentos, no ano de 2001 foi publicada a Resolução N.2, que diz respeito aos probióticos e substâncias bioativas isoladas com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde (BRASIL, 2002), sendo obrigatório em sua rotulagem alegações de propriedades funcionais de nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica.

O registro de um alimento funcional só pode ser realizado depois de comprovada a alegação de propriedades funcionais ou de saúde com base no consumo previsto ou recomendado pelo fabricante, na finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso ou na(s) evidência(s) científica(s): composição química ou caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e

ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecidas sob propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (ANVISA, 1999; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005).

As frutas e plantas não convencionais tem grande potencial como fontes de compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Acredita-se que esses compostos sejam responsáveis pela relação entre a ingestão de alimentos vegetais e redução da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, evidenciada por estudos epidemiológicos. Entre esses compostos bioativos destacam-se os flavonoides, antocianinas, carotenoides e outros que parecem implicar nesses efeitos benéficos à saúde.

Estes compostos possuem capacidade antioxidante, ação anti-inflamatória, analgésica, controle de pressão arterial, cascatas de sinalização celular, com reflexos na expressão de genes de enzimas antioxidantes e mesmo em fatores de transcrição celular com importância no câncer (LAJOLO, 2012).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando nas seguintes áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2007).

A incorporação da dieta a um estilo de vida saudável, uma vez que esta pode estar associada à prevenção de doenças e promoção da saúde, levou à criação de um mercado para esses produtos funcionais (ARVANITOYANNIS; KOUKALIAROGLOU, 2005).

A estimativa de mercado é bastante variável, dependendo das definições utilizadas. Nos Estados Unidos da América as estimativas variam entre 8 e 80 bilhões de dólares, com um valor potencial para a venda total de alimentos no varejo de 250 bilhões de dólares. No Japão, atividades sobre pesquisa e desenvolvimento de alimentos funcionais estão em andamento em mais de 300 companhias, com um valor estimado de mercado de 3,5 bilhões de dólares, enquanto que na Europa, o mercado foi estimado em 1,7 bilhão de dólares americanos (PACHECO; SGARBIERI, 2008).

No Brasil, o mercado está em franca expansão. Segundo dados da Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA), as vendas de alimentos funcionais chegam a US\$ 500 milhões por ano, representando aproximadamente 1 % do total do comércio brasileiro de alimentos processados industrializados. Segundo Teixeira (2013), o Brasil apresenta a quinta maior taxa de crescimento mundial neste segmento, cujo crescimento até 2017 deve alcançar 19 %.

O mercado global de alimentos funcionais em 2001 gerava em torno de 70 bilhões de dólares, com previsão de 500 bilhões para 2020, e por esta razão os governos estão preocupados com a regulamentação, que varia conforme o local.

Na área de laticínios, uma nova tendência que vem se apresentando é a produção de iogurtes e leites fermentados funcionais. Isto porque, além destes produtos possuírem grande aceitação pelo público em geral e apresentarem excelente valor nutritivo, são veículos em potencial para o consumo de probióticos (ANTUNES et al., 2007).

Os alimentos fermentados podem ser uma opção positiva de nutrição. Sua utilização seja em forma líquida ou sólida, contribuem para uma alimentação mais natural, saudável e funcional, visto que a fermentação melhora o perfil nutricional dos alimentos através da hidrólise enzimática de proteínas para peptídeos e aminoácidos, assim como de carboidratos para dissacarídeos e monossacarídeos, favorecendo a sua digestibilidade e absorção (POSSETI et al., 2011).

No Brasil, observa-se que as prateleiras dos supermercados de iogurtes estão aumentando e se diversificando, ampliando o leque de opções de produtos que se ajustam a demanda do consumidor moderno por alimentos com impacto positivo para a saúde (KHURANA; KANAWJIA, 2007). De acordo com estimativas, o mercado brasileiro de produtos funcionais cresce cerca de 20 % ao ano, sendo que os iogurtes em geral representam 80 % do mercado de refrigerados (GALLINA et al., 2011).

Em relação à venda de iogurtes, 84 % das vendas são de produtos regulares (integrais), 8 % são de produtos *light/diet* e 8 % são de funcionais. No entanto, os iogurtes funcionais já ultrapassaram os *light* em faturamento (volume). O mercado global de iogurtes deverá superar 67 bilhões de dólares até 2015, impulsionado pelo crescente desejo dos consumidores por produtos convenientes e promotores de saúde, especialmente os alimentos funcionais (GALLINA, 2010).

Os produtos lácteos fermentados são descritos desde a antiguidade como uma forma de preservar os nutrientes do leite da deterioração causada por microrganismos, entretanto, nas últimas décadas, houve um incremento no setor de laticínios por conta do desenvolvimento da tecnologia e a maior aceitabilidade do consumidor que busca adquirir produtos com características funcionais de alto valor nutritivo (OLIVEIRA, 2006). Assim, a adição de outros ingredientes a iogurte como os extratos de plantas, ricos em constituintes fitoquímicos, além de agregar valor, entra como um dos fatores primordiais para a obtenção de um produto com propriedades terapêuticas.

3.2. Iogurte

Iogurte, segundo a ANVISA, é um produto obtido a partir do leite submetido à fermentação láctea, através da ação de microorganismos, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, ou a partir de iogurte com ou sem adição de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2000).

A adição de sucos, polpas e extratos vegetais é uma tendência do mercado de iogurtes e tem como objetivo o atendimento ao mercado consumidor, que busca inovação e diversidade nos produtos (CRUZ et.al., 2011).

O iogurte é considerado um alimento saudável, apresenta um papel importante nos hábitos alimentares de diversos países, independente do nível de desenvolvimento (ZHU et al., 2009). Trata-se de um alimento que apresenta aceitação por parte dos consumidores independente do sabor, por trazer benefícios à saúde.

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes são *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* – cocos unidos, geralmente em cadeias curtas e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* – bastonetes unidos em cadeias longas - utilizam a lactose como substrato energético com liberação de ácido láctico. Ambos os microrganismos são termofílicos e homofermentativos. O crescimento associado destas duas culturas resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior produção de ácido láctico e um maior desenvolvimento de sabor e aroma no iogurte (MUNDIM, 2008).

Durante o processo de fermentação ocorre a produção de ácido láctico como produto principal e a produção de pequenas quantidades de outros subprodutos que influenciam profundamente nas características organolépticas do iogurte. O acetaldeído é produzido em maiores quantidades seguido por acetona, 2-butanona, diacetil e acetoína. O ácido láctico resultante da fermentação contribui para a desestabilização da micela de caseína, provocando sua coagulação no ponto isoelétrico (pH 4,6 - 4,7) e conduzindo à formação de um gel, o iogurte. Além disso, a fermentação láctica beneficia o valor nutricional do produto final (MUNDIM, 2008).

A atividade proteolítica dos bacilos promove a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, especialmente valina, que favorecem o crescimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula o crescimento dos

bacilos devido à produção de ácido fórmico, gás carbônico e a redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (SHAH, 2000).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bile e conseqüentemente não sobrevivem a passagem através do trato gastrointestinal. Portanto, não são consideradas como probióticas. Porém, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e melhoramento da digestão da lactose devido a presença de enzima β -galactosidase nas células das bactérias tradicionais de iogurte (HATTINGH; VILJOEN, 2001).

As etapas de produção de iogurte já são conhecidas pelas indústrias de produtos lácteos, bem como a obrigatoriedade da utilização de culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (TAMINE; ROBINSON, 2007).

Todavia, no caso de iogurtes com extratos vegetais algumas etapas devem ser analisadas durante e depois do produto pronto, para garantir a funcionalidade do produto e fornecer os benefícios à saúde do consumidor durante a vida de prateleira (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

Adição de extratos é uma tendência no mercado lácteo, pois apresenta um produto com qualidade terapêutica com diversidade e novidade no mercado. Tornando-se fundamental que estes não possuam substâncias que inibam o metabolismo das bactérias. Desta forma, testes preliminares com diferentes concentrações de extratos devem ser realizadas para sua verificação da compatibilidade com as linhagens de bactérias lácteas.

As indústrias alimentícias, especialmente a láctea, estão investindo e desenvolvendo novos produtos com atividades funcionais no intuito de oferecer a população uma alimentação mais saudável e confiante aos consumidores. Pode-se encontrar no mercado iogurtes com atividades gastrointestinais no caso do Activia; iogurte Bio Equilíbrio, rico em fibras vegetais; iogurte grego, rico em proteína, o que eleva a sensação de saciedade, e pouca gordura, entre outros.

Recentemente várias pesquisas de alimentos funcionais estão incrementando ao iogurte extratos vegetais, desenvolvendo um produto com qualidade e alto valor nutricional.

Miguel e colaboradores (2010) desenvolveram um iogurte de soja sabor morango com extrato de soja desengordurado enriquecido com cálcio, apresentando valores maiores de nutrientes e minerais que iogurtes convencionais. Ril e colaboradores (2011) produziram e estudaram iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil).

Em 2013, Martins e colaboradores elaboraram o iogurte com extrato hidrossolúvel de soja suplementado com inulina, possuindo ótimo potencial como produto simbiótico, combinando todas as propriedades funcionais benéficas à saúde da soja e da inulina.

No entanto, ainda há necessidade de avaliar sua elaboração com novos sabores ou substâncias que melhorem as suas características nutricionais ou incrementem propriedades funcionais como a utilização de vários extratos vegetais.

3.3. Fitoconstituintes

Fitoconstituintes são substâncias encontradas em vegetais, notadamente em verduras e frutas que podem ser ingeridas diariamente em determinadas quantidades, que mostrem um potencial para modificar o metabolismo humano de maneira favorável à prevenção do câncer, entre outras doenças degenerativas (ADA, 1993).

Sob a forma de alimentos, as pessoas ingerem uma diversidade de compostos farmacologicamente ativos, sendo que as plantas ditas como alimentos funcionais constituem uma prioridade de pesquisa em todo o mundo, por apresentarem diversos compostos que trazem benefícios à saúde.

Muitos nutricionistas recomendam o aumento do consumo de fontes de alimentos contendo plantas com potencial terapêutico, tais como açafrão (*Curcuma longa*) sugerindo a fortificação de alimentos com compostos específicos ou a criação de novos “*designer foods*” com alta concentração dos fitoconstituintes (**Tabela 1**) (BIANCO, 2010).

Tabela 1: Fitoconstituintes e suas propriedades funcionais.

Nome popular	Nome científico	Componentes ativos	Propriedades funcionais	Atuação no organismo
Ginkgo biloba	<i>Ginkgo biloba</i>	Flavonoides, ginkgolides e lactonas	Memória, percepção	Cérebro, sistema circulatório
Erva de São João	<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericina, pseudo-hipericina, flavonoides, naftodiantronas	Antidepressivo	Cérebro
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Gingerol e gingerdios, óleos voláteis	Antiemético, náuseas	Trato gastro-intestinal
Alcaçuz	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Ácidos glicirréticos, saponinas, flavonoides e isoflavonóides	Expectorante	Sistema respiratório
Feverfew	<i>Tanacetum parthenium</i>	Lactonas sesquiterpênicas	Profilaxia da enxaqueca	Cérebro

Fonte: BARTIMEUS, 2010

Dentre estes alimentos fortificados está o *ginkgo*, no qual os extratos das folhas de *Ginkgo biloba*, são comercializados na forma de suplemento alimentar. Por possuir compostos antioxidantes, o papel do *ginkgo* como alimento funcional é benéfico e está sendo utilizado em bebidas, barras e chás (MOHANTA ; TAMBOLI ; ZUBAIDHA, 2013).

Outro conhecido é o gengibre, *Zinziber officinale*, tem sido o promotor do bem-estar intestinal, uma espécie presente na culinária como condimento por apresentar um sabor picante e com atividade funcional para o trato gastro-intestinal e propriedades anticancerígenas (BARRETO; TOSCANO; FONTES, 2011).

Os extratos vegetais agem de várias formas: estimulando o sistema imunológico, regulando hormônios ou agindo como antivirais e bactericidas, pois contem centenas de componentes bioativos (BARTIMEUS, 2010).

Pesquisas científicas apontam que os componentes bioativos desaceleram o processo de envelhecimento e reduzem o risco de doenças coronárias, câncer, hipertensão, osteoporose, artrite, alguns possuem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgica, gastroprotetora, entre outras (BARTIMEUS, 2010).

Frutas e verduras são fontes ricas em micronutrientes e fibras, além de conter uma imensa variedade de metabólitos secundários ativos que oferecem cor, sabor e algumas propriedades antinutricionais e tóxicas. Entre as mais importantes classes dessas substâncias estão os carotenoides (terpenoides), flavonóis e compostos fenólicos mais complexos, as saponinas, os fitosteróis, os glicoalcalóides e os glucosinolatos (RAUD, 2008).

Os compostos bioativos podem ser classificados (**Figura 1**) como carotenoides, fenólicos, alcaloides, compostos contendo nitrogênio e compostos organossulfurados (CARDOSO; BARRÉRE; TROVÃO, 2009).

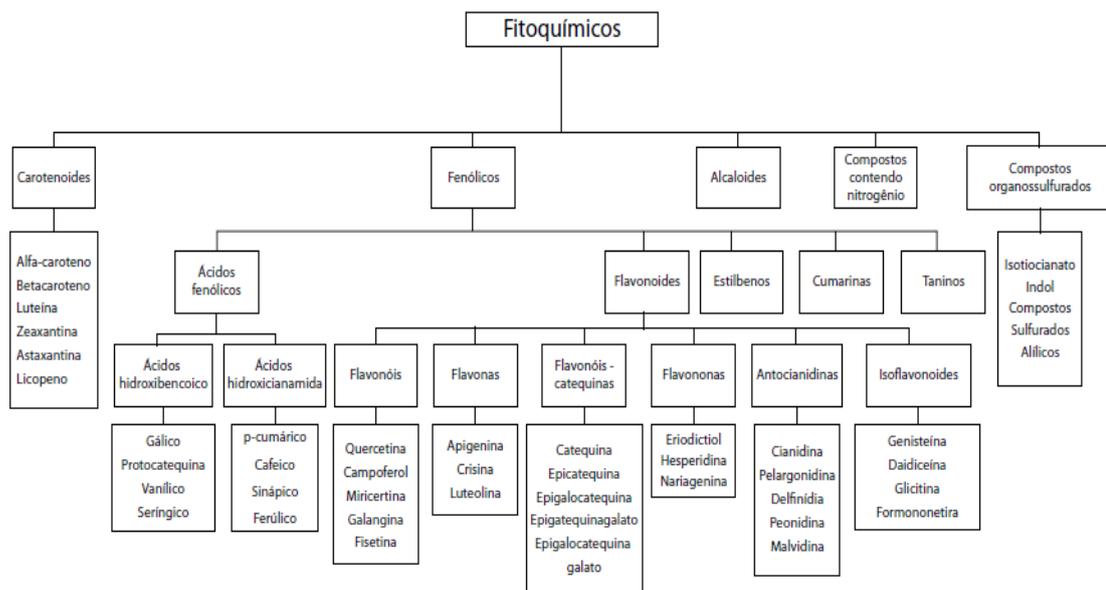


Figura 1: Classificação dos compostos bioativos.

Fonte: LIU, 2004

Os carotenoides compreendem um grande número de compostos, muitos dos quais possuem atividade biológica. Alguns, como alfacaroteno e o betacaroteno, tem atividade pró-vitamina A. Outros, como o licopeno são antioxidantes. Pesquisas

recentes sugeriram a possível participação dos carotenoides na prevenção ou no controle do câncer de próstata (COSTA; ROSA, 2010).

Compostos fenólicos apresentam ação antioxidante e tem sido associados à redução de doenças crônicas. Entre eles, os flavonoides têm se mostrado um dos antioxidantes mais abundantes e eficazes da nossa alimentação (RABELO, 2010).

Alcaloides são substâncias orgânicas cíclica contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Possui ação biológica marcante, como a morfina, a cafeína, a nicotina (OLIVEIRA et al., 2009).

Esses metabólitos, além de muito diversificados, possuem interessantes propriedades biológicas. Muito importantes para os setores alimentícios, agrônômicos, de perfumaria e principalmente farmacêutico, o qual visa principalmente o grande número de substâncias farmacologicamente ativas (BRANCALION, 2010).

A tradição do uso e sucesso de combinações herbais na medicina popular, sobretudo as orientais, levam as pesquisas à dúvida de como mostrar que o efeito farmacológico do conjunto é superior aos constituintes isolados (TIBI, 2008).

Por sinergia compreende-se interação entre moléculas ativas desde sua estabilidade bioquímica em organismos vegetais e animais, quanto ao aumento da biodisponibilidade de determinado princípio (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

De um modo geral, nas indústrias alimentícias utilizam-se os extratos nos quais todas as moléculas são extraídas na sua totalidade, sem que nenhuma seja especificamente isolada. O extrato alimentício não é, e, não pode ser, um princípio ativo isolado, ou seja, um composto com efeito terapêutico e que corresponde a uma molécula ou um grupo de moléculas com atividade farmacológica testada (FOOD, 2010).

Além disso, os extratos de plantas em associação com a suplementação alimentar podem exercer efeitos benéficos nos desequilíbrios gastrintestinais, nos processos inflamatórios e estresse oxidativo (BRASIL, 2006). Constituindo-se assim em alimentos terapêuticos que poderão ser de fácil acesso à população.

Dentre os alimentos funcionais o iogurte é um dos mais acessíveis e consumidos pela população. Este tem alcançado considerável importância econômica no mundo

devido a sua elevada imagem nutricional (GUGGISBERG; EBERHARD; ALBRECHT, 2007).

3.4. Família Zingiberaceae

A família Zingiberaceae é a maior família da ordem Scitamineae pertencente à classe das *Monocotyledoneae*. É amplamente distribuído ao longo dos trópicos e subtropicais do mundo, particularmente no Sudeste Asiático, abrangendo 53 gêneros com 1500 espécies (SCHIMIDT, 2000).

As Zingiberaceae são plantas caracterizadas por suas raízes tuberosas ou não tuberosas, considerando que as raízes tuberosas são aquelas que acumulam materiais nutritivos de reserva, as quais apresentam marcantes características aromáticas e propriedades medicinais (WU et al., 2010).

A família Zingiberaceae destaca-se como um importante recurso natural que oferece muitos produtos úteis para alimentos, especiarias, medicamentos, corantes, perfumes e cosméticos (JANTAN et al., 2003). Seus óleos essenciais contêm terpenos, alcoóis, cetonas, flavonoides, carotenoides e fitoestrógenos os quais apresentam propriedades medicinais para o tratamento de doenças como diarreia, coriza, dermatose e reumatismo, onde são amplamente mencionados na medicina tradicional (MIGUEL et al., 2002).

Algumas espécies da família Zingiberaceae apresentam propriedades quanto ao uso da espécie para o tratamento de doenças, a maioria contra doenças gastrointestinais (RAJASEKARAN, 2011), antioxidante (SILVA; GOMES; RODILLA, 2011) e atividade anticancerígena (LIU; NAIR, 2012), atribuída a promissora de gênero *Curcuma*.

3.5. Gênero *Curcuma*

O gênero *Curcuma* pertence à família Zingiberaceae e possui mais de 70 espécies. Este gênero é endêmico das regiões Indo-Malaias, onde as espécies são cultivadas e utilizadas terapêuticamente pela população na Índia, China e Indonésia (MURNIGSIH et al., 2005).

As plantas, deste gênero, são grandes herbáceas aromáticas, possuindo folhas grandes oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas, o limbo se reúne na base

formando um pseudocaule. Possuem flores dispostas em espiga contendo brácteas côncavas e tubérculos taxonomicamente denominados rizomas. O rizoma principal ou central é arredondado com ramificações laterais também tuberizadas (ALVES et al., 2010).

As partes vegetais empregadas com fins terapêuticos são os rizomas, ricos em terpenoides, curcumina e flavonoides.

Um dos principais componentes extraídos é a curcumina, que também é responsável por suas ações bioativas. Os trabalhos mostram que os efeitos positivos são observados em diversas formas de uso, como extratos, solução e administração oral e intraperitoneal (COSTA; ROSA, 2010).

Este gênero é utilizado na culinária asiática e chinesa na forma de complemento ou condimento, com sucesso em produtos de padaria, bolos, tortas, empadões, picles, mostardas, molhos cobertura de doces. Na Ásia a folha da *Curcuma longa* é utilizada em vários pratos tradicionais; assim com as folhas da *Curcuma manga* que são usadas para dar sabor ao peixe assado (GOMES; RODILLA, 2011).

No Brasil, a maioria dos gêneros é utilizada na forma de ornamentação, alimentos e farmacêutico no tratamento de câncer do colo do útero (EPSTEIN; SANDERSON; MACDONALD, 2010), hepatite e Inflamação (SCHAFFER et al., 2011). Sendo que a *Curcuma longa* é a mais conhecida e pesquisada pelos cientistas brasileiros. Utilizada na forma de condimento e corante na indústria de alimentos, é um dos principais componentes da tradicional “curry” (LANTZ et al., 2005).

Suas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas aos compostos curcuminoídes polifenólicos (HADDAD; SAUVAIN; DEHARO, 2011). Além da curcumina, mais de 300 componentes diferentes, incluindo compostos fenólicos e terpenoides, foram identificados no gênero *Curcuma* (LI et al., 2011; GUPTA et al., 2012). Segundo pesquisa de Yang e colaboradores (2011) este gênero apresenta alguns componentes bioativos em comum, como: curzereno, curcumenol, farnesol, β -elemeno, curcumenone e curcumina.

Embora a curcumina seja um dos principais componentes, pesquisa durante a década passada, revelou que algumas atividades são independentes deste composto, dando ênfase aos flavonoides e terpenoides.

Este possui uma grande variedade de espécies como *Curcuma zedoaria*, *Curcuma amada*, *Curcuma aromática*, *Curcuma caesia*, *Curcuma comosa*, *Curcuma malabarica*, *Curcuma phaeocaulis*, *Curcuma Longa* e a *Curcuma zerumbet* entre outras.

3.6. *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae

A *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae) (**Figura 2**) é uma espécie herbácea, perene, pertencente à família Zingiberaceae, de ocorrência espontânea no sudeste da Ásia e nordeste da Índia (EPSTEIN; SANDERSON; MACDONALD, 2010).

A planta apresenta folhas grandes, pecíolo comprido como o limbo, oblíquo-lanceoladas reunidas na base; flores pequenas, dispostas em espigas compridas e com brácteas côncavas. Possui um tubérculo ou rizoma principal, arredondado ou ovoide, com ramificações secundárias laterais, compridas tuberizadas ou não. Estes crescem agrupados no solo, organizado numa estrutura normalmente denominada “mão”, onde os rizomas menores agrupam-se ao redor de um maior. Partindo desta estrutura surgem raízes, denominadas raízes adventícias (PAMPLONA, 2006).

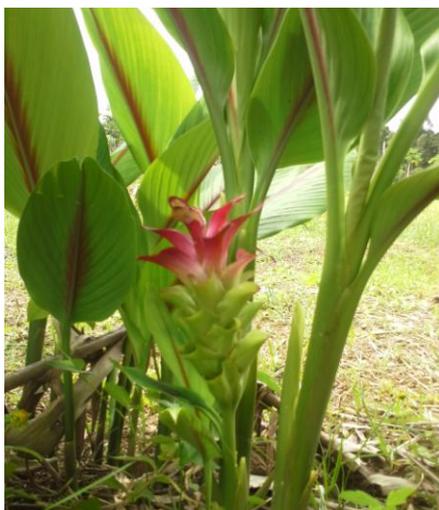


Figura 2: *Curcuma zerumbet* Zingiberaceae

Fonte: Márcia Castro, 2013.

As partes vegetais empregadas com finalidades terapêuticas são as raízes e os rizomas, os quais podem ser empregados na forma de infuso, decocto, tintura, pó ou pedaços mastigáveis. Na culinária indiana é usada fresca ou como picles. Nos

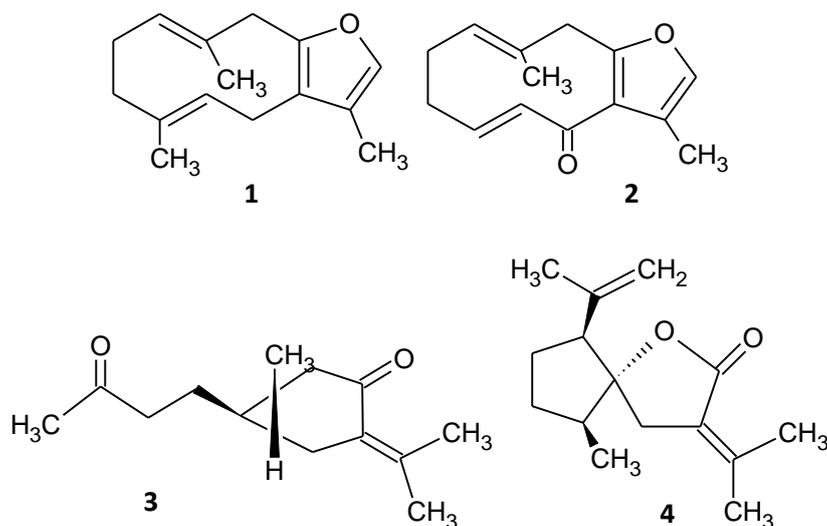
outros países é utilizada desde a Idade Média como condimento, corante e aromatizante (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008; LI et al., 2011).

Os rizomas secos são selecionados para a produção de bebidas ou para a produção de extratos que são utilizados medicinalmente (MAO et al., 2002).

As empresas farmacêuticas têm transformando os rizomas em produtos para tratar a gastrite e problemas digestivos (RAJASEKARAN, 2011). Entre as indicações terapêuticas da *Curcuma zerumbet*, destacam-se as propriedades tônico-estimulante, expectorante, diurética, calmante, carminativa, colerética, colagoga, depurativa, antiséptica, antifúngica, anti-helmíntica, antimicrobiana, antitumoral, eupéptica, aromática, anti-inflamatória, hepatoprotetora e analgésico (MAKABE et al., 2006; SUKARI et al., 2011; XIANG et al., 2012; GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013).

A análise fitoquímica desta espécie indicou que a composição química desta espécie presente no Brasil é similar àquela existente em outros países (NAVARRO et al., 2002).

Os principais princípios ativos desta planta são terpenoides, especialmente sesquiterpenoides como furanodieno e furanodienona, curcumenona, curcumanolida, curcumenol, zederona, curzerenona, curzeona e germacrona (**Figura 3**) (AZAM; NOMAN; AMIN, 2014). Possui como composto majoritário o curzerenona, este apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (SOSHI; MATHELA, 2012).



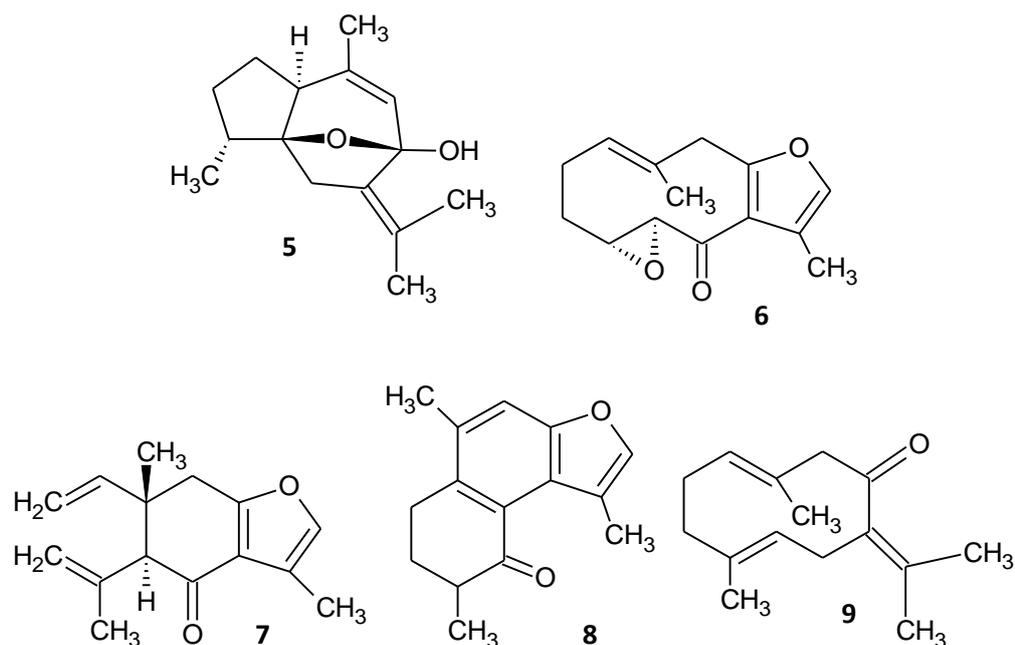


Figura 3: Estruturas químicas de alguns componentes ativos dos óleos essenciais da *Curcuma zerumbet*: furanodieno (1), furanodienona (2), curcumenona (3), curcumanolida (4), curcumenol (5), zederona (6), curzerenona (7), curzeona (8) e germacrona (9).

A *Curcuma zerumbet* também apresenta dentre seus componentes químicos o amido (50 %), resinas (3,5 %), albuminoides, vitaminas (B1, B2 e B6), minerais (Ca, Mg, Fe, P, Na e K) e pigmentos curcuminoides, da mesma forma como ocorre na *Curcuma longa* ou açafrão (SOSHI; MATHELA, 2012).

As raízes de *C. zerumbet* são utilizadas tradicionalmente como carminativo e estimulante digestivo. Ela atua principalmente no trato digestivo, promovendo seu bom funcionamento, pois inibe a secreção do ácido gástrico e aumenta a secreção biliar, evitando azia e má digestão, prisão de ventre, cólicas e gases intestinais e estomacais. Indicada na redução do risco e tratamento de úlceras gástricas e duodenais, bem como nas doenças do fígado. Em ensaios com animais, a planta apresentou efeito colerético, espasmolítico e antiácido leve (RAJASEKARAN, 2011; KIMURA; SUMIYOSHI; TAMAKI, 2013).

Nos estudos de Makabe e colaboradores (2006) isolaram sesquiterpenos do extrato metanólico e testou em ratos, para o modelo de inflamação induzida. Os compostos identificados com maiores atividade anti-inflamatórias neste estudo foram furonodieno e furanodienona, que diminuíram em 75% a inflamação. A atividade destes compostos é comparada ao da indometacina, medicamento utilizado como

anti-inflamatório. Jang e colaboradores (2001) citam que esta atividade pode ser explicada pela inibição da produção de TNF- α , um dos mediadores inflamatórios produzido pelo organismo, responsável pela atividade dos macrófagos, realizada pelos curcuminoides e sesquiterpenos.

Os extratos metanólicos e aquoso do rizoma da *C. zerumbet* mostraram atividade antimutagênica em cepas de *Salmonella typhimurium* e apresentaram atividade antioxidantes. Segundo Peng e colaboradores (2010) indicam que os curcuminoides foram os responsáveis por estas atividades.

Extratos etanólicos, quando fracionados demonstraram a presença de alguns curcumenóides, os quais foram identificados como curcumina, demetoxicurcumina, e outros compostos. Estes demonstraram ser citotóxicos contra células cancerígenas de ovário humano. A administração oral deste extrato demonstrou também, efeito hepatoprotetor por inibirem os níveis de alanina aminotransaminase e aspartato aminotransaminase (MORIKAWA et al., 2002).

Extrato aquoso induziu a vasodilatação do endotélio dependente causando uma redução da pressão sanguínea, resultante da vasodilatação e diminuição da viscosidade sanguínea (GOTO et al., 2005).

Estudos de Kimura e colaboradores (2013) afirmam que o extrato hexânico de *Curcuma zerumbet* possui efeito de retarda a embriaguez, devido ao constituinte químico curcumenona que diminui a concentração de álcool no sangue através do aumento da atividade da enzima desidrogenase.

Estas atividades poderão ser encontradas em alimentos fermentados como os iogurtes se forem incorporados os extratos nas concentrações ideais.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Material

A produção do iogurte funcional utilizou como matérias-primas o leite integral UHT, açúcar e fermento lácteo liofilizado de culturas comerciais mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, Yo-Mix Yogurt Cultures da Danisco. E como suplemento básico utilizou os extratos dos rizomas da planta *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae).

4.2. Obtenção e Caracterização de Matéria-prima Vegetal

4.2.1. Coleta e Herborização da *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae)

As amostras da espécie *Curcuma zerumbet* foram coletadas do Município de Careiro da Várzea - Estado do Amazonas (Figura 4 A). Sua exsicata foi enviada à unidade de Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para a identificação e depositada no Herbário do Inpa sob o n^o 265800 (Figura 4 B). Posteriormente, enviado através de fotos à Taxonomista, Dra. Jana Leon-Škorničková, especialista em monocotiledôneas (*Curcuma*).

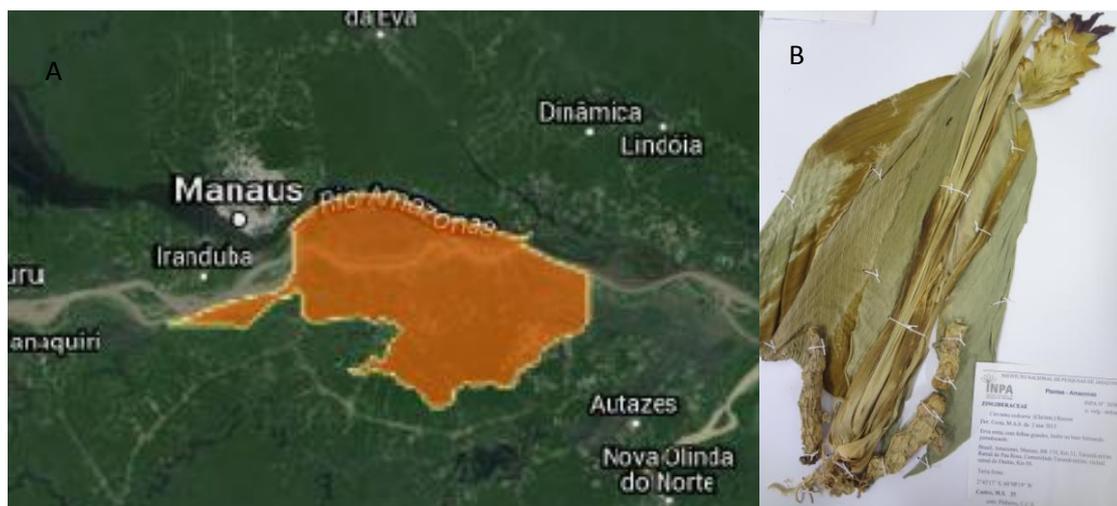


Figura 4: (A) Mapa do município Careiro da Várzea- AM; (B) Exsicata da *Curcuma zerumbet* depositada no Herbário do Inpa.

Fonte: (A) <http://cidades.ibge.gov.br/>; (B) Márcia Castro, 2015.

Os rizomas (**Figura 5**) foram higienizados, lavados em água corrente e secos em estufa com circulação de ar a temperatura de 45 °C por 24 h. Após este procedimento, foram triturados em liquidificador semi-industrial e armazenados em sacos plásticos na geladeira, aguardando a preparação dos extratos para as análises fitoquímicas, físico-químicas e farmacológicas.

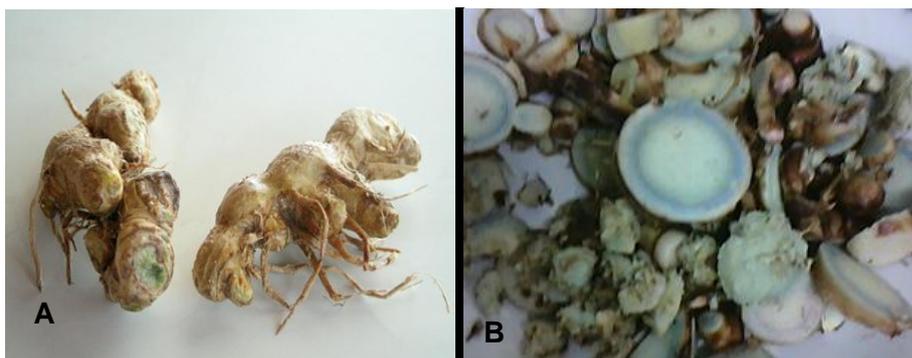


Figura 5: (A) Rizomas da *Curcuma zerumbet*; (B) corte transversal do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **Fonte:** Márcia Castro, 2012.

4.2.2. Elaboração dos Extratos

- **Extrato Aquoso**

Foram pesados 50 g do pó da *Curcuma* e diluídos em 1000 mL de água destilada. A solução foi aquecida em um béquer fechado por cerca de 15 minutos, durante a extração a mistura foi agitada constantemente com um bastão. Depois dessa etapa, o extrato foi resfriado à temperatura ambiente e filtrado com algodão (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1995; SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002). Após a extração, o material foi desidratado através do processo de liofilização, utilizando o aparelho Liofilizador marca LS 3000 (TERRONI®) por 48 horas.

- **Extrato Hidroalcoólico**

Para a preparação deste extrato foram utilizados 200 g do rizoma de *C. zerumbet*, secos e triturados. Estes foram macerados em frasco Mariotte (2 L) na proporção de 1:1 (etanol:água), por um período de 72 horas. Após esta etapa, o extrato foi concentrado em rotaevaporador para a eliminação do excesso de solvente (LIST; SCHIMIDT, 1989).

- **Óleo Essencial**

A extração do óleo essencial foi realizada pelo processo de hidrodestilação, em triplicata, utilizando o aparelho de Clevenger acoplado a um balão de 3 L. Foi acrescentado ao balão 200 g do rizoma triturado seco de *C. zerumbet* e 1,5 L de água para ser destilado. O período da extração foi de aproximadamente 4 horas, contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial extraído foi coletado, centrifugado e seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frascos âmbar sob refrigeração e enviados para a análises espectroscópicas de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massa CG-EM.

- **Rendimento dos Extratos e Óleo Essencial**

O rendimento dos extratos aquoso, hidroalcoólico e óleo essencial foram determinados pela relação m/m do extrato seco e do pó do rizoma utilizado na extração.

4.2.3. Caracterização Fitoquímica dos Extratos

Os extratos foram analisados por cromatografia comparativa em camada delgada (CCD) e testes para reveladores fitoquímicos qualitativos e quantitativos. Os

óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) marca Shimadzu, modelo QP2010MS.

- **Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Os extratos foram analisados por cromatografia comparativa em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de Sílica gel G60 Merk e como eluentes os solventes acetato/clorofórmio (8:2) e água destilada/álcool etílico (8:2). Como soluções reveladoras foram utilizadas: Dragendorf, Cloreto Férrico, Liberman-Burchard, Iodo Ressublimado, o UV nas bandas 254 nm e 365 nm para verificação da presença de substância como alcalóides, taninos, esteroides e terpenoides respectivamente (DAÍ *et al.*, 1997; OHE, 2000; TANAKA; SHIMIZU, 2001).

- **Testes Fitoquímicos Qualitativos**

Nos extratos brutos foi aplicada uma marcha analítica, conforme preconizado por Matos (1997), para detectar a presença das diferentes classes de metabólitos secundários presentes em plantas.

- **Testes Fitoquímicos Quantitativos**

Nos extratos brutos foram quantificados constituintes bioativos como: compostos fenólicos, flavonoides, antocianina e carotenoides totais.

- **Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa do Óleo do Rizoma**

Para o preparo da amostra a ser injetada no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas, utilizou-se 1 µL de amostra diluído em 1 mL de diclorometano. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Shimadzu, modelo QP2010MS. O espectrômetro de massas realizou as análises no modo scan (40-600 m/z) e a coluna capilar (30 m de comprimento com 0,25 d.i. e 0,25 µm de filme) com uma fase estacionária composta de 5 % de fenil-metil polisiloxano.

A programação que possibilitou a resolução cromatográfica dos picos de interesse foi na seguinte condição de análise:

- ✓ Temperatura inicial da coluna: 60 °C
- ✓ Temperatura final da coluna: 240 °C
- ✓ Temperatura do injetor: 250 °C

4.3. Análises Físico-químicas da Matéria-prima Vegetal

Para caracterização físico-química do rizoma e dos extratos analisou-se, em triplicata, os teores de: umidade, cinzas, proteína, lipídios, fibra bruta, minerais, carboidrato e valor energético.

4.4. Determinação da Atividade de Água

A leitura de atividade de água (aw) foi feita em aparelho da marca Aqua Lab modelo 4TE, 47-63 Hz, versão 4. A amostra foi adicionada em uma cápsula e colocada no aparelho com a tampa da câmara fechada. Um feixe infravermelho foi focado e então determinado o ponto de orvalho da amostra, o qual foi traduzido em atividade de água. As análises foram realizadas em triplicata.

4.5. Determinação da Cor

As análises de cor foram determinadas diretamente no colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400b, em triplicata. Foram utilizadas alíquotas da amostra homogênea e posicionadas no equipamento. Os resultados foram interpretados pelo sistema CIELAB, utilizando as coordenadas L^* , a^* , b^* , ΔL^* , Δa^* , Δb^* e ΔE , onde:

- *Luminosidade L^** : possui escala de zero (preto) a 100 (branco), ou seja, quanto mais próximo de 100, mais branco é;
- *Coordenada de cromaticidade a^** : varia de a^* positivo (tendência da cor para tonalidade vermelha) até a^* negativo (tendência da cor para tonalidade verde);
- *Coordenada de cromaticidade b^** : varia de b^* positivo (tendência da cor para tonalidade amarela) até b^* negativo (tendência da cor para tonalidade azul);

Existem valores de delta associados a esta escala de cor (ΔL^* , Δa^* e Δb^*) para indicar o quanto uma amostra padrão se difere de outra em L^* , a^* e b^* .

4.6. Análise Térmica dos Extratos

Os extratos foram submetidos às técnicas de análise térmica: Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferenciada (DTA) em aparelho de determinação simultânea (SDT Q-600), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) (DSC Q-20). Foi utilizada atmosfera de ar sintético, com fluxo de gás de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. O intervalo de temperatura analisado foi de 30 a $250 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.7. Análises Microbiológicas dos Extratos

- **Contagem total de mesófilos**

Para a determinação de bactérias mesófilas o meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA) e o sistema foi o de semeadura em profundidade. Os extratos aquoso e hidroalcoólico foram analisados pipetando-se alíquotas de 1

mililitro de cada diluição para placas de petri esterilizadas, fazendo de cada diluição placas em duplicata; em seguida foram invertidas cerca de 15 mL de Agar fundido e resfriado a 45 °C. Depois de agitadas em movimentos circulares para promover a homogeneização, esperou-se o tempo de solidificação do Agar para serem invertidas e incubadas. As placas foram colocadas em estufa a 32 °C por 48 h.

Transcorrido o tempo de incubação fez-se a contagem do número de colônias e os resultados foram expressos em UFC/g (SILVA et al., 1997a).

- **Contagem de bolores e leveduras**

Para contagem de bolores e leveduras foram feitas diluições sucessivas de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , seguida de plaqueamento em superfície em meio pda-acidificado. O procedimento para inoculação dos extratos e posterior contagem, foi similar ao apresentado para contagem total de mesófilos, variando apenas a temperatura e o período de incubação, 30 °C por 5 dias (SILVA et al., 1997a).

- **Número provável de coliformes totais e fecais**

- ✓ **Teste presuntivo**

Para o teste presuntivo foi utilizado o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Alíquotas de 1 mL das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o caldo LST e microtubos de Durham, e em seguida incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Foram considerados positivos os tubos que apresentarem formação de gás no interior dos microtubos (SILVA et al., 1997a).

- ✓ **Teste confirmativo para coliformes totais**

Alíquotas das amostras consideradas positivas no teste presuntivo foram inoculadas com auxílio de alça de platina, em tubo de ensaio contendo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile (CVBLB) e incubadas a 35 °C por 24 a 48 h. Foram

considerados positivos os tubos com produção de gás no interior dos microtubos de Durham. Os resultados foram expressos em NMP/g (SILVA et al., 1997a).

✓ **Teste confirmativo para coliformes fecais**

Alíquotas dos tubos positivos foram inoculadas, com auxílio de alça de platina, em tubos contendo Caldo *E. coli* (Caldo EC). Estes foram incubadas em banho-maria a 45,5 °C por 24 a 48 h. Foram considerados positivos, tubos com meio turvo e com produção de gás. Os resultados foram expressos em NMP/g (SILVA et al., 1997a).

- ***Staphylococcus aureus***

Amostras das diluições preparadas foram inoculadas em placas de petri contendo meio Bairo-Parker (BP) e incubadas a 35 °C por 48 horas. Em seguida cinco colônias típicas foram inoculadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI), para posterior teste de confirmação (SILVA et al., 1997a).

- ***Salmonella sp.***

Para o teste de *Salmonella sp.*, 25 mL de extratos aquoso ou hidroalcoólico foi acrescentado a 225 mL de caldo lactosado e incubou-se a 35 °C por 24 h. Transferiu-se 1 mL do meio de cultura anterior a um tubo de ensaio com 9 mL de caldo selenito cistina e incubou-se a 35 °C por 24 h. Após incubação semeou-se, por esgotamento, placas de petri com agar para e incubou-se a 35 °C por 24h. Após este período verificou-se a presença ou a ausência de colônias características de *Salmonella sp* (SILVA et al., 1997a).

4.8. Análises Biológicas e Farmacológicas dos Extratos

A determinação das atividades biológicas e farmacológicas foram utilizadas por vários modelos testes estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde – OMS e de acordo com as normas técnicas estabelecidas e aprovadas pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA/INPA sob o número de protocolo 003/2013.

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos albinos (*Mus musculus* – variedade albinus) pesando entre 18 – 30 g, e ratos albinos pesando 200 – 400 g, do Biotério Central do INPA; e os ovos de *Artemia salina* foram adquiridos no comércio de Manaus-AM, provenientes da cidade do Arraial do Cabo-RJ e comercializado pela Maramar Aquacultura Ltda.

4.8.1. Toxicidade Frente à *Artemia salina*

A *Artemia salina*, um crustáceo de águas salgadas, vem sendo bastante utilizado para testar a toxicidade de produtos naturais ao invés do uso de cobaias, por utilizar número menor de animais, causar menos estresse e dor, além de apresentar menor custo e maior rapidez (PARRA *et al.*, 2001).

O ensaio foi originalmente descrito por Meyer *et al.* (1982), mas passou por adaptações. O teste consistiu em adicionar a diferentes frascos 1000, 500, 250, 125, 50 e 25 µg/mL dos extratos, levar a secura por 24 h e em seguida adicionar 10 náuplios de *Artemia salina* e completar a solução até 4 mL. Após 24 h, foi realizada a contagem do número de animais vivos em cada tubo para determinar a concentração média letal (DL50) do extrato em µm/mL por meio do software Probitos®. O extrato pode ser considerado tóxico quando o valor de DL50 for inferior a 1000 µm/mL (MEYER *et al.*, 1982). Como controle positivo do experimento foi utilizado solução salina. Para a obtenção dos náuplios da *Artemia salina*, 200 mg de ovos do minicrustáceo foram adicionados a 400 mL de solução salina, onde permaneceram por 48 h sob luz e aeração contínua.

4.8.2. Avaliação Comportamental e Sistêmica - Atividade Exploratória

Os efeitos gerais de toxicidade dos extratos vegetais obtidos foram realizados utilizando-se dois grupos de camundongos machos com peso entre 16 - 24g, cada grupo contendo cinco animais. O primeiro grupo recebeu por via intraperitoneal (i.p.) (**Figura 9**) doses de 10, 100, 1000 mg/Kg e o outro grupo por via oral (v.o.) doses de 10, 100, 1000, 2000 e 5000 mg/Kg dos extratos aquoso e hidroalcoólico. Um grupo também contendo cinco animais serviu de controle, recebendo solução salina (0,9 %) pelas mesmas vias citadas anteriormente (LAPA *et al.*, 2008).



Figura 9: Aplicação do extrato do rizoma da *Curcuma zerumbet* por via intraperitoneal. **Fonte:** Márcia Castro, 2013.

Após uma hora da injeção dos extratos, os animais foram levados a um campo-aberto (**Figura 10**), confeccionado em acrílico, usado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza (“grooming”), de levantar, assim como o tempo em que permanecia parado e a sua defecação, como índice de emocionalidade, foi registrada durante 05 minutos. Assim, foi possível uma avaliação da atividade estimulante ou depressora do composto em teste (LAPA *et al.*, 2008).



Figura 10: Campo-aberto utilizado para análise de testes gerais após aplicação do extrato do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **Fonte:** Márcia Castro, 2013.

Os camundongos após à análise da atividade estimulante passaram pelo “teste do bastão” para verificação da sua capacidade normal de preensão. Os animais foram suspensos pela cauda e suas patas dianteiras foram colocadas num bastão, posicionado a 20 cm de altura, sendo que no momento em que o animal agarrou o bastão com as patas dianteiras, ele foi tracionado horizontalmente e solto.

Registrou-se então o tempo que o animal levou para agarrar o bastão com as patas posteriores (BOISSIER *et al.*, 1961). Quando os animais caíam do bastão em 3 segundos ou não conseguiram agarrá-lo com suas patas posteriores por três vezes consecutivas, essa ausência de resposta foi considerada índice positivo de relaxamento muscular, associado à sedação (LAPA *et al.*, 2008).

Os animais então foram deixados em observação 1, 2 e 14 dias. Os parâmetros observados foram anotados em tabelas adaptadas (apêndice) e todos os efeitos observados foram comparados imediatamente com os animais controle.

4.8.3. Análise Toxicidade Subaguda dos Extratos

A toxicidade subaguda do extrato aquoso e hidroalcoólico foi analisada utilizando ratos Wistar machos albinos, provenientes do Biotério Central do Inpa. Durante o período experimental (28 dias), os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, sob fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura entre 23 °C ± 2 °C. Estes animais foram alimentados com ração e água *ad libitum*, em dias alternados com extratos (aquoso ou hidroalcoólico). Durante este período analisou-se a variação do consumo de ração, água e o peso corpóreo dos animais.

Os animais foram randomicamente divididos em 07 grupos, cada grupo contendo 6 ratos, conforme o protocolo abaixo:

- a) **Grupo 1:** alimentados com 100 mg/Kg de extrato aquoso;
- b) **Grupo 2:** alimentados com 1000 mg/Kg de extrato aquoso;
- c) **Grupo 3:** alimentados com 5000 mg/Kg de extrato aquoso;
- d) **Grupo 4:** alimentados com 100 mg/Kg de extrato hidroalcoólico;
- e) **Grupo 5:** alimentados com 1000 mg/Kg de extrato hidroalcoólico;
- f) **Grupo 6:** alimentados com 5000 mg/Kg de extrato hidroalcoólico;
- g) **Grupo 7:** controle.

Após período de 28 dias, foi coletado o sangue dos animais de cada grupo e analisou-se os seguintes parâmetros:

- Hematológico: leucócito total, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), curva de distribuição das hemácias de acordo com o volume eritrocitário (RDW-SD), coeficiente de variação da média do volume das hemácias (RDW-CV) e volume plaquetário médio (VPM) plaquetas.

- Bioquímico: aspartato aminotransferase (AST ou TGO), alanina aminotransferase (ALT ou TGP), albumina, glicose, ureia, colesterol total, triglicerídeos, ácido úrico.

4.8.4. Avaliação da Atividade Antiúlcera dos Extratos- Lesão Gástrica Induzida por Etanol

Inicialmente os camundongos foram pesados e identificados. Após este procedimento, foram separados em 4 grupos com 5 animais conforme os tratamentos: a) extrato (2000, 1000, 500, 250, 150, 75 e 50 mg/Kg) b) ranitidina (50 mg/kg) (controle positivo); c) veículo (5 mL/kg de água destilada) (controle negativo), administrados por via oral (**Figura 11**).



Figura 11: Aplicação do extrato do rizoma da *Curcuma zerumbet* por via oral em camundongo. **Fonte:** Márcia Castro, 2013.

Após 1 h do tratamento foi administrado (75 %, 1 mL/100 g) por via oral o etanol (agente lesivo). Passando 1 h da administração do etanol os animais foram sacrificados através do deslocamento cervical (ROBERT et al., 1979; LAPA et al., 2008).

Os estômagos foram retirados abertos e lavados com salina em seguida foram estendidos e presos em placa de petri e avaliados em lupa estereoscópica analisando o índice de lesão e o número de úlceras, de acordo com a tabela de pontuação da lesão gástrica (apêndice) ROBERT et al., 1979; LAPA et al., 2008).

4.8.5. Atividades Anti-inflamatória e/ou Analgésica

4.8.5.1. Contorções Abdominais produzidas pelo Acido Acético 2%

As contorções abdominais em camundongos foram caracterizadas por contração do abdômen, seguida por extensão de uma ou ambas as patas traseiras (**Figura 12**) (KOSTER, 1959). Esta resposta motora decorre da aplicação de um estímulo químico, o ácido acético, nociceptivo por via i.p. (LAPA et al., 2008).



Figura 12: Camundongo apresentando contorção abdominal após a aplicação do extrato do rizoma da *Curcuma zerumbet*. **Fonte:** Márcia Castro, 2013.

Utilizou-se um frasco de ácido acético glacial P.A. e as diluições foram feitas com salina 0,9 %. O volume de ácido acético diluído injetado foi mantido constante 10 mL/Kg. (LAPA *et al.*, 2008).

Aos animais dos grupos tratados foram administrados, diferentes doses do extrato por via oral doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg dos extratos aquoso e hidroalcoólico. Ao grupo controle negativo foi administrado o veículo (salina 0,9%) 10 mL/Kg e o controle positivo recebeu indometacina 25 mg/Kg. Após 60 minutos, foi realizada a injeção intraperitoneal de ácido acético 2% (0,02 mL/100g). Em seguida, os animais foram colocados em uma caixa de vidro e realizou-se uma contagem cumulativa do número de contorções que ocorreram durante um período de 1 hora após a aplicação do ácido acético.

4.8.5.2. Teste da Placa Quente

Este teste caracteriza-se pela colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50 °C que determinou uma resposta característica, na qual, o animal troca, rapidamente o apoio dos pés, levanta ou lambe as patas (WOOLFE; DONALD, 1944). O aparecimento destas respostas pode ser indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico (LAPA *et al.*, 2008).

Os animais foram divididos em quatro grupos com cerca de cinco animais cada, onde foram colocados individualmente na placa quente com temperatura constante de 52 °C e dois valores basais foram obtidos com intervalos de 30 minutos. O tempo máximo de contato do animal com a placa foi de 15 segundos para evitar lesões. Em seguida, os grupos escolhidos foram tratados com o extrato da planta recebeu por

via oral (v.o.) doses de 100, 250, 500 e 1500 mg/Kg do extrato. O grupo controle negativo foi tratado através da v.o. com o veículo (salina 0,9%) 10 mL/Kg e o controle positivo recebeu ketamina 25 µg/Kg.

4.8.5.3. Analgesímetro

Quatro grupos de ratos foram estudados com cerca de cinco animais cada. Em todos, os animais foram realizados a medida do volume basal de ambas as patas, utilizando o aparelho LE 7306 Analgesy Meter. Em seguida, os animais foram tratados por via oral (v.o.) receberam doses de 100, 250 e 1500 mg/Kg do extrato aquoso ou hidroalcoólico. Os grupos tratados receberam extrato da planta nas doses escolhidas e o grupo controle negativo recebeu o veículo (salina 0,9 %)10 mL/Kg e o controle positivo recebeu ketamina 25 µg/Kg. Com o auxílio do aparelho LE 7306 Analgesy Meter, foi possível determinar a resposta à estimulação da dor através da pressão mecânica, aplicada à pata dos ratos (**Figura 13**).



Figura 13: Estimulação da dor através da pressão aplicada à pata dos ratos pelo aparelho Analgesy Meter. **Fonte:** Márcia Castro, 2014.

Esta força foi aplicada através de uma ponta cônica que pressiona o membro do animal posicionado em uma plataforma abaixo da ponta. Esta ponta foi movida para baixo (aumento da força) e para cima (libera o estímulo) através de um motor controlado por um pedal.

Esta ponta cônica foi conectada a uma célula extensiométrica (medidor de força), que faz possível a determinação da força real (expressa em gramas), que é

exercida no momento pela estimulação da ponta. Este instrumento permitiu um rápido e preciso estudo da atividade analgésica.

4.8.5.4. Determinação da atividade antiedematogênica dos extratos da *Curcuma zerumbet* - Edema induzido por carragenina.

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos induz aumento agudo e progressivo do volume desta e será proporcional à intensidade da resposta inflamatória, sendo um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos (LAPA *et al.*, 2008).

Neste modelo o efeito antiedematogênico do extrato da *Curcuma zerumbet*, foi estudado em quatro grupos de ratos adultos, com seis animais cada. Em todos os grupos, realizou-se medida do volume basal de ambas as patas e em seguida os animais foram tratados por via oral (v.o.) doses de 100, 500 e 1500 mg/Kg de extratos aquoso e hidroalcoólico; o grupo controle negativo recebeu o veículo (salina 0,9% + Tween a 20%) e o positivo recebeu a Indometacina (5 mg/Kg) (WINTER *et al.*, 1962). Uma hora após o tratamento, o edema foi induzido nas patas traseiras dos animais, injetando 30 μ L/pata de uma solução de carragenina a 2 %, na pata contralateral foi injetada com o mesmo volume de solução fisiológica (LAPA *et al.*, 2008). A espessura da inflamação foi mensurada imediatamente e em intervalos de 15 a 15 min. após a administração da carragenina com o auxílio de um paquímetro digital 150 mm Profissional Western (Figura 14) (MOREIRA, 2008; LAPA *et al.*, 2008). O edema produzido nas patas de cada animal foi determinado pela diferença entre as medidas das patas direita e esquerda.



Figura 14: Experimento de edema de pata induzido por carragenina. (A) Administração subplantar de carragenina; (B) Medição do edema com auxílio de um paquímetro. **Fonte:** Márcia Castro, 2014.

4.9. Análise Estatística

Os dados foram representados como médias \pm desvio padrão das médias de 5 animais por grupo de experimentos *in vivo*. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste Tukey. As análises foram realizadas usando o programa para *Windows*, *Graph Pad Prism* versão 6.0 (*Graph Pad Software*). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

4.10. Desenvolvimento do iogurte

O estudo em análise foi realizado em dois laboratórios distintos, no qual a parte farmacológica e química foi desenvolvida no Laboratório Temático de Farmacologia e Química de Produtos Naturais, enquanto a parte da elaboração do iogurte e análises nutricionais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Nutrição do Inpa.

4.10.1. Elaboração do iogurte

O experimento foi composto por 2 tratamentos, variando-se a concentração e o tipo de extrato obtidos do rizoma da *Curcuma zerumbet* (Zingiberaceae). Após obtenção do iogurte natural, foi adicionada os diferentes extratos em concentrações de 0, 0,12 e 0,25 %. Os iogurtes foram armazenados em refrigerador com temperatura a 4° C e avaliados durante 35 dias quanto a sobrevivência das bactérias lácticas e a variação de pH, constituindo-se em um experimento esquematizado em parcelas divididas com cinco níveis secundário (0, 07, 14, 28 e 35 dias de armazenamento) (**Figura 15**).

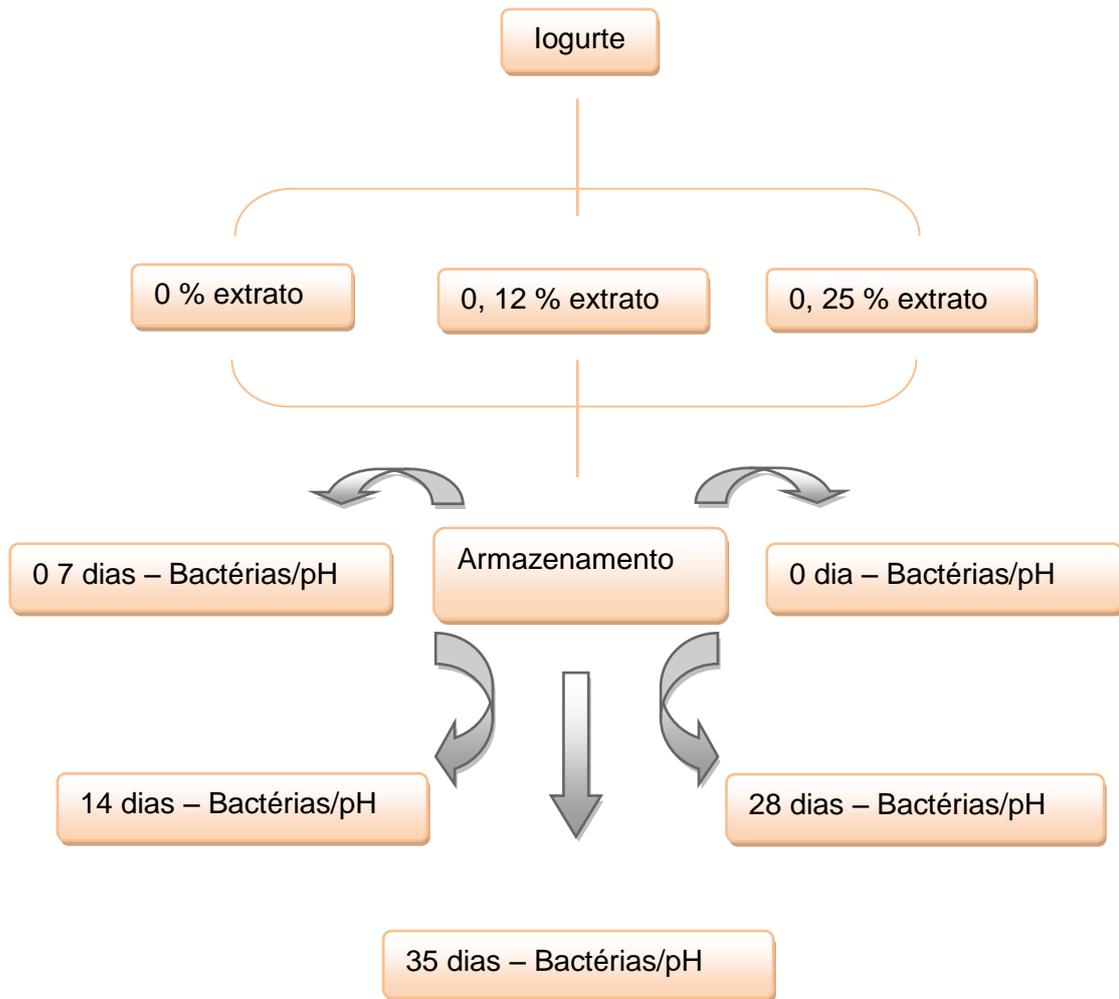


Figura 15: Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de iogurtes.

4.11. Processamento dos iogurtes

O leite utilizado foi corrigido quanto ao teor de extrato seco para 15 %, pela adição de leite em pó integral, sendo homogeneizado até completa dissolução. Após a correção, o leite foi pasteurizado a 83 °C por 30 minutos, seguido de resfriamento até 42 °C e inóculo da cultura láctea mista de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, Yo-Mix Yogurt Cultures da Danisco, conforme o diagrama da Figura 16.

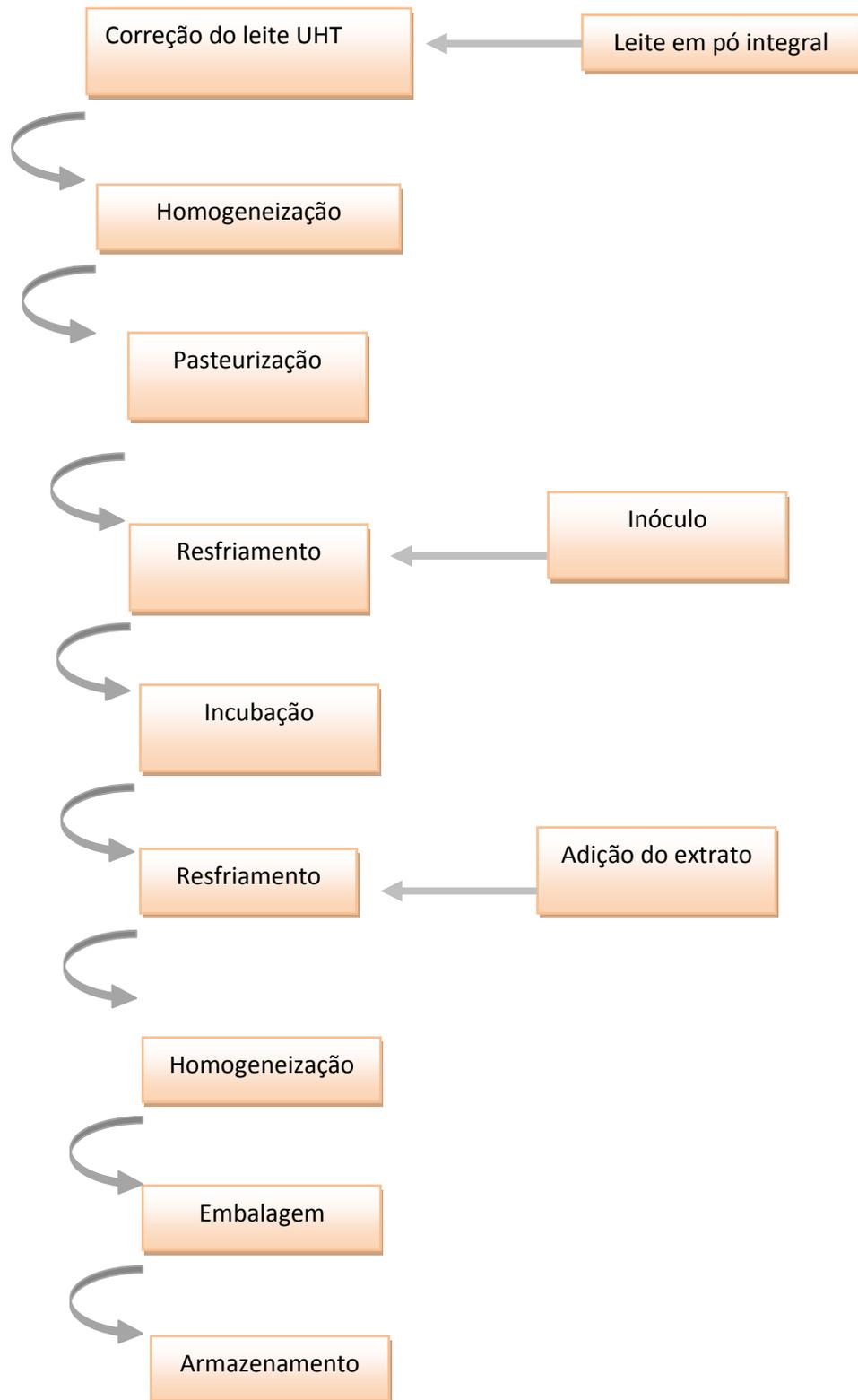


Figura 16: Fluxograma do preparo do iogurte de extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

4.12. Análises Físico-químicas do Leite

- a) **Acidez:** Foi determinado por titulação com NaOH 0,111 mol/L e expresso em °D, de acordo com Silva e colaboradores (1997b).
- b) **Proteína:** Foi determinado pelo método de Micro-Kjeldhal, sendo utilizando ácido sulfúrico para digestão e após destilação, HCl 0,02 N para titulação (A.O.A.C., 1998).
- c) **Lipídeo:** Foi determinado por gravimetria e a extração foi realizada com éter de petróleo de acordo com Silva e colaboradores (1997b).

4.13. Análises Físico-químicas dos iogurtes

As análises físico-químicas: Umidade; Proteína; Lipídeo; Cinza; Valor Energético; foram realizadas conforme o **item 4.3**.

4.14. Análises Microbiológicas dos iogurtes

Análises microbiológicas realizadas nos iogurtes foram conforme o **item 4.7**.

4.15. Contagem Total de Bactérias Lácticas

As contagens de bactérias lácticas nas amostras de iogurtes foram realizadas nos tempos de 0, 07,14, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado a 4°C. Alíquotas de 25 g das amostras foram diluídas em 225 mL de água peptonada (H₂O_p) 0,1% (diluição 10⁻¹), homogeneizadas e submetidas a diluições sucessivas (10⁻² a 10⁻⁸) H₂O_p. Posteriormente foi realizada a semeadura em profundidade das diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁸ em meio de cultura Ágar MRS (Man Rogosa & Sharpe) em

duplicata. As placas foram incubadas a 42 °C durante 48 h, de acordo com Silva et al. (1997).

4.16. Avaliação da Atividade Antiúlcera dos Iogurtes Formulados

Esta atividade foi analisada conforme o item 4.8.4. com doses de 3 mL/Kg de iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % do extrato aquoso ou hidroalcoólico para verificar a ação antiúlcera. Para confirmar a gastroproteção dos iogurtes foi realizada análise histológica através das biópsias dos estômagos dos animais do grupo controle e dos grupos testados. Os estômagos foram fixados, durante 48 horas, em solução de formol neutro tamponado a 10%. Após fixação, os fragmentos foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes (70, 80, 90 e 100%). Posteriormente, foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo de rotação e corados em hematoxilina-eosina (HE).

As leituras das lâminas foram realizadas em triplicata para cada grupo analisado e as lesões microscópicas foram descritas de forma qualitativa, de acordo com a sua manifestação. As imagens foram capturadas com auxílio do microscópio Olympus CX40, acoplada a uma câmera digital e analisadas pelo programa EDN-2.

4.17. Avaliação Sensorial dos Iogurtes

Os iogurtes foram avaliados quanto à aceitabilidade empregando-se escala hedônica estrutura de nove pontos, de acordo com a metodologia de Minim (2010) (**Apêndice**). A análise contou com a participação de 100 provadores não treinados, para os quais foram oferecidos cerca de 50 mL de iogurte com extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet*. O iogurte mantido sob refrigeração (5 ± 1 °C), foi oferecido aos provadores em copos plásticos descartáveis seguindo as normas básicas de

higiene. A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Federal do Amazonas sob o número de processo 554.555.

4.18. Análise Estatística

Os resultados das análises físico-químicas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando Delineamento Inteiramente Casualizado e a comparação de médias pelo teste de Tukey em nível de 5 % de significância. Para análise sensorial, foi adotado o Delineamento em Blocos Casualizados e teste de Tukey para comparação de médias.

*RESULTADOS E
DISCUSSÃO*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos Extratos do Rizoma da *Curcuma zerumbet*

Os rendimentos dos extratos (aquoso e hidroalcoólico) e de óleos essenciais do rizoma da *C. zerumbet* encontram-se na Tabela 2. Comparando os rendimentos dos extratos, o hidroalcoólico foi significativamente superior ao aquoso (15,75 % \pm 1,50 e 24,45 % \pm 1,07) respectivamente. Observa-se também nos resíduos dos extratos a presença de amido, considerado o principal carboidrato, facilmente extraído com ampla possibilidade de utilização diretamente na dieta humana ou na indústria de alimentos.

Os óleos essenciais apresentaram rendimento médio 2,0 \pm 0,4 % com odor característico do rizoma e coloração verde-azul escura, próximo aos estudos de Hossain e colaboradores (2012) no qual cita que esta espécie pode apresentar uma variação no rendimento de 1,5 a 5%.

Tabela 2: Rendimentos dos extratos e óleos essenciais da *Curcuma zerumbet*.

Extratos	Rendimentos %
Extrato aquoso	15,75 \pm 1,5
Extrato hidroalcoólico	24,45 \pm 1,0
Óleo essencial (v/p)	2,0 \pm 0,4

5.2. Caracterização Fitoquímicas dos Extratos

- **Caracterização do óleo por CG-EM**

A análise de CG-EM do óleo essencial do rizoma da *C. zerumbet* detectou 31 componentes químicos apresentados na Tabela 3. O óleo apresentou 22,5 % de monoterpenos e 77,5 % de sesquiterpenos com estruturas ou propriedades semelhantes, indicando que os sesquiterpenos predominam no óleo essencial

corroborando com os estudos de Zhou e colaboradores (2013) ao analisar o óleo da *C. zedoaria* descreveram que esta possui 19,6 % de monoterpenos e 80,4 % de sesquiterpenos. Yang e colaboradores (2011) corroboram também com estes dados, no qual realizaram uma pesquisa com diversas espécies de cúrcuma e identificaram uma média de 10,3 % de monoterpenos e 89,7 % de sesquiterpenos.

Tabela 3: Identificação dos constituintes ativos do óleo da *Curcuma zerumbet* detectados por CG-MS.

Picos	Tempo de retenção (min.)	% área	Fórmula molecular	Constituintes
1	6.880	0.46	C ₆ H ₁₂ O ₂	ácido capróico
2	7.199	0.53	C ₈ H ₁₈ O	3-heptanol, 2-metil
3	10.350	0.69	C ₁₀ H ₁₈ O	(-)-α -terpineol
4	15.980	2.23	C ₁₀ H ₁₆ O	(+)-cânfora
5	16.465	1.08	C ₁₀ H ₁₈ O	(+)-borneol
6	17.872	0.30	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	geranil propionato
7	25.799	5.96	C ₁₅ H ₂₄	(-)-β-curcumenol
8	27.218	0.63	C ₁₅ H ₂₄	Cariofileno
9	28.517	1.97	C ₁₅ H ₂₄	β-farnesene
10	29.943	0.81	C ₁₅ H ₂₄	α-humuleno
11	30.379	0.67	C ₁₅ H ₂₄	humuleno-6,7-epoxi
12	30.567	0.58	C ₁₅ H ₂₄	α-selineno
13	30.661	2.40	C ₁₅ H ₂₀ O	Curzereno
14	33.288	0.64	C ₁₅ H ₂₄	Aristolóqueno
15	34.667	0.40	C ₁₅ H ₂₆ O	trans-nerolidol
16	34.781	0.58	C ₁₅ H ₂₆ O	α-bisabolol
17	35.543	49.45	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	Curzerenona
18	35.799	3.04	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	Curcumenol
19	36.294	1.19	C ₁₅ H ₂₄ O	(+)-espatulenol
20	37.643	0.63	C ₁₅ H ₂₆ O	Farnesol
21	38.996	2.91	C ₁₃ H ₁₈ O	3,7-ciclododecadieno-1-
22	40.027	5.20	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	Curcumenone
23	40.175	0.79	C ₁₅ H ₂₆ O	Nerolidol
24	40.462	0.97	C ₁₅ H ₂₂ O	Curlone
25	40.606	1.90	C ₁₀ H ₁₆ O	cis-p-mentil-2,8-dienol
26	40.983	2.51	C ₁₃ H ₂₂	Ciclohexano
27	41.198	2.34	C ₁₅ H ₂₂ O	Turmerone
28	42.395	2.05	C ₁₀ H ₁₆ O	β-eudesmol
29	42.745	5.04	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	13-aldeído
30	44.498	0.90	C ₁₅ H ₂₄	β-elemenol
31	49.155	1.15	C ₁₄ H ₁₈	Fenantreno

Observando a Tabela 3 e a Figura 17, o constituinte químico majoritário encontrado foi o curzerenona (C₁₅H₁₈O₂) (pico 17) com 49,45 % de área, um componente pouco estudado e potente no tratamento anti-inflamatório (SOARES; ALVES, 2004), analgésico e antioxidante (SOSHI; MATHELA, 2012). Este resultado

está de acordo com o relatado por Singh e colaboradores (2013), no qual a curzerenona (22,3 %) foi o principal componente do óleo essencial cultivado no norte da Índia.

Dentre os picos detectados, cinco compostos são característicos do gênero cúrcuma: curzereno, curcumenol, farnesol, β -elemeno e curcumenona (YANG et al., 2005; YANG et al., 2007; YANG, et al., 2011).

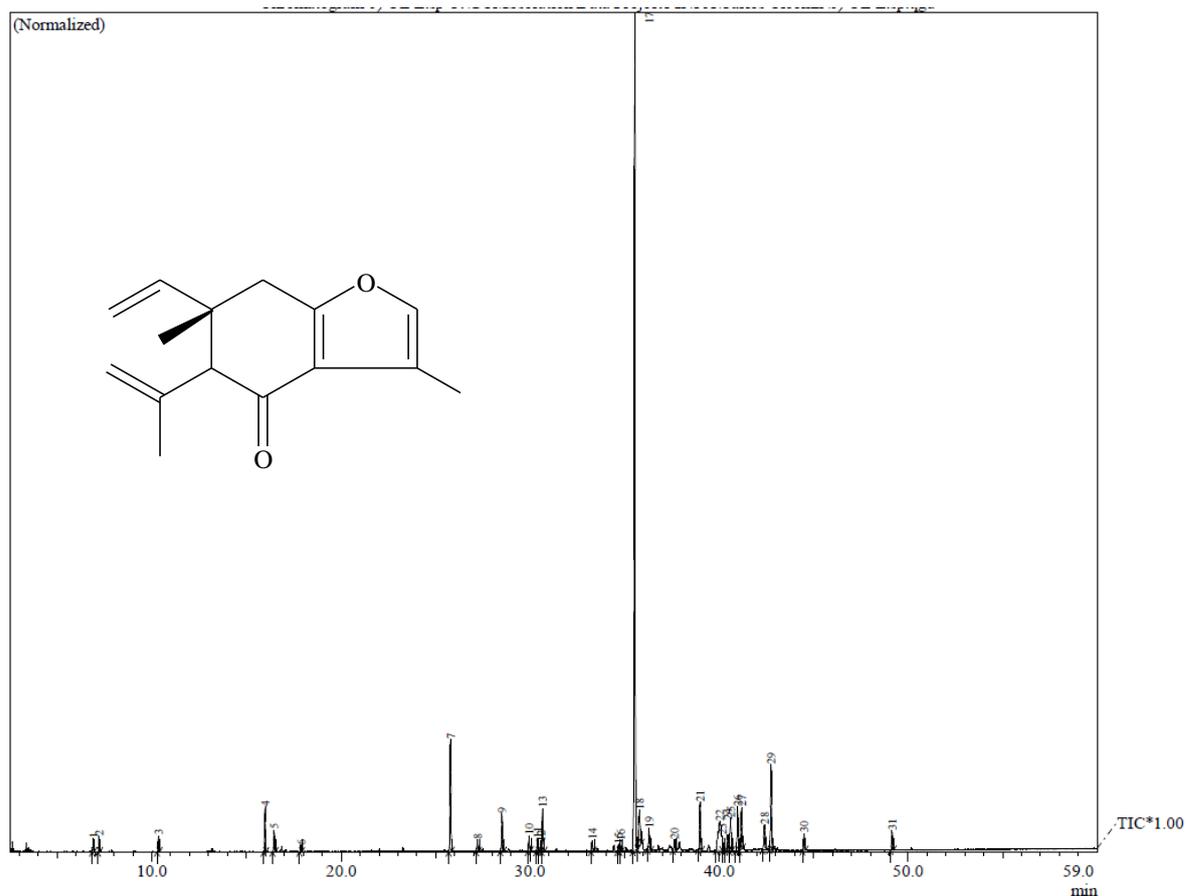


Figura 17: Cromatograma dos compostos químicos do óleo do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

- **Caracterização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A fim de verificar a presença de algumas classes de metabólitos secundários foi realizado um *screening* fitoquímico utilizando a técnica de CCD e reações de identificação. Nas leituras das placas para o extrato aquoso revelado em

Dragendorf, Liberman–Burchard e Cloreto Férrico não identificou nenhum composto. Entretanto, quando revelado em Iodo ressublimado apresentaram três manchas com $R_F = 0,22$, $R_F = 0,44$ e $R_F = 0,89$ (**Figura 18**) caracterizando presenças de duplas ligações. Quando revelado em UV apresentaram duas manchas com $R_F = 0,52$ e $R_F = 0,66$ em banda 254 nm identificando terpenoides e curcuminoides (**Figura 19**), corroborando com os estudos de Paramasivam e colaboradores (2009).

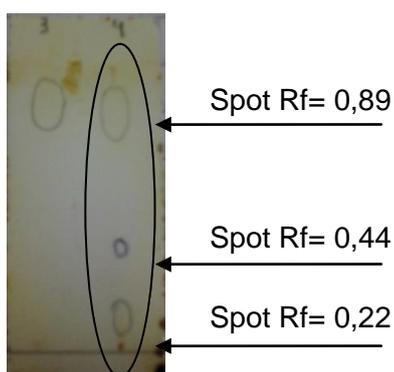


Figura 18: CCD do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* revelado em iodo ressublinado.

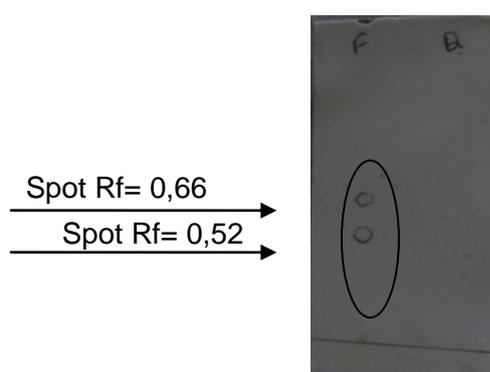


Figura 19: CCD do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* revelado UV em banda 254 nm.

Zhang e colaboradores (2008), estudando as espécies de *Curcuma* coletada de diferentes lugares observaram que os curcuminoides: bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina apresentaram os seguintes spots $R_F = 0,48$, $R_F = 0,62$ e $R_F = 0,66$ respectivamente, quando revelados em UV. Neste trabalho, observou-se a presença do curcuminóide curcumina no extrato aquoso com $R_F = 0,66$, conforme a Figura 19.

Nas leituras das placas de CCD em extrato hidroalcoólico revelado em Dragendorf encontrou-se as manchas alaranjadas, $R_F = 0,21$ caracterizando a presença de possíveis alcalóides ou compostos nitrogenados. Quando revelado em Liberman–Burchard apresentaram duas manchas com spot com $R_F = 0,79$ e $R_F = 0,52$ identificando esteróides/triterpenoides com manchas nas cores verde e azul o que caracteriza a presença dessa classe de metabólito. Quando revelado em Iodo ressublimado apresentou spot com $R_F = 0,76$, caracterizando terpenoides e quando revelado em UV apresentaram três manchas com spot com $R_F = 0,94$, $R_F = 0,62$ e $R_F = 0,53$ em banda 254 nm (**Figura 20**). Conforme o estudo de Zhang e

colaboradores (2008) o $R_F = 0,62$ encontrando no extrato hidroalcoólico desta espécie refere-se ao curcuminoide dimetoxicurcumina.

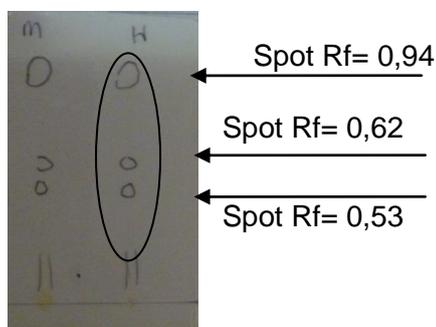


Figura 20: CCD do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet* revelado em UV banda 254 nm.

- **Testes Fitoquímicos Qualitativos**

O perfil fitoquímico qualitativo do extrato aquoso e hidroalcoólico da *C. zerumbet* (**Tabela 4**), revelou a presença de saponinas: compostos fenólicos: flavonoides, flavonas, antocianinas e carotenoides. Entretanto, não foram encontrados taninos. Comparando esta espécie de curcuma com a *C. zedoaria* Rosc, estudos realizados por Srivastava e colaboradores (2011), observou-se que seu extrato hidroalcoólico foi positivo para taninos o que não foi detectado nesta espécie. Enquanto no extrato aquoso não foram encontrados saponinas e flavonoides, como detectados nesta espécie.

Tabela 4: Perfil fitoquímico qualitativo dos extratos aquoso e hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet*.

Classes	Reações	Extrato	
		Aquoso	Hidroalcoólico
Triterpenos e esteroides	Liberman-Burchard	-	+
Tanino	$FeCl_3$	-	-
Saponinas	Índice de Espuma	+	+
Antocianina	H_2SO_4	+	+
Flavonas e Flavonois	Shinoda	+	+

Os testes de saponinas foram considerados positivos pela formação permanente de espuma após a solução ser agitada. Embora estas sejam produzidas por uma grande variedade de vegetais, apenas 30 são consumidas pelo homem, sendo que as leguminosas são suas principais fontes alimentares, assim como as espécies de *Curcuma* (FRANCIS; KEREM; MAKKAR, 2002).

A presença de saponinas foi confirmada com os testes para esteroides e triterpenoides, estruturas básicas das saponinas. Para a presença destes compostos, notou-se o surgimento de coloração verde ou azul após a reação de Liebrman-Burchard.

A presença das flavonas e flavonóis nos extratos aquoso e hidroalcoólico foram consideradas positivas, isto é, durante a reação as amostras apresentaram coloração amarela quando comparada com o extrato bruto.

A presença de antocianina foi positiva quando as amostras foram testadas nos pH ácido (3), alcalino (8,5 e 11) alterando a coloração vermelho, lilás a azul-purpura a cada faixa de pH respectivamente.

Antocianinas embora sejam acumuladas mais comumente nas flores e frutos, também podem ser encontradas nos caules e órgãos reprodutivos das plantas (DAS; GEUL; CHOI, 2011), como pode ser confirmada pela presença de antocianina nos rizomas da *C. zerumbet*.

• Testes Fitoquímicos Quantitativos

As análises quantitativas do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* estão expressos na Tabela 5. Observa-se que o extrato hidroalcoólico da *C. zerumbet* extraiu mais compostos fenólicos que o aquoso, $09,29 \pm 0,05$ e $05,81 \pm 0,09$, respectivamente, reafirmando a teoria de Oliveira e colaboradores (2001) na qual cita em seu trabalho que a extratores hidroalcoólico são mais eficientes do que aquoso.

A determinação de compostos fenólicos é de grande importância devido a relação destes com as qualidades sensoriais dos alimentos, como a cor, sabor e aroma (KIM et al., 2005).

Tabela 5: Média e desvio \pm padrão do teor de constituintes no extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma de *Curcuma zerumbet*.

Constituintes	Extratos	
	Aquoso	Hidroalcoólico
Compostos fenólicos totais (mg/100g)	05,81 \pm 0,09 ^b	09,29 \pm 0,05 ^a
Flavonoides (mg de quercetina/100g)	60,23 \pm 0,02 ^b	65,75 \pm 1,25 ^a
Antocianina (mg/100g)	13,49 \pm 1,25 ^b	18,56 \pm 0,05 ^a
Carotenoides totais (mg/100g)	05,42 \pm 0,07 ^b	12,67 \pm 1,03 ^a

Média e desvio-padrão; Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os flavonoides representam o maior grupo da família dos compostos fenólicos, e, para o extrato aquoso e hidroalcoólico da *C. zerumbet* esta classe de compostos apresentou conteúdo total de 60,23 mg \pm 0,02 e 65,75 mg \pm 1,25 respectivamente. Nas pesquisas de Singh e Gupta (2013) a quantidade de flavonoides determinada na *C. amada* foi 2,14 mg \pm 0,42, enquanto no *Zingiber officinale* 3,66 mg \pm 0,45 espécies da mesma família, mas com concentrações diferentes de flavonoides. Esta diferença é influenciada por vários fatores ambientais como: temperatura, solo e nutrição (MARQUES, 2011).

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e constituem o maior e o mais importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água (VOLP et al., 2008). Nos extratos analisados (Tabela 5), a maior concentração encontrada de antocianina foi no extrato hidroalcoólico com 18,56 mg \pm 0,05, enquanto que no extrato aquoso 13,49 mg \pm 1,25, este valor pode ser explicado pela possível degradação de antocianina durante o preparo do extrato aquoso por aplicar um processamento térmico de 15 min. (PASTRAS et al., 2010).

Estes compostos possuem grande importância devido a múltiplos efeitos biológicos, como diminuição da permeabilidade e fragilidade dos vasos sanguíneos, ação antiinflamatória, antiespasmódica, antioxidante, antiviral, antibacteriana e antitumoral (POZZI, 2007).

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pela cor alaranjada dos vegetais, compreendem grande número de compostos, muitos dos quais apresentam atividades biológicas de provitamina A (COSTA; ROSA, 2010). O extrato aquoso e hidroalcoólico analisados apresentaram 05,42 mg \pm 0,07 e 12,67 mg \pm

1,03 de carotenoides totais, respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada ao modo de preparo do extrato, no qual o extrato aquoso passou por um aumento de temperatura (± 20 °C) em seu preparo o que não ocorreu na preparação do extrato hidroalcoólico.

5.3. Análises Físico-químicas da Matéria-prima Vegetal

Os resultados da composição centesimal do rizoma da *C. zerumbet* seca e de seu extrato aquoso e hidroalcoólico estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Composição centesimal do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Constituintes	Extratos		
	Rizoma	Aquoso	Hidroalcoólico
Umidade (%)	7,55 \pm 0,06 ^a	5,60 \pm 0,09 ^b	5,8 \pm 0,80 ^b
Proteína (%)	6,91 \pm 0,04 ^a	10,55 \pm 1,02 ^b	11,75 \pm 0,98 ^b
Cinza (%)	13,02 \pm 0,08 ^a	14,44 \pm 1,05 ^b	12,99 \pm 1,23 ^a
Lipídeos (%)	2,65 \pm 1,03 ^a	2,53 \pm 0,08 ^a	2,84 \pm 0,50 ^a
Fibra (%)	12,98 \pm 0,08 ^a	12,70 \pm 0,50 ^a	10,8 \pm 1,06 ^b
Carboidrato (%)	69,89 ^a	66,88 ^a	66,62 ^a
*Valor calórico	331,05	332,49	339,04

*Valor expresso em Kcal/100g; Média e desvio-padrão; Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando os resultados das análises físico-químicas dos rizomas da *C. zerumbet* com outras curcumas percebe-se que alguns parâmetros ficaram próximos ao citado no trabalho de Rios, Duque e Leon (2009). Estes mesmo autores estudaram a *C. longa* em duas localidades diferentes, Quito e Venezuela, verificaram a concentração de umidade 6 a 9 % e fibras 7 a 11 %, respectivamente.

De acordo com os parâmetros para classificação de alimentos proposto por Harris e colaboradores (1968), os rizomas de *C. zerumbet* podem-se enquadrar como alimento energético. A energia nesse grupo de alimentos é representada por carboidratos de fácil aproveitamento pelo animal (açúcares e amido) e por lipídeos.

Destacam-se a porcentagem de proteínas contidas nos rizomas e no extrato aquoso e hidroalcoólico, valores próximos ao encontrado em grãos de arroz (8 %) e trigo (14 %) (SOUZA; STARKE; FERNANDES, 1993).

Podemos observar que o rizoma, o extrato aquoso e o hidroalcoólico apresentaram os seguintes teores de fibra bruta: $12,98 \pm 0,08$, $12,70 \pm 0,50$ e $10,80 \pm 1,06$ % respectivamente, com diferença significativa apenas para o extrato hidroalcoólico.

Nas pesquisas de Kumar e colaboradores (2013) os rizomas de *C. longa* apresentaram um teor de fibra de 9 %, próximo ao encontrado neste trabalho. Estes resultados mostram que o extrato aquoso e hidroalcoólico são importantes em relação à quantidade de fibra alimentar, pois um alimento com teor de 2 a 3 % pode ser considerado uma boa fonte de fibra alimentar. Segundo o regulamento técnico, referente à informação nutricional complementar (Resolução Nº 54), com o dobro deste conteúdo, pode ser tratado como alimento de elevado teor de fibra alimentar (BRASIL, 2012).

O teor de carboidrato encontrado no rizoma, no extrato aquoso e hidroalcoólico não apresentam diferença estatística significativa de 69,89, 66,88 e 66,62 % respectivamente, e independente da extração não alterou a concentração. De acordo com a ANVISA, um suplemento alimentar deve possuir a concentração de carboidratos abaixo de 90% (BRASIL, 2012).

As análises de minerais expressas na Tabela 7 indicam que os elementos importantes para a nutrição detectadas no rizoma da *C. zerumbet*, coletada no Careiro, estão em nível aceitável para o consumo humano.

Tabela 7: Concentração de microminerais e macrominerais do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

	Fe	Zn	Mn	P	K	Ca	Mg
Rizoma C.Z	31,2	5,9	3,6	1,43	28,73	2,34	2,76

Valores expressos em mg/100g

Nas pesquisas de Srivastava e colaboradores (2011), estudando a *C. zedoaria* detectaram a presença de Zn e Mn, 12,55 e 8,45 respectivamente, diferentes ao encontrado por esta pesquisa. Estas concentrações de minerais podem variar, dependendo de muitos fatores, como a espécie da planta, genótipo, condição de crescimento, diferentes órgãos e tecidos (RAZI; ONJIA; POTKONJAK, 2005).

5.4. Determinação da Atividade de Água

A atividade da água (a_w) refere-se a medição da concentração de solutos em água e seus efeitos sobre atividade química da água. O valor da a_w indica o nível de água em sua forma livre nos materiais e é expresso na escala de 0 a 1 a_w (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A importância da atividade de água está na sua relação com a conservação dos alimentos. Sendo a variação da pressão de vapor da água pela interação com os componentes de um alimento um indicador da quantidade da água ligada, os valores de A_w mostram quais as chances tem o alimento de se deteriorar (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Os resultados da atividade de água (a_w) para o extrato aquoso e hidroalcoólico, 0,53 e 0,63 respectivamente. De acordo com Bobbio (2001) estes valores são mais estáveis microbiologicamente, pois representam a mínima possibilidade de crescimento bacteriano segundo estudo realizado por Chiste e colaboradores (2007), pois se encontram entre as faixas de a_w 0,40 – 0,80.

Estes resultados demonstram que o extrato aquoso e hidroalcoólico podem ser utilizados em diversos alimentos sem a preocupação da deteriorização por microrganismos.

5.5. Determinação da Cor

A Tabela 8 apresenta os resultados da determinação da cor do extrato aquoso e hidroalcoólico secos apresentaram coordenadas de cromaticidade com tendência ao verde (-a*) e amarelo (+b*). O valor médio de luminosidade (L*) foi de $35,45 \pm 0,45$ e $36,82 \pm 0,74$, respectivamente.

Tabela 8: Colorimetria do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Extrato	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
Aquoso	35,97	-1,38	9,65	-74,74	+2,79	-6,14	75,05
	35,33	-1,27	9,42	-75,38	+2,90	-6,37	75,11
Hidroalcoólico	36,29	-0,34	11,29	-74,42	+3,83	-4,50	74,66
	37,34	-0,34	10,83	-73,37	+3,83	-4,83	73,64

Estes resultados sugerem que, embora haja leve tonalidade verde, o croma amarelo para o extrato aquoso e hidroalcoólico foi superior sendo que baixos valores de L* indicam um extrato mais escuro. Não há valores de referência máximos ou mínimos para a cor desenvolvida pelos extratos, por isso, ela é fortemente dependente do modo do processo tecnológico de produção.

5.6. Análise Térmica dos Extratos

A seguir são demonstrados os resultados obtidos das Técnicas de Análise Térmica Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Térmica Diferencial (DTA) sob atmosfera de ar sintético na taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, com fluxo de gás de 50 mL. min^{-1} em um intervalo de temperatura de análise de 30 a 300 $^\circ\text{C}$ do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*.

Pode-se observar (**Figura 21**) na curva TG a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ que o extrato aquoso da *C. zerumbet* apresenta o início de uma primeira etapa de decomposição em aproximadamente $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que pode ser atribuído à desidratação do composto. Também é observada uma etapa de perda de massa orgânica com início por volta dos $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O composto mostra uma perda de massa relativamente alta no intervalo de temperatura estudado, em torno de 55 %.

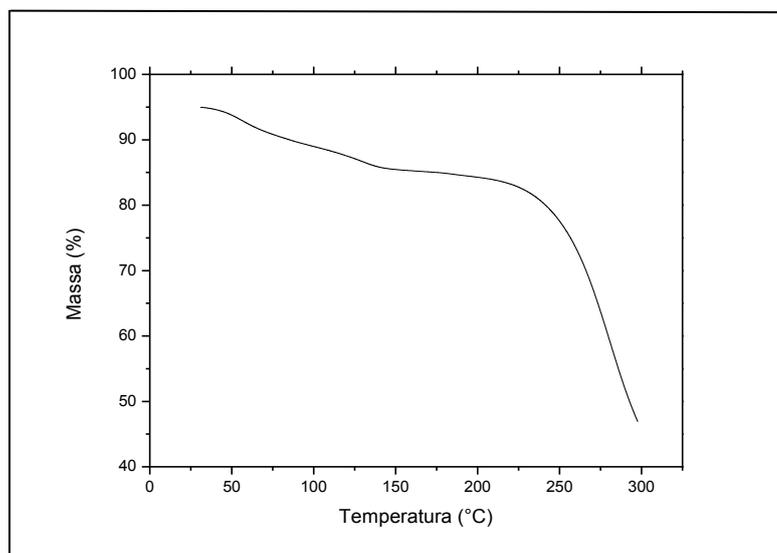


Figura 21: Curva TG do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Na curva DSC (**Figura 22**), observa-se um pico endotérmico por volta dos $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, o qual pode ser atribuído a desidratação do composto. Após a temperatura de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ verifica-se um desvio da linha base.

Policegoudra e Aradhya (2008) estudando as curvas de DSC dos rizomas de curcuma verificou que estas variaram de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a *Curcuma longa*, $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ a *Curcuma zedoaria* e 79 % a *Curcuma manga* não possuindo um parâmetro para comparação. De acordo com seus estudos esta análise é influenciada pelo peso molecular e estrutura das amilopectinas presentes nos rizomas das espécies.

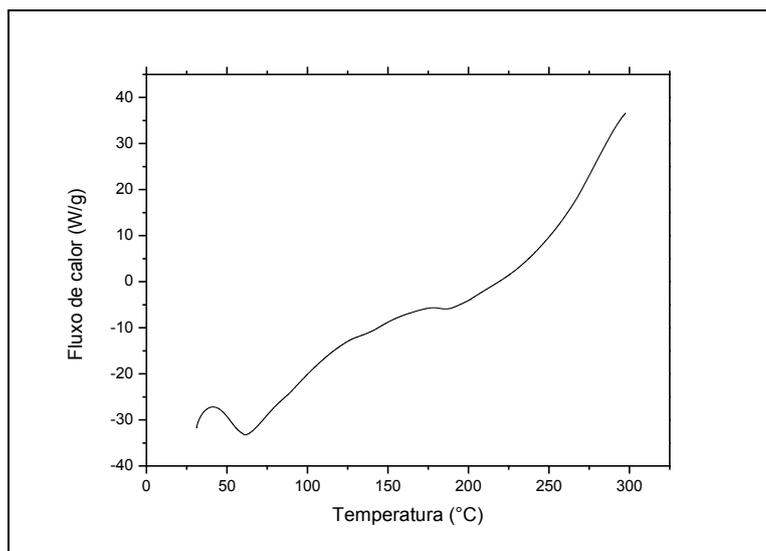


Figura 22: Curva DSC do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Na curva DTA (**Figura 23**) verifica-se o mesmo pequeno pico endotérmico observado na curva DSC a cerca dos $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ que se constata que é devido à etapa de desidratação.

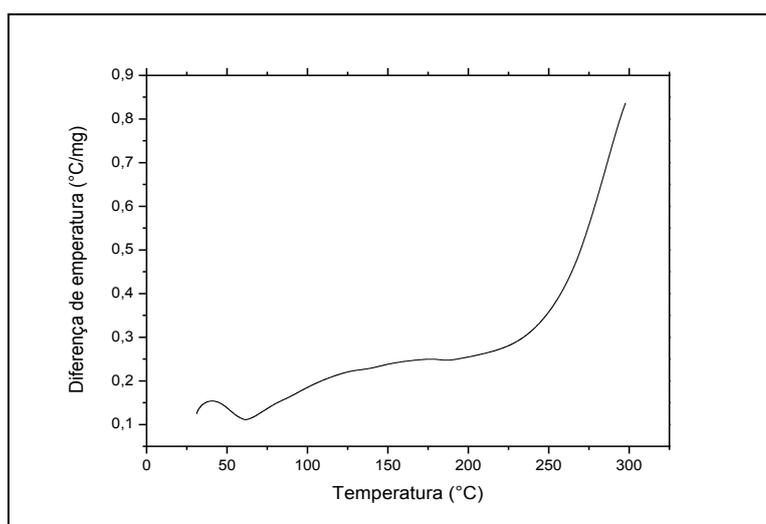


Figura 23: Curva DTA do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Na curva TG/DTA (**Figura 24**) as etapas de decomposição não estão bem definidas, mesmo assim notam-se duas etapas de decomposição diferentes, porém uma próxima da outra. A primeira etapa ocorre até aproximadamente 70 °C e tem uma perda inicial pequena de massa, em torno de 5 %, o que provavelmente se deve a água adsorvida do ambiente. A segunda etapa inicia-se próximo aos 165 °C, inicialmente perdendo pouca massa. Entretanto por volta dos 215 °C a perda de massa torna-se brusca, o que pode demonstrar a decomposição de matéria orgânica. A amostra perde ao todo aproximadamente 67 % de massa até a temperatura analisada (300 °C).

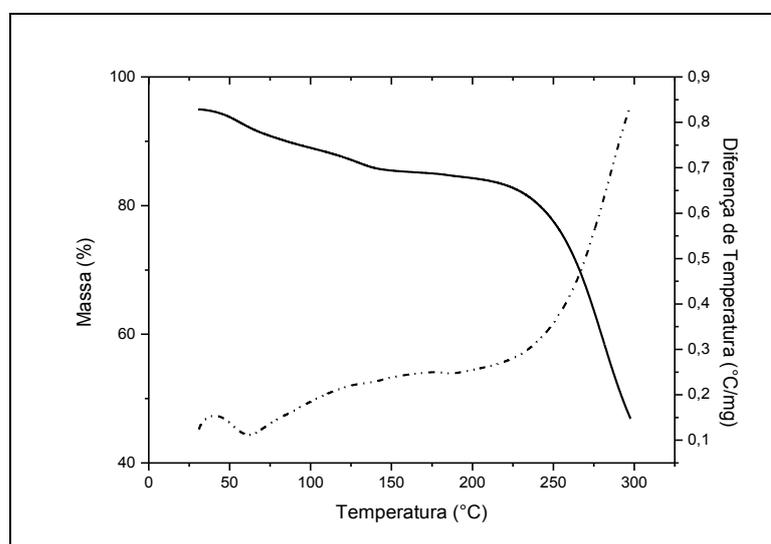


Figura 24: Curvas TG/DTA do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Observa-se a partir destas curvas que o extrato aquoso perde massa brusca com temperaturas acima de 200 °C, não sendo interessante para o aproveitamento de alimentos no qual passam por processos altos de temperatura.

Percebe-se na Figura 25, que o extrato hidroalcoólico na curva TG, apresenta o início da primeira desidratação em aproximadamente 50 °C. A partir de aproximadamente 225 °C houve uma perda de massa orgânica.

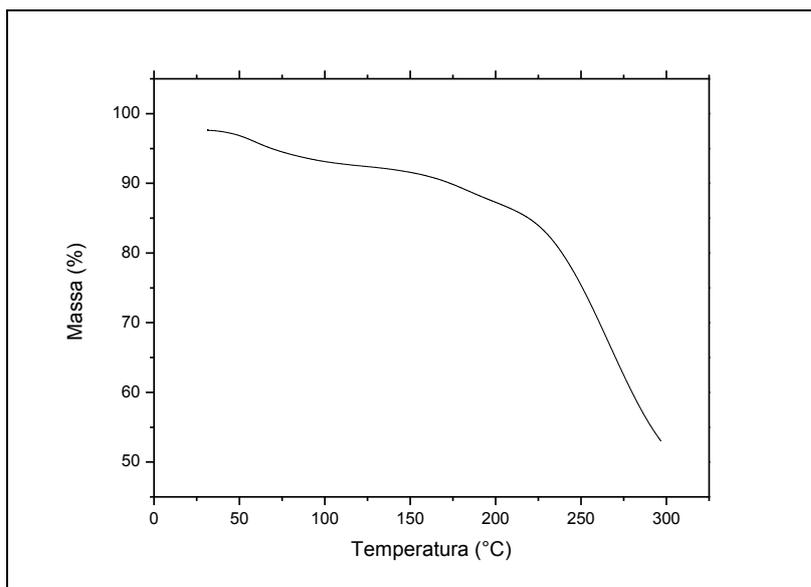


Figura 25: Curva TG do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet* obtido sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

A curva DSC (**Figura 26**) mostra um pico endotérmico por volta dos $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, o qual pode ser atribuído a perda de água adsorvida pelo composto. Por volta dos $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ nota-se outro pico endotérmico devido a decomposição orgânica.

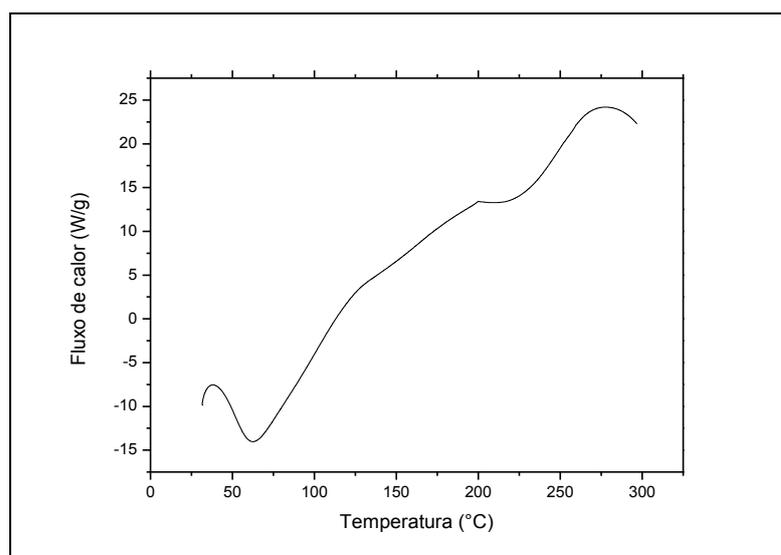


Figura 26: Curva DSC do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Na curva DTA (**Figura 27**) verifica-se o mesmo pico endotérmico da curva DSC a cerca dos 60 °C, seguido por outro pico endotérmico de maior tamanho, devido a segunda etapa de decomposição ser maior.

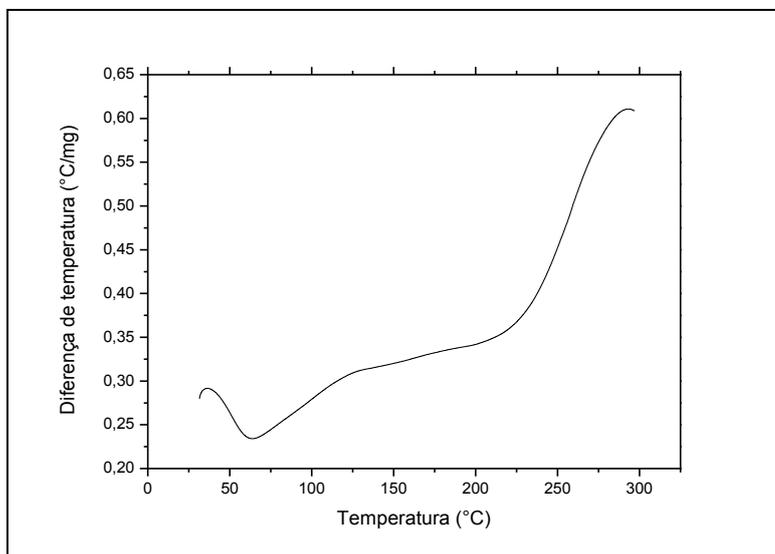


Figura 27: Curva DTA do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Na curva TG/DTA (**Figura 28**) as etapas de decomposição não estão bem definidas. Entretanto, por volta de 210 °C a perda de massa torna-se brusca com 62 %, o que demonstra a decomposição de matéria orgânica.

Esta análise demonstra que extrato hidroalcoólico não pode ser adicionado em alimentos com preparação a altas temperaturas (210 °C), pois esta interfere na perda de massa e conseqüentemente na desnaturação de biomoléculas.

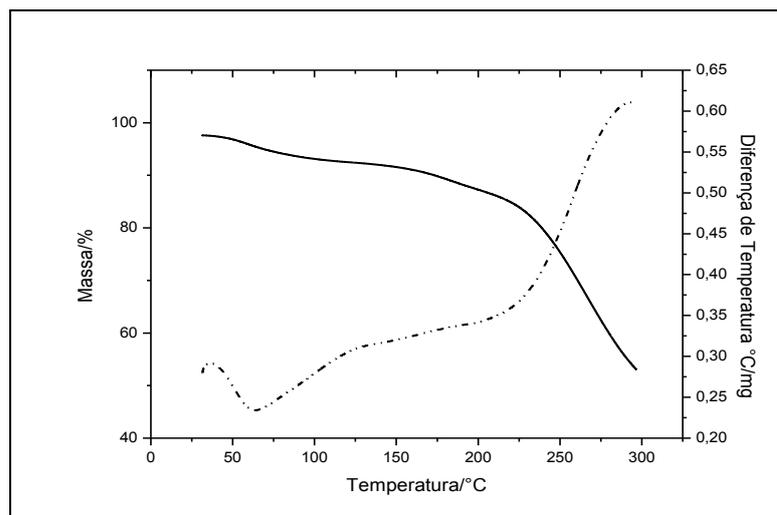


Figura 28: Curva TG/DTA do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet* obtida sob atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

5.7. Análises Microbiológicas dos Extratos

As análises microbiológicas são indispensáveis para garantir a qualidade dos extratos utilizados neste trabalho. Em geral, os materiais vegetais contêm um grande número de fungos e bactérias pertencentes a sua microbiota natural ou que são introduzidos durante a sua manipulação, e esta contaminação pode ser intensificada com o tempo e não comprometer somente o material em si, mas também o usuário (MIGLIATO et al., 2007).

Os resultados obtidos do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma de *C. zerumbet* (**Tabela 9**) permitiram observar que não houve crescimento microbiano para cepas consideradas patogênicas: *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, Mesófilos, Coliformes fecais e totais, Bolores e leveduras.

Tabela 9: Análise microbiológica dos extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet* utilizada nos ensaios farmacológicos.

Microorganismos	Extratos	
	Aquoso	Hidroalcoólico
Coliforme total	0,0 NMP/g	0,0 NMP/g
Coliforme fecal	0,0 NMP/g	0,0 NMP/g
Mesófilos	$4 \cdot 10^4$ UFC/g	$8 \cdot 10^4$ UFC/g
Bolores e Leveduras	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>Stafilococcus aureus</i>	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência	Ausência

O crescimento de fungos e bactérias esteve dentro dos limites permitidos (10^3 UFC/g e 10^5 UFC/g, respectivamente) para extratos vegetais (WHO, 1998). Na contagem do número total de fungos e bactérias, houve crescimento inferior a 10 UFC/g.

O resultado de bactérias do grupo dos coliformes é importante pela sua relação com a higiene durante a produção dos extratos. Estes dados mostraram que durante o processamento dos extratos houve a Boa Prática de Manipulação.

5.8. Análises Biológicas e Farmacológicas dos Extratos

5.8.1. Toxicidade Frente à *Artemia salina*

Os resultados do teste de toxicidade frente à *Artemia Salina* foram expressos em DL_{50} , ou seja, a dose capaz de levar a morte 50 % dos organismos testados. Em todos os tratamentos o controle apresentou índice de sobrevivência 100 %. Este resultado foi também apresentado no extrato aquoso e hidroalcoólico nas

concentrações 1000, 500, 250, 125, 50 e 25 µg/mL, respectivamente conforme a Tabela 10.

Tabela 10: Citotoxicidade em larvas de *Artemia salina* dos extratos do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

GRUPOS	Nº DE LARVAS	VEÍCULO	EXTRATO	CONCENTRAÇÕES (µg/mL)	MORTALIDADE %
01	90	DMSO	H ₂ OEtOH	1000	Não apresentou
				500	
				250	
				125	
				50	
				25	
02	90	Solução Salina 3,5 %	H ₂ O	1000	Não apresentou
				500	
				250	
				125	
				50	
				25	
Controle	90	DMSO	H ₂ OEtOH	Sem extrato	Não apresentou
Controle	90	Solução Salina 3,5 %	H ₂ O	Sem extrato	Não apresentou

A ausência de citotoxicidade dos extratos no teste de letalidade contra *Artemia salina* é um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade de extratos empregando-se outros modelos se fazem necessário, para determinar a quantidade tóxica e efeitos colaterais em logo prazo.

5.8.2. Avaliação Comportamental e Sistêmica - Atividade Exploratória

O teste de campo aberto tem como objetivo estudar a ação do sistema dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico no comportamento emocional e exploratório. Sendo utilizado como ferramenta de avaliação da ação de substâncias

que podem atuar sobre esses sistemas neurotransmissores promovendo alterações motoras e emocionais (GHIDINI et al., 2007).

Os camundongos tratados pela via intraperitoneal com o extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg, apresentaram uma pequena perda na coordenação motora nas doses iniciais (10 e 100 mg/Kg) e a dose de 1000 mg/Kg os animais se mostraram mais ansiosos e atentos. Algumas pesquisas sugerem que a dopamina seria um dos neurotransmissores responsável pelas modificações motoras observada neste experimento (BLECHARK et al., 2009).

Os animais apresentaram parâmetros toxicológicos em comum como (**Tabela 11**): aumento da frequência respiratória, aumento da frequência cardíaca, contorção abdominal e coçaram o focinho. Com a dose 1000 mg/Kg os animais começaram a lamber as patas (grooming); estas alterações podem ser decorrentes da ativação do sistema nervoso simpático através do extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet*. Após 15 min. das aplicações, os animais se recuperaram desaparecendo os efeitos observados.

Tabela 11: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via intraperitoneal do extrato aquoso do rizoma de *Curcuma zerumbet*.

Tratamentos	Peso (g)	Via	Veículo	Doses (mg/Kg)	Parâmetros Observados
Basal	16-24	i.p.	Salina 0,9 %	-	coçar focinho, contorção abdominal, ↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca.
CzA	16-24	i.p.	Salina 0,9 %	10	↑freq. respiratória, contorção abdominal, ↑freq. cardíaca, coçar focinho.
CzA	16-24	i.p.	Salina 0,9 %	100	↑freq. respiratória, contorção abdominal, ↑freq. cardíaca, coçar focinho.
CzA	16-24	i.p.	Salina 0,9 %	1000	↑freq. respiratória, contorção abdominal, ↑freq. cardíaca, coçar focinho, lamber as patas.

CzA= extrato aquoso do rizoma de *C.zerumbet*. i.p.= via intraperitoneal.

Os camundongos tratados com o extrato aquoso da *C. zerumbet* por via oral apresentaram os mesmos sintomas na coordenação motora quando comparados com o tratamento por via intraperitoneal.

Os parâmetros toxicológicos (**Tabela 12**) observados após aplicação do extrato por via oral nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg foram os mesmos para os

animais controle. Nas doses de 2000 e 5000 mg/Kg, por um período de 15 min., apresentaram os mesmos sintomas observado por via intraperitoneal, apresentando estado ansiogênico.

Tabela 12: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via oral do extrato aquoso do rizoma de *Curcuma zerumbet*.

Tratamentos	Peso (g)	Via	Veículo	Doses (mg/Kg)	Parâmetros Observados
Basal	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	-	coçar focinho, contorção abdominal.
CzA	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	10	contorção abdominal, coçar focinho.
CzA	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	100	contorção abdominal, coçar focinho.
CzA	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	1000	contorção abdominal, coçar focinho, lambe as patas.
CzA	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	2000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, lambe as patas.
CzA	16-24	v.o.	Salina 0,9 %	5000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, lambe as patas.

CzA= extrato aquoso do rizoma de *C.zerumbet*. v.o.= via oral.

Os resultados apresentados para o extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* nas doses analisadas (10, 100, 1000, 2000, 5000) demonstra que este provavelmente não possui efeito tóxico, não ocorrendo à morte dos animais no período de 15 dias.

No entanto, o extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* atenua a ansiedade por diminuir o funcionamento de sistemas neurais que integram comportamentos de defesa contra ameaça, o sistema serotoninérgico, que comanda a inibição comportamental.

Os camundongos tratados pela via intraperitoneal com o extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* nas doses de 10, 100 e 1000 mg/Kg, não causou perda na

coordenação motora, entretanto, a dose de 1000 mg/Kg os animais apresentaram comportamento ansiogênico.

Os animais apresentaram parâmetros (**Tabela 13**) como: aumento da frequência respiratória, aumento da frequência cardíaca, contorção abdominal, coçaram o focinho e com a dose mais alta os animais começaram a lamber as patas, sendo que estes parâmetros não foram observados depois de 15 min. de análise. Estes efeitos não foram os mesmos quando comparados com o grupo controle, pois, estes animais apenas apresentaram contorções abdominais e coceira no focinho.

Tabela 13: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via intraperitoneal do extrato hidroalcoólico do rizoma de *Curcuma zerumbet*.

Tratamentos	Peso (g)	Via	Veículo	Doses (mg/Kg)	Parâmetros Observados
Basal	18-22	i.p.	Salina/tween 20	-	coçar focinho, contorção abdominal
CzH	18-22	i.p.	Salina/tween 20	10	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho.
CzH	18-22	i.p.	Salina/tween 20	100	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho.
CzH	18-22	i.p.	Salina/tween 20	1000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, lamber as patas.

CzH= extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*. i.p.= via intraperitoneal.

Os animais tratados por via oral com o extrato hidroalcoólico apresentaram perda na locomoção motora e ficaram deprimidos por um período de 30 min., este efeito foi proporcional as doses mais elevadas.

Os parâmetros observados (**Tabela 14**) demonstram que os efeitos foram parecidos com o animal do grupo controle, não ocorrendo morte durante 15 dias de experimento.

Tabela 14: Parâmetros toxicológicos em camundongos após aplicação por via oral do extrato hidroalcoólico do rizoma de *Curcuma zerumbet*.

Tratamentos	Peso (g)	Via	Veículo	Doses (mg/Kg)	Parâmetros Observados
Basal	18-22	v.o	Salina/tween 20	-	coçar focinho, contorção abdominal.
CzH	18-22	v.o.	Salina/tween 20	10	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho.
CzH	18-22	v.o.	Salina/tween 20	100	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho.
CzH	18-22	v.o.	Salina/tween 20	1000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, lambar as patas.
CzH	18-22	v.o.	Salina/tween 20	2000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, piloereção.
CzH	18-22	v.o.	Salina/tween 20	5000	↑freq. respiratória, ↑freq. cardíaca, contorção abdominal, coçar focinho, lambar as patas, piloereção.

CzH= extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*. v.o. = Via oral.

Quando analisados os comportamentos de latência e locomoção não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais que receberam o extrato aquoso e hidroalcoólico independente da via de aplicação ($P>0,05$, ANOVA).

A análise do reflexo de auto-limpeza mostrou diferença estatística significativa entre os animais do grupo controle ($13,44\pm 1,88$) e do extrato aquoso ($22,33\pm 1,32$), hidroalcoólico ($25,50\pm 1,75$), independentemente de dose ($P<0,05$, ANOVA).

A sensibilização comportamental é caracterizada principalmente pelo aumento gradual da atividade locomotora, embora este parâmetro não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos, à alteração do grooming pode ser indicativo de sensibilização aos extratos de *C. zerumbet*.

No extrato aquoso e hidroalcoólico da *C. zerumbet* foi detectado a presença de curcuminoides: curcumina e dimetoxicurcumina, estes podem alterar e influenciar a atividade no cérebro e, conseqüentemente, alterar a concentração dos neurotransmissores noradrenalina, dopamina, serotonina e seus metabólitos no sistema nervoso central (KULKARNI et al., 2008; BHUTANI et al., 2009), como foi observado no experimento.

5.8.3. Análise Toxicidade Subaguda dos Extratos

A avaliação de toxicidade subaguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos, em altas doses, especialmente injúrias anatomopatológicas e letalidade, e podem oferecer contribuição para estabelecer parâmetros de segurança – juntamente com outros dados de toxicidade – para a saúde humana (ZATTA et al., 2009).

Quanto aos vegetais, este método é útil para identificar a toxicidade que o mesmo possa apresentar e com isto minimizar o equívoco da população em acreditar que produtos naturais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos (SILVEIRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009). Na Tabela 15, estão expressos os resultados dos parâmetros bioquímicos após aplicação dos extratos por um período de 28 dias de experimento.

Tabela 15: Parâmetros bioquímicos dos ratos Wistar após aplicação por via oral do extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* durante 28 dias de tratamento.

Parâmetros	Grupos						
	1	2	3	4	5	6	7
Glicose (mg/dL)	118±2,5	117±1,5	120±1,5	121±1,4	115±2,8	119±2,4	122±1,6
Colesterol (mg/dL)	88 ±2,7	86±1,8	88±2,4	90±2,5	83±1,9	92±3,6	93±2,5
Triglicerídeos (mg/dL)	79±2,3	76±1,4	79±1,3	82,9±2,7	75±1,5	78±1,2	86±1,3*
Ureia (mg/dL)	37±4,4	45±2,4	40±2,0	46±1,5*	39±2,3	43±1,7	46±1,8*
Albumina (g/dL)	3,8±1,0	3,1±1,7	3,2±2,8	3,3±1,9	3,3±1,7	3,2±1,8	3,2±1,5
Ácido Úrico (mg/dL)	1,2±1,8	1,5±2,7	0,9±1,5	1,3±1,6	2,3±1,3	1,2±1,8	1,1±2,8
TGP/ALT (U/L)	49±4,3	44±3,6	51±2,0	56±1,5	48±2,6	51±2,6	57±2,9
TGO/AST (U/L)	134±5,0	133±2,5	138±1,3	140±3,6	126±1,8	139±2,7	142±1,4

1 (controle); 2 (Dose de 100 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 3 (Dose de 1000 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 4 (Dose de 5000 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 5 (Dose de 100 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); 6 (Dose de 1000 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); 7 (Dose de 5000 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); Valores expressos em média ± D.P.

Observa-se na Tabela 15 que os grupos em estudo não diferiram significativamente para colesterol total, no entanto, para triacilgliceróis foi significativo para o extrato hidroalcoólico na dose de 5000 mg/Kg. Este resultado pode estar relacionado tanto com a concentração do extrato hidroalcoólico quanto com a alimentação dos animais, pois esta não foi controlada.

O rim é um órgão sensível, cuja função pode ser afetada por um número de fatores, tais como medicamentos de origem vegetal que conduzem à falha renal (OLSON et AL., 2000). Avaliação dos possíveis danos renais devido aos extratos do rizoma da *C. zerumbet* foi realizada com a dosagem de ureia (**Tabela 15**) (SAIDU et AL., 2007). Segundo González e Schiffer (2003) a ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do metabolismo de aminoácidos.

Fatores renais (pré renal, renal e pós-renal) e extra renais (ingestão de proteínas) podem interferir no aumento de concentração sérica de ureia. Sendo assim, este aumento nos níveis de ureia nos animais que consumiram maiores doses dos extratos, tanto no aquoso quanto no hidroalcoólico, pode ser sugerido por fatores extras renais como a ingestão de proteína na dieta pelos animais, já que a ureia é o principal produto final do catabolismo proteico.

A albumina plasmática é boa indicadora do estado nutricional e, neste caso, os valores obtidos nesta pesquisa apresentam-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie em estudo. Conforme a literatura, ratos sadios possuem teor de albumina na faixa de 3,4 a 4,3 g dL⁻¹ (SOUZA-SOARES *et al.*, 2009).

Não houve efeito sobre os níveis de AST e ALT, que são considerados indicadores sensíveis de dano hepatocelular e dentro de limites pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos ao fígado (Al-HABORI et al., 2002)

É possível deduzir, por conseguinte, que o extrato aquoso e hidroalcoólico não provocaram qualquer dano aos rins ou fígado.

A avaliação sanguínea é um importante indicador da fisiologia e patologia nos homens e animais e seus valores podem ser alterados pela ingestão de plantas tóxicas (VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007).

Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido, causando hemodiluição. Já uma contagem diminuída de plaquetas (trombocitopenia) pode resultar de uma série de situações patológicas, como a destruição aumentada dessas células, devido ao uso de certas drogas, a desordens imunes, a coagulação vascular disseminada e

até lesões mecânicas (DOGAN; TURKOGLU, 2008). O diferencial de leucócitos é usado para avaliar a distribuição e a morfologia dos glóbulos brancos, fornecendo informações mais específicas sobre o sistema imune do que a contagem de leucócitos isoladamente (FAILACE, 2009).

Os parâmetros hematológicos foram mensurados nesse estudo após 28 dias de administração dos extratos. Os animais tratados não registraram diminuições significativas dos níveis de hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas (**Tabela 16**) e da contagem diferencial das células brancas e dos linfócitos, quando comparados ao controle.

Tabela 16: Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar após aplicação por via oral dos extrato aquoso e hidroalcoólico durante 28 dias de experimento.

Parâmetros	Grupos						
	1	2	3	4	5	6	7
Leu. ($10^3/\mu\text{L}$)	8,8±2,5	8,2±1,9	7,0±2,7	5,3±2,9	9,4±1,4	9,4±1,5	9,5±1,5
Hem. ($10^6/\mu\text{L}$)	6,3±1,6	5,8±2,6	5,9±1,3	5,6±1,5	6,4±1,4	6,1±1,6	5,9±1,3
Hemo. (g/dL)	13,9±1,5	13,3±2,2	13,9±2,0	12,7±1,3	14,6±2,0	14,3±2,0	13,6±1,6
Hema. (%)	37,7±1,5	37,1±1,9	38±2,0	35,9±2,1	40,6±1,7	39,5±2,4	38,4±1,4
V.C.M. (f)	59±2,5	63,8±1,7	63±1,3	63,2±1,6	63,4±2,3	62,5±1,9	63,7±1,6
H.C.M. (pg)	21,7±1,9	22,8±2,3	23,3±2,4	22,3±1,7	22,8±1,4	23,3±1,6	22,9±2,0
C.H.C.M.(g/dL)	36,8±1,6	35,8±1,9	36,5±1,4	35,3±1,6	35,9±1,7	36,2±1,8	35,4±1,4
R.D.W. (%)	12,1±2,0	13±1,3	12,9±1,6	13,6±2,0	12,7±1,4	12,6±1,5	13,9±1,6
Plaq. ($10^3/\mu\text{L}$)	899±1,5	711±1,5	722±1,5	773±1,4	723±1,5	669±1,5	906±1,5
Neu. (%)	11,4±2,3	12±2,6	12,1±1,7	14±1,4	13±0,3	12±0,7	11,9±1,4
Linf. (%)	81,2±1,7	77,0±2,2	80,7±1,9	77±1,4	77±0,8	76±1,5	82,2±2,7
Mon.(%)	6,5±1,3	3±1,1	7,0±1,4	5±2,3	5±1,6	5±1,7	3,3±1,5
Eus. (%)	0,6±0,6	1±0,5	0,0±0,2	0,1±1,5	0,0±1,0	0,1±2,0	0,4±2,4
Bas.	0,3±0,4	0,0±1,0	0,2±0,1	0,0±1,2	0,0±0,2	0,0±1,7	0,2±1,7

1 (controle); 2 (Dose de 100 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 2 (Dose de 1000 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 3 (Dose de 5000 mg/Km do extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*); 4 (Dose de 100 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); 5 (Dose de 1000 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); 6 (Dose de 5000 mg/Km do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C.zerumbet*); Valores expressos em média ± D.P.

Nas administrações das doses testadas do extrato aquoso e hidroalcoólico não foi observado mortalidade (não sendo possível a determinação da DL_{50}), sugerindo o não envolvimento do sistema nervoso central e autônomo (ALMEIDA, 2006).

Nos hábitos diários (consumo de ração e produção de fezes) não houve variação significativa entre os grupos tratados com o extrato aquoso e hidroalcoólico e o grupo controle. No entanto, houve alteração no parâmetro peso corporal, quando comparado com o controle. O peso médio observado dos animais tratados com o extrato aquoso nas doses de 100, 1000 e 5000 mg/Kg aumentaram de $155 \pm 5,8$ para $363 \pm 7,8$; $166 \pm 8,4$ para $370 \pm 7,5$ e $166 \pm 6,9$ para $350 \pm 8,7$ respectivamente; enquanto o controle de $145 \pm 5,7$ para $241 \pm 6,5$, apresentando diferença estatística a partir do 07 dia de aplicação (**Figura 29**).

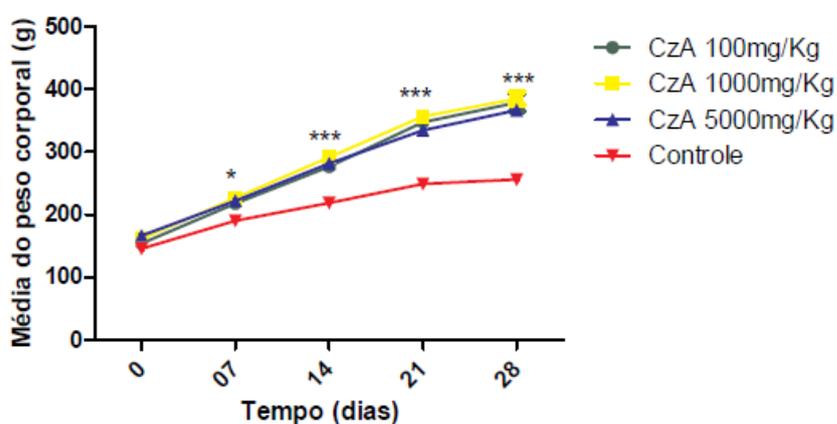


Figura 29: Avaliação dos pesos dos animais ocorridos durante 28 dias de tratamento por via oral do extrato aquoso da *Curcuma zerumbet*.

Enquanto, o peso médio dos animais observados no experimento com o extrato hidroalcoólico aumentou de $147 \pm 8,9$ para $366 \pm 7,8$ na dose de 100 mg/Kg; $144 \pm 8,8$ para $345 \pm 9,8$ na dose de 1000 mg/Kg e $171 \pm 7,0$ para $252 \pm 7,8$ na dose de 5000 mg/Kg. Estes resultados podem estar relacionados com a quantidade de proteína e carboidrato presentes nos extratos. Observa-se na Figura 30, que os animais apresentaram diferença de peso significativa a partir do 14^a dia de aplicação quando comparado ao controle para as doses de 100 e 1000 mg/Kg.

Os animais avaliados com a dose de 5000 mg/Kg apresentaram nas primeiras semanas do experimento um peso constante. Após o 14^a dia apresentou o mesmo ganho de peso quando comparado aos animais controle.

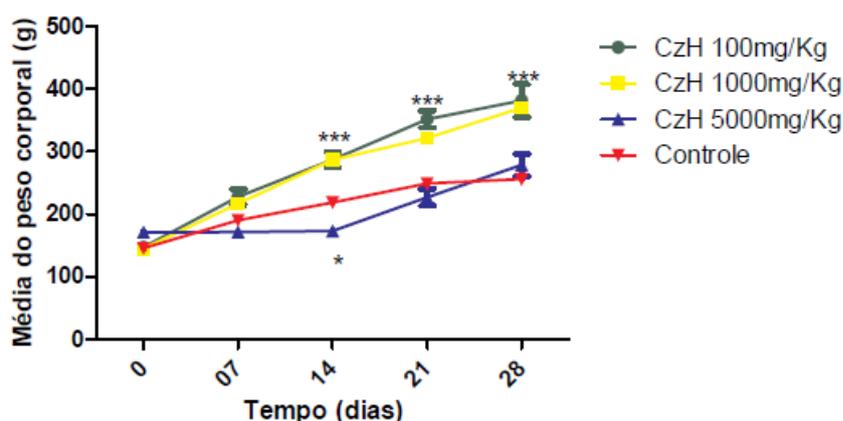


Figura 30: Avaliação dos pesos dos animais ocorridos durante 28 dias de tratamento por via oral do extrato hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet*.

Sabe-se, que a toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração, sendo tais sinais importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância ou extrato, pois fornece informações sobre o estado geral de saúde dos animais (VALADARES, 2006).

Os órgãos analisados macroscopicamente e pesados, não apresentaram diferença estatísticas entre os grupos controle e das doses experimentais. Assim, nenhuma evidência de toxicidade foi encontrada nos extratos testados da *C. zerumbet*.

5.8.4. Atividade Antiúlcera dos Extratos - Lesão Gástrica Induzida por Etanol

O tratamento farmacológico para úlceras gástricas está relacionado com a utilização de medicamentos que diminuem a secreção ácida e/ou a neutralização do ácido e/ou a potencialização dos mecanismos de proteção da mucosa (citoprotetores) (RANG et al., 2007). Os inibidores da bomba de prótons são utilizados mais comumente, seguidos pelos antagonistas dos receptores H₂ (GOODMAN; GILMAN, 2007).

A Ranitidina, utilizada como fármaco para o controle positivo, inibe a produção ácida por competir de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores H_2 na membrana basolateral das células parietais (YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Os dados dos resultados (**Figura 31**) demonstram que o extrato inibiu a ulceração gástrica, sugerindo a mesma ação farmacológica do controle testado.

A atividade antiúlcera do extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet*, apresentou inibição dose dependente da ulceração, a dose de 50 mg/Kg inibiu 57 % e a dose de 2000 mg/Kg inibiu 90 % a formação de úlceras nos animais testados.

Os resultados quando comparados estatisticamente com a Ranitidina, observa-se que apresentaram efeitos significativos ($p < 0,01$ e $< 0,001$) (**Figura 31**), nas doses testadas e administradas por via oral nos animais experimentais.

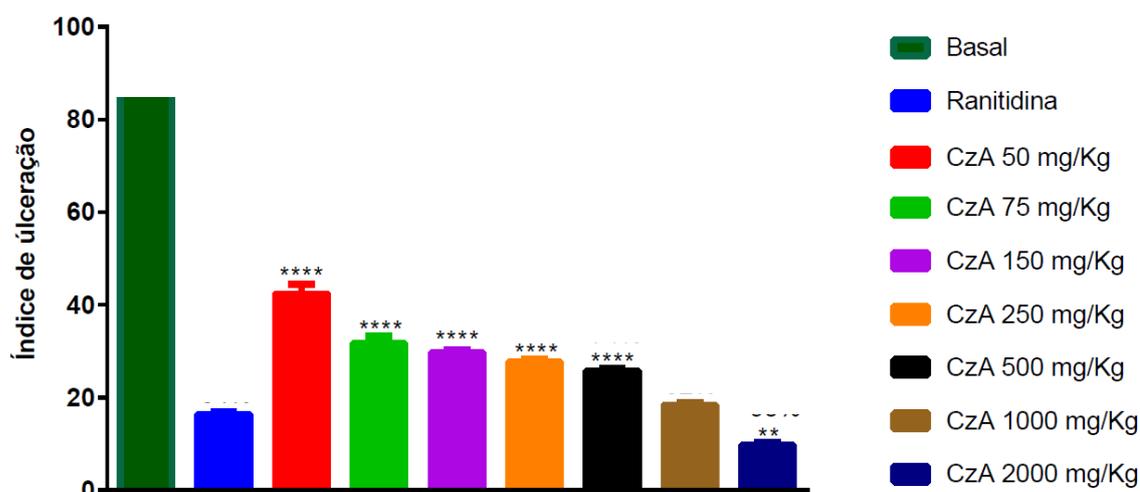


Figura 31: Atividade antiúlcera do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*, administrado via oral em relação à ulceração induzida por etanol em camundongos.

A atividade antiúlcera do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*, apresentou efeito a partir da dose de 50 mg/Kg com inibição de ulceração gástrica 80 %. As doses de 50 e 75 mg/Kg mostraram-se significativas ($p < 0,01$ e $< 0,001$) quando comparada a Ranitidina, controle positivo, utilizada como fármaco (**Figura 32**).

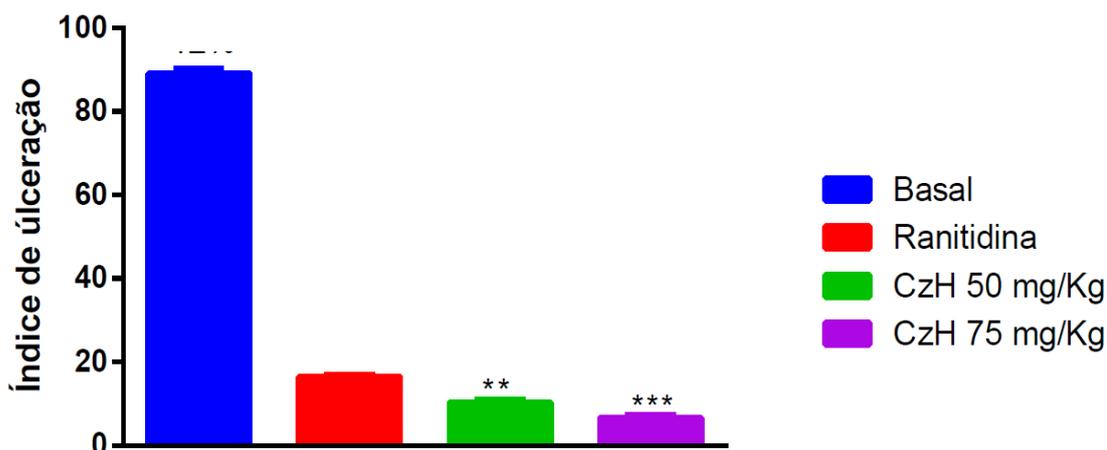


Figura 32: Atividade antiúlcera do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* administrado via oral em relação à ulceração induzida por etanol em camundongos.

O efeito ulcerogênico do etanol na mucosa gástrica é reportado como sua ação necrotizante sobre a mucosa. Segundo Rocha e colaboradores (2011), o etanol quando administrado em altas concentrações causa danos cáusticos, que possibilitam que as lesões penetrem profundamente no plexo vascular ocasionando estase, ruptura da parede dos vasos sanguíneos, favorecendo hemorragia e necrose da mucosa. Szabo e Brown (1987) atribuíram ao etanol a capacidade de dissolução dos constituintes do muco gástrico, o que por sua vez, provoca a perda da função de barreira protetora, permitindo a origem de lesões e mudanças na diferença de potencial celular causada por uma retro-difusão de íons H⁺.

Visto que a atividade do etanol na origem de úlceras relaciona-se diretamente com a redução da barreira de muco podemos propor que a ação gastroprotetora promovida pelos extratos do rizoma da *C. zerumbet* pode estar relacionada com uma possível capacidade de aumento da quantidade de muco, o que por sua vez dificultaria o contato do etanol com o epitélio gástrico protegendo-o. É sabido que a camada de muco aderente contínua funciona como uma barreira contra a pepsina do lúmen, protegendo a mucosa adjacente da digestão proteolítica (ALLEN; FLEMSTROM, 2005). Além disso, alguns autores relatam que os taninos presentes em extratos vegetais podem formar uma barreira física na mucosa gástrica ao se ligar a proteínas do muco e, dessa forma, poderiam tanto evitar a formação de

úlceras, quanto facilitar a sua cicatrização (DA SILVA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

O extrato aquoso e hidroalcoólico também apresentaram os curcuminoides: curcumina e dimetilcurcumina, ambos possuem a mesma atividade (YODKEEREE *et al.*, 2010). Segundo estudos de Gonzales e Orlando (2008) estes possuem ação protetora sobre a mucosa gástrica, o que foi observado neste estudo, devido à sua capacidade de reduzir a secreção de ácido gástrico através da produção de secretina, esta também atua sobre o pâncreas, estimulando a secretar bicarbonato e estimular as defesas da mucosa gástrica através da inibição da inflamação mediada por óxido nítrico e de TNF- α . Corroborando com os estudos de Mahattanadul e colaboradores (2009), onde demonstram através de suas pesquisas que a curcumina e bisdemetoxicurcumina possuem efeito protetor e acelera a cicatrização de úlceras gástricas.

A atividade antiúlcera do extrato aquoso e hidroalcoólico podem estar relacionadas também as substâncias fitoquímicas encontradas nos mesmos, como as saponinas e os compostos fenólicos. Pois segundo Lee e colaboradores (2005) as saponinas e os compostos fenólicos atuam através do mecanismo de inibição da secreção ácida reduzindo o valor de pH do suco gástrico (SEVERI *et al.*, 2009).

5.8.5. Atividades Anti-inflamatória e/ou Analgésica

5.8.5.1. Contorções Abdominais produzidas pelo Ácido Acético 2 %

O modelo químico de nocicepção de contorções abdominais em camundongos baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (WHITTLE, 1964).

Os resultados obtidos apresentados na Tabela 17 mostram que o extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* administrado por via oral causaram inibição da contorção abdominal independente das doses (250-1000 mg/Kg). Para o controle

negativo (basal), solução salina, a média de contorções apresentadas durante 1 hora de análise foi de $30 \pm 0,8$, enquanto o extrato apresentou $5,5 \pm 1,4$ (250 – 1000 mg/Kg).

Tabela 17: Efeito do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* nas doses de 250-1000 mg/Kg administrado por via oral na resposta dor induzida pelo ácido acético 2%.

Tratamentos	Veículo	Doses (mg/Kg)	Via	Núm. Contorções/min.			
				15	30	45	60
Basal	Salina 0,9%	-	i.p.	$32 \pm 0,3$	$29 \pm 0,3$	$33 \pm 0,5$	$30 \pm 0,8$
Indometacina	Salina 0,9%	25	i.p.	$07 \pm 0,3$	$08 \pm 0,6$	$08 \pm 0,5$	$09 \pm 0,4$
CzA	Salina 0,9%	250	v.o	$9,2 \pm 0,5$	$6,7 \pm 3,3$	$05 \pm 2,1$	$05 \pm 2,3$
CzA	Salina 0,9%	500	v.o	$8,5 \pm 1,5$	$6,7 \pm 1,5$	$06 \pm 0,2$	$06 \pm 0,2$
CzA	Salina 0,9%	1000	v.o	$7,5 \pm 1,7$	$08 \pm 1,8$	$6,5 \pm 2,3$	$5,7 \pm 1,8$

CzA= extrato aquoso rizoma *C. zerumbet*. i.p.= via intraperitoneal. v.o.= via oral.

Os testes de contorção foram estatisticamente significativos tanto para o extrato quanto para o controle positivo utilizado, a indometacina, os quais inibiram 98,2 % a dor, como pode ser observado na Figura 33. Não ocorrendo diferença significativa entre a indometacina e as doses do extrato aquoso, mas entre o controle negativo.

Nos estudos de Lobo e colaboradores (2009) os extratos da *C. zerumbet* apresentaram atividade antinociceptiva a partir das doses de 10 mg/Kg aplicada por via intraperitoneal, inibindo as contorções abdominais de 91,1 a 93,4 %, estes resultados contribuem e confirmam a atividade analgésica desta espécie.

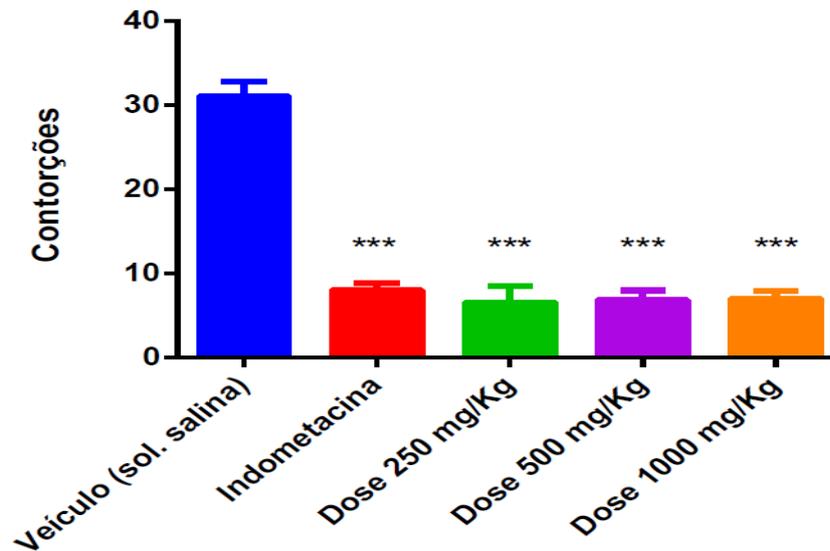


Figura 33: Comparação do efeito antinoceptivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a indometacina (25 mg/kg) no modelo de contorções abdominais, administrado por via oral.* Diferença significativa em relação ao controle positivo (indometacina) ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos apresentados na Tabela 18 mostram que o extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* administrado por via oral causaram inibição da contorção abdominal independente das doses (250-1000 mg/Kg). A média de contorções apresentadas durante 1 hora de análise para o controle negativo (veículo), foi de $39 \pm 0,8$ e para o extrato hidroalcoólico foi $4,8 \pm 0,76$.

Tabela 18: Efeito do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* nas doses de 250-1000 mg/Kg administrado por via oral na resposta dor induzida pelo ácido acético 2 %.

Tratamentos	Veículo	Doses (mg/Kg)	Via	Núm. Contorções/min.			
				15	30	45	60
Basal	Salina/tween 20	-	i.p.	33 ± 0,3	32 ± 0,3	35 ± 0,5	39 ± 0,8
Indometacina	Salina/tween 20	25	i.p.	5,5 ± 1,2	5,5 ± 0,5	6,5 ± 0,9	6,8 ± 1,9
CzH	Salina/tween 20	250	v.o.	6,2 ± 0,5	9,2 ± 2,3	5,0 ± 0,8	5,5 ± 1,2
CzH	Salina/tween 20	500	v.o.	2,7 ± 0,9	2,5 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,5 ± 0,4
CzH	Salina/tween 20	1000	v.o.	2,5 ± 1,5	3,7 ± 2,7	5,5 ± 0,2	5,5 ± 0,7

CzH= extrato hidroalcoólico do rizoma de *C.zerumbet*. i.p.=via intraperitoneal. v.o.= via oral.

Os testes de contorção foram estatisticamente significativos tanto para o extrato hidroalcoólico quanto para o controle positivo utilizado, a indometacina, os quais inibiram 98,3 % a dor, como pode ser observado na Figura 34. A indometacina utilizada como padrão, quando analisada estatisticamente com as doses administradas do extrato houve diferença significativa nas doses de 500 e 1000 mg/kg.

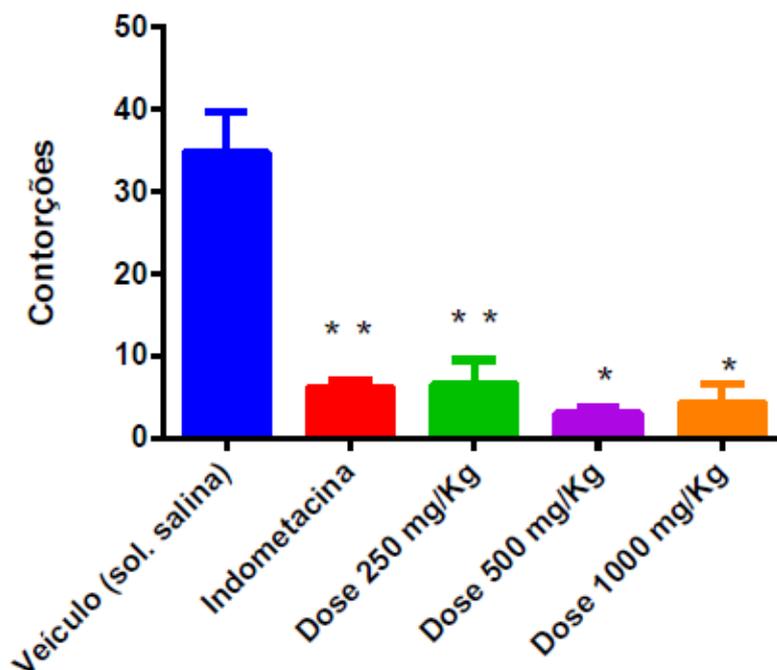


Figura 34: Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a indometacina (25 mg/kg) no modelo de contorções

abdominais, administrado por via oral.* Diferença significativa em relação ao controle positivo (indometacina) ($p < 0,05$).

A administração intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de prostaglandinas, mas também a liberação de mediadores (aminas - norepinefrina e acetilcolina) do sistema nervoso simpático (BORSATO et al., 2000). Portanto, pode-se concluir que tanto substâncias com atividade anti-inflamatória como anticolinérgicos ou anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA et al., 2003).

A indometacina utilizada como controle padrão do efeito antinocetivo inibiu a produção de prostaglandina, sendo por isso indicada para o alívio da dor e inflamação (TSINMAN et al., 2009).

A redução do número de contorções abdominais observadas após o tratamento com o extrato aquoso quanto o hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*, sugere a presença de compostos químicos relacionados com a atividade analgésica e anti-inflamatória não esteroidais, que diminuem a dor por inibição da biossíntese de eicosanóides, mediadores de processos inflamatórios (CALDER, 2001).

Atividades anti-inflamatória e antinocetiva de extratos vegetais podem ser atribuídas principalmente a substâncias flavonoídicas, composto bioativo encontrada tanto no extrato aquoso quanto no hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* (KIM et al., 2004), as quais são potentes inibidores da enzima óxido nítrico sintase tipo 2, responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), que indiretamente bloqueiam as vias da ciclooxigenase e/ou lipoxigenase e da proteína quinase C e L-arginina/NO (MEOTTI et al., 2006). Essas vias têm sido implicadas em uma série de eventos moleculares envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinocetiva (KIM et al., 2004).

Outra explicação aceitável para esta resposta pode estar relacionada com o componente majoritário presente no extrato aquoso e hidroalcoólico da *C. zerumbet* a curzerenona uma molécula com propriedade anti-inflamatória e analgésica (SOSHI; MATHELA, 2012).

A presença de curcuminóides no extrato aquoso e hidroalcoólico também podem contribuir para esta atividade, pois segundo a pesquisa de Liu e colaboradores (2013) a atividade anti-inflamatória de extratos de curcuma se dá por

sua capacidade de inibir a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas por COX-1 e -2.

5.8.5.2. Teste da Placa Quente

A atividade analgésica dos extratos nos modelos de dor provocada por estímulo térmico mostrou-se dependente da dose. No modelo da placa quente, o extrato aquoso foi capaz de ampliar o tempo que os animais permaneciam sobre a placa aquecida a 52 °C com efeito mais pronunciado aos 60 minutos, atingindo valor máximo de $35,6 \pm 1,55$ (Tabela 19).

Tabela 19: Efeito da administração oral do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* no tempo de resposta dos animais no modelo da placa quente.

Tratamentos	Veículo	Via	Dose (mg/Kg)	Potencial analgésico			
				15 min.	30 min.	45 min.	60 min.
Basal	Salina 0,9 %	v.o.	-	04,60 ± 0,34	03,85 ± 1,21	05,95 ± 0,55	04,90 ± 0,40
Ketamina	Salina 0,9 %	v.o.	38,66	08,50 ± 2,10	18,17 ± 1,94	24,65 ± 0,60	27,23 ± 2,30
CzA	Salina 0,9 %	v.o.	100	14,20 ± 0,71	15,35 ± 1,44	24,85 ± 2,24	28,12 ± 2,65
CzA	Salina 0,9 %	v.o.	250	15,61 ± 1,28	23,25 ± 1,85	28,28 ± 0,45	29,12 ± 2,15
CzA	Salina 0,9 %	v.o.	500	22,21 ± 0,47	24,02 ± 0,57	29,15 ± 0,45	30,37 ± 0,67
CzA	Salina 0,9 %	v.o.	1500	27,61 ± 0,64	25,81 ± 1,00	30,51 ± 3,20	35,60 ± 1,55

CzA= extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet*. v.o. = via oral

No entanto, observa-se na Figura 35 que apenas aos 15 min. iniciais do tratamento com extrato aquoso na dose de 1500 mg/Kg foi considerada significativamente ($p < 0,05$) o limiar nociceptivo, quando comparada ao controle positivo ketamina.

A ketamina utilizada para o controle positivo tem ação sobre os receptores opioides, produz anestesia dissociativa e atua parcialmente pelo bloqueio do canal do

receptor NMDA (DALE; HAYLLET, 2009). Ao agir nos receptores opióides reduz o tempo de propagação de impulsos para o sistema nervoso central, o que provavelmente pode ter acontecido com os extratos nas doses testadas.

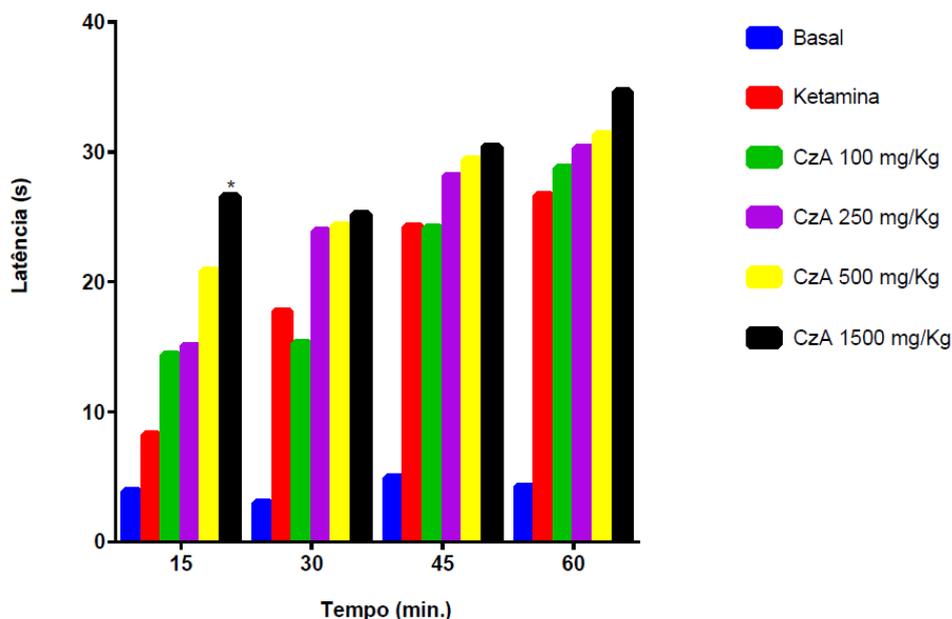


Figura 35: Comparação do efeito antinocepcivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo de Placa Quente, administrado por via oral. * Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$).

O extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* mostrou-se com atividade antinociceptiva a partir da dose de 100 mg/Kg no modelo placa quente através da sensação térmica, conforme os dados da Tabela 20.

Tabela 20: Efeito da administração oral do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* no tempo de resposta dos animais no modelo da placa quente.

Tratamentos	Veículo	Via	Dose (mg/Kg)	Potencial analgésico			
				15 min.	30 min.	45 min.	60 min.
Basal	Salina/tween 20	v.o.	-	04,36 ± 1,4	04,00 ± 0,4	5,00 ± 0,1	06,50 ± 0,8
Ketamina	Salina/tween 20	v.o.	38,66	08,78 ± 0,9	13,55 ± 0,3	13,70 ± 2,5	14,00 ± 1,9
	Salina/tween 20	v.o.	100	12,31 ± 2,1	13,20 ± 0,6	17,82 ± 1,5	18,50 ± 2,6
CzH	Salina/tween 20	v.o.	250	12,33 ± 2,5	15,60 ± 0,8	18,50 ± 2,4	19,80 ± 2,1
	Salina/tween 20	v.o.	500	19,70 ± 0,7	23,11 ± 3,0	24,9 ± 1,5	28,50 ± 1,7
	Salina/tween 20	v.o.	1500	22,10 ± 0,5	23,98 ± 2,0	26,53 ± 1,8	29,07 ± 0,5
	Salina/tween 20	v.o.	1500	22,10 ± 0,5	23,98 ± 2,0	26,53 ± 1,8	29,07 ± 0,5

CzH= extrato hidroalcoólico rizoma da *C. zerumbet*. v.o.= via oral

Os resultados analisados estatisticamente demonstram que as doses de 500 e 1500mg/Kg (**Figura 36**) apresentaram efeitos significativos quando comparados a Ketamina, fármaco utilizado como controle positivo, a partir dos primeiros 15 min. de tratamento e persistiram durante todo o experimento.

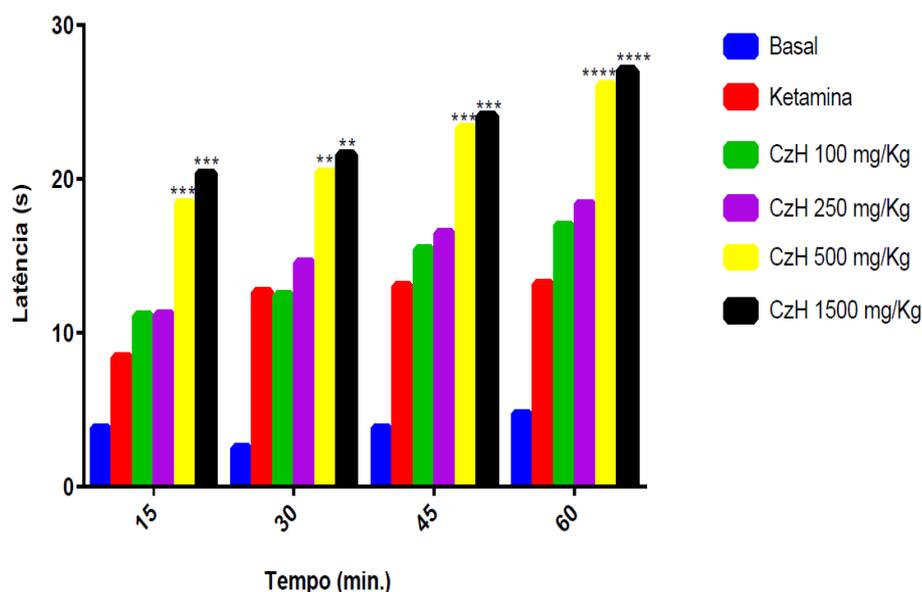


Figura 36: Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo de Placa Quente, administrado por via oral. * Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos dos testes de placa quente, observa-se que tanto o extrato aquoso quanto o extrato hidroalcoólico podem apresentar efeito antinocicepcivo sobre o sistema nervoso central. Pois este teste é considerado sensível a fármacos que atuam em nível supraespinal e modulação a resposta dolorosa (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006), sugerindo uma ação modulatória dos extratos analisados, pois estes poderiam estar imitando o efeito dos opióides endógenos ao nível de seus receptores pós-sinápticos, acionando diferentes mecanismos fisiológicos cuja função é bloquear a entrada da informação dolorosa no SNC.

5.8.5.3. Analgesímetro

O efeito analgésico causado por estímulo mecânico do extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet* durante o experimento observa-se que as doses testadas de 100, 500 e 1500 mg/Kg apresentaram resultados semelhantes ao fármaco Ketamina utilizado como controle positivo. Apenas na dose de 1500 mg/Kg após 45 min. de experimento observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) (**Figura 37**).

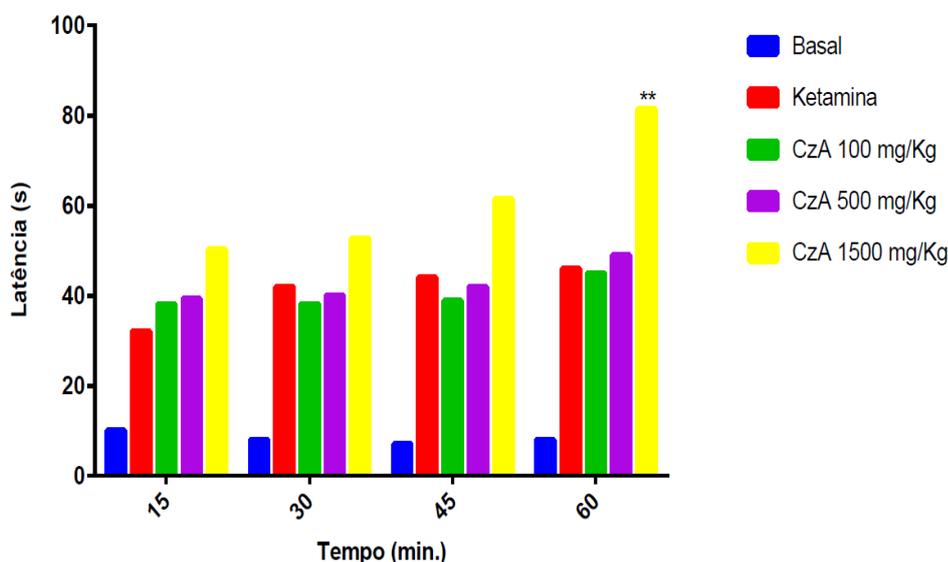


Figura 37: Comparação do efeito antinocepcivo do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo Analgesímetro, administrado por via oral. * Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$).

O extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet* apresentou efeito analgésico a partir de 15 min. apenas para a dose de 1500 mg/Kg, enquanto a dose de 500 mg/Kg apresentou efeito apenas a partir de 30 min.. Observou-se que a dose de 100 mg/Kg não apresentou um efeito desejável como era esperado, ficando abaixo do controle positivo testado. Apenas com 60 min. de experimento foi significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao fármaco Ketamina (**Figura 38**).

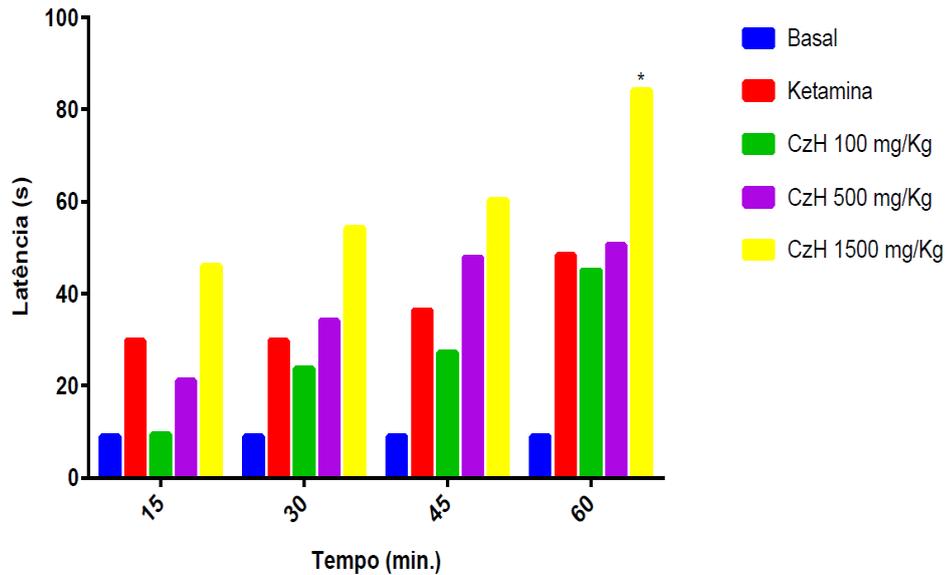


Figura 38: Comparação do efeito antinocepcivo do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* com a ketamina (25 mg/kg) no modelo Analgesímetro, administrada por via oral. * Diferença significativa em relação ao controle positivo (Ketamina) ($p < 0,05$).

Os resultados analisados dos extratos aquoso e hidroalcoólico demonstram que estes possuem atividade analgésica periférica e central a partir da dose de 500 mg/Kg.

As análises dos resultados expressos nas atividades antinocepcivas podem ser atribuídas aos curcuminoides encontrados tanto no extrato aquoso quanto no hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*, pois estes alteram a ativação do NF κ B pelo bloqueio da fosforização do I κ B, promovendo a redução na expressão genética de TNF, IL e COX-2, além de reduzir a secreção de IL-6 e PGE $_2$, substâncias envolvidas na patogenicidade da dor e inflamação (GONZALES; ORLANDO, 2008).

5.8.5.4. Determinação da atividade antiedematogênica do extrato da *Curcuma zerumbet* – Edema induzido por carragenina

O processo inflamatório induzido pela carragenina é um processo agudo, não imune, altamente reproduzível e bem estudado. A carragenina quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal, é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação – edema (tumor), eritema (rubor) e hiperalgesia (maior sensibilidade à estímulos dolorosos) – que se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória (MORRIS, 2003)

A formação do edema na pata é o resultado do sinergismo entre vários mediadores que aumentam permeabilidade vascular, provocam a vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo além da migração de células polimorfonucleares (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A carragenina induz a inflamação pela liberação de prostaglandina, ocasionando a formação de edema. Nesse modelo pode ocorrer elevação dos níveis de COX-2, com um aumento concomitante da produção de prostaglandinas (NANTEL et al., 1999).

Neste modelo de edema de pata induzido pela carragenina, vários mediadores da inflamação operam em sequencia, em tempos já bem definidos na literatura, para produzir a inflamação. Na primeira fase de desenvolvimento do edema (0-1 h) ocorre a liberação da histamina, da 5-hidroxitriptamina e da bradicinina. A segunda fase (1-6 h) está relacionada à produção elevada de prostaglandinas liberadas pela ação conjunta da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2) e do NO (SALVEMINI et al., 1996).

Anti-inflamatórios não esteroides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina (FARSAM et al., 2000).

A Tabela 21 mostra os efeitos do extrato aquoso no período de 120 min. de análise frente ao controle indometacina.

Tabela 21: Percentual de tumefação das patas dos animais segundo ação anti-inflamatória do extrato aquoso de *Curcuma zerumbet* administrada por via oral.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Via	Percentual de Tumefação das Patas					
			15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Basal	-	v.o.	42,20±2,5	50,95±2,0	51,99±1,8	48,15±1,7	45,35±1,9	40,24±2,1
Indometacina	5	i.p.	30,13±3,2	27,95±2,6	23,76±2,0	21,87±1,7	15,32±1,9	11,22±2,3
	100	v.o.	43,32±2,3	44,46±2,1	44,67±2,5	43,23±1,5	24,24±1,7	14,04±1,8
CzA	500	v.o.	16,36±2,0	12,88±1,7	10,30±1,4	08,50±1,6	04,62±2,3	02,90±1,6
	1500	v.o.	19,21±1,5	16,41±2,5	11,35±1,9	07,64±1,9	05,86±1,7	02,62±1,8

CzA= extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet*. v.o.= via oral. i.p. = intraperitoneal. Os valores estão representados como média ± DP para 6 animais.

A Figura 39 mostra evolução do edema de pata induzido por carragenina para os tratamentos de indometacina e doses do extrato aquoso. As melhores doses utilizadas foram a de 500 e 1500 mg/Kg, onde os animais tratados apresentaram nítida tendência a diminuir a intensidade do edema nos primeiros minutos do tratamento, com 54 e 66 % de inibição respectivamente. No entanto, não houve diferença estatística para os resultados encontrados, possuindo o mesmo efeito da droga anti-inflamatória utilizada.

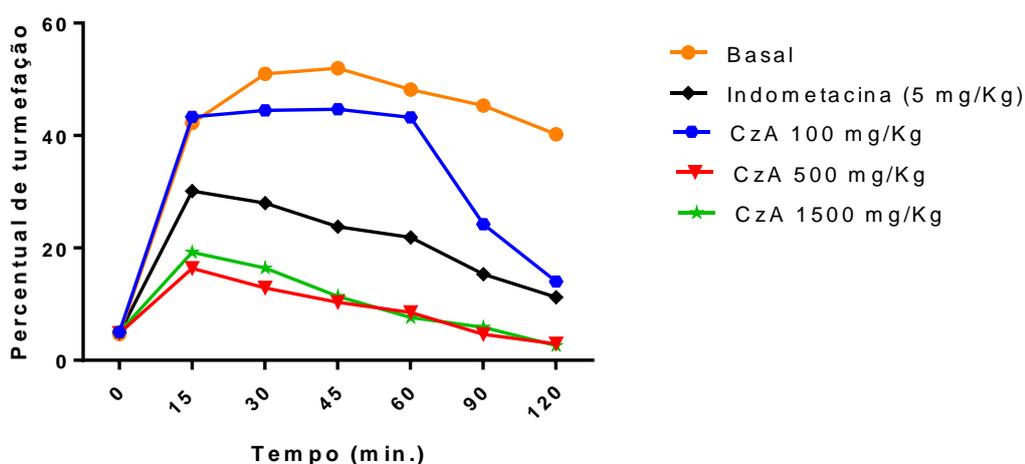


Figura 39: Percentual do aumento do volume da pata em função do tempo (min) em ratos inoculados com carragenina (30µ/pata). Os animais foram tratados por via oral com extrato aquoso do rizoma de *Curcuma zerumbet* 60 minutos antes após a aplicação do estímulo.

Na Tabela 22 apresenta os valores de percentual de tumefação das patas dos animais para análise anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *C. zerumbet* frente ao controle indometacina.

Tabela 22: Percentual de tumefação das patas dos animais segundo ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Curcuma zerumbet* administrada por via oral.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Via	Percentual de Tumefação das Patas					
			15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Basal	-	v.o.	42,20±2,5	50,95±2,0	51,99±1,8	48,15±1,7	45,35±1,9	40,24±2,1
Indometacina	5	i.p.	30,13±3,2	27,95±2,6	23,76±2,0	21,87±1,7	15,32±1,9	11,22±2,3
	100	v.o.	27,90±2,7	25,40±1,8	24,70±3,1	22,30±1,9	19,70±2,6	15,09±2,4
CzH	500	v.o.	22,90±2,7	23,41±1,8	20,73±3,1	20,32±1,9	17,71±2,6	15,09±2,4
	1500	v.o.	23,02±1,9	19,42±1,5	16,88±2,5	12,63±2,1	08,98±2,5	05,87±1,5

CzH= extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*. v.o.= via oral. i.p.= intraperitoneal. Os valores estão representados como média ± DP para 6 animais.

Observa-se na Figura 40 a evolução da tumefação nas patas dos animais quando aplicada o extrato hidroalcoólico. O resultado demonstra que não houve diferença estatística quando comparada ao controle Indometacina, no entanto, percebe-se que a dose de 1500 mg/Kg de extrato reduziu a tumefação a partir dos 30 min. de reação com 70 % de inibição.

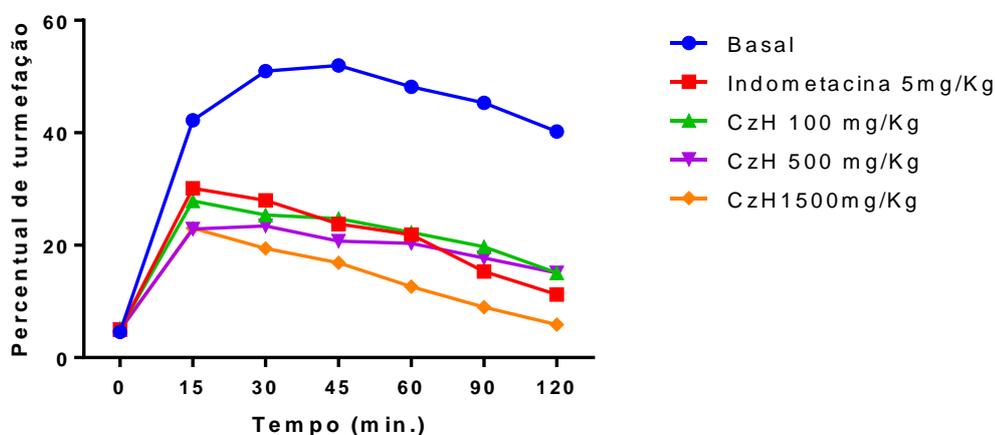


Figura 40: Percentual do aumento do volume da pata em função do tempo (min) em ratos inoculados com carragenina (30 µ/pata). Os animais foram tratados por via oral

com extrato hidroalcoólico do rizoma de *Curcuma zerumbet* 60 minutos antes após a aplicação do estímulo.

Segundo Behling e colaboradores (2004) citam que ação de alguns flavonoides inibem a ação das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase, impedindo a formação das prostaglandinas e leucotrienos, inibindo dessa forma os processos inflamatórios, o que pode ter ocorrido neste estudo. Por outro lado, a atividade antiinflamatória pode estar associada ao efeito inibitório de terpenóides sobre o fator nuclear κ B (NAM, 2006). Saponina terpenoídica tem também exercido atividade antinociceptiva via modulação dos receptores do GABA, NMDA, não-NMDA, serotonina e α -adrenérgico ao nível da medula espinhal, o que pode justificar o efeito dos extratos (SUH et al., 2000).

Diante dos resultados analisados, pode-se supor que o sinergismo dos compostos secundários presentes no extrato aquoso e hidroalcoólico testados pode está inibindo a liberação ou a ação de mediadores envolvidos nas fases da resposta inflamatória.

5.9. Desenvolvimento do iogurte

Os iogurtes formulados (**Figura 41**) com o extrato aquoso e hidroalcoólico apresentaram características organolépticas ideais para iogurte independente da concentração e do extrato adicionado que é um dos aspectos fundamentais na qualidade e aceitação.



Figura 41: Iogurtes formulados com os extratos aquoso e hidroalcoólico da *Curcuma zerumbet*. **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

5.9.1. Análises Físico-químicas dos iogurtes

A composição do leite empregado na fabricação dos iogurtes estava de acordo com os valores previstos na legislação (Acidez: 17^oD, lipídeos: 3,0% e proteína total: 3,18%). Da mesma forma verifica-se na Tabela 23 que todos os iogurtes avaliados estão em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2007).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), classifica os leites fermentados quanto ao teor de gordura em: creme, percentual de gordura de no mínimo 6 %; integral, percentual de gordura entre 3 a 5,9 %; semidesnatado, percentual de gordura entre 0,6 a 2,9 % e desnatado, percentual máximo de gordura 0,5 %. Portanto, os iogurtes elaborados com o extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma de *C.zerumbet* por apresentarem um percentual de gordura entre 1,2 a 1,5 % foram classificados como semidesnatados.

Tabela 23: Composição físico-química dos iogurtes formulados com os extratos aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Formulações	Umidade %	Cinza %	Lipídio %	Proteína %
I.N.	5,1 ± 0,12 ^a	3,5 ± 0,04 ^a	1,5 ± 0,14 ^b	14,0 ± 0,42 ^c
I.E.A. 0,12%	5,5 ± 0,02 ^a	3,6 ± 0,05 ^a	1,4 ± 0,09 ^b	15,6 ± 0,49 ^c
I.E.A. 0,25%	7,1 ± 0,07 ^b	3,8 ± 0,14 ^a	1,2 ± 0,06 ^b	15,7 ± 0,56 ^c
I.E.H. 0,12%	3,3 ± 0,07 ^a	3,7 ± 0,01 ^a	1,4 ± 0,06 ^b	15,9 ± 0,07 ^c
I.E.H. 0,25%	4,6 ± 0,05 ^a	3,8 ± 0,08 ^a	1,5 ± 0,07 ^b	16,0 ± 0,09 ^c

*Valor expresso em Kcal/100g; Média e desvio-padrão; Médias, em mesma coluna, seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente no teste de Tukey ($p < 0,05$). I.N.= controle; I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Comparando os valores de proteínas encontrados com o determinado por Brasil (2007), foi observado que tanto os iogurtes de extrato aquoso (15,6 – 15,7 %), quanto o iogurte de extrato hidroalcoólico (15,9 – 16 %) apresentaram um teor proteico mais elevado que o indicado pela legislação (mínimo de 2,9% de proteínas para o iogurte), enquadrando-se dentro do padrão estabelecido na mesma. Observa-se também que os mesmos não tiveram diferença estatística quando comparados ao controle.

5.9.2. Análise Microbiológica dos iogurtes

A análise microbiológica (**Tabela 24**) realizadas nas amostras formuladas apresentou-se satisfeitas, uma vez, que estavam todas de acordo com a Legislação Sanitária. A presença de coliformes em iogurtes é limitada pelos valores de pH, pois sua faixa de crescimento é atribuída a 4,4 a 9,0, logo sua ausência na maioria das amostras formuladas, já que esses microrganismos podem sofrer estresse e não serem detectados nas análises (LIMA *et al.*, 2009; JAY, 2005).

Tabela 24: Análise microbiológica dos iogurtes.

Microorganismos	Formulações			
	I.E.A. 0,12%	I.E.A. 0,25%	I.E.H. 0,12%	I.E.H.0,25%
Coliforme total (NMP/g)	0,0	0,0	0,0	0,0
Coliforme fecal (NMP/g)	0,0	0,0	0,0	0,0
Mesófilos (UFC/g)	4×10^4	2×10^4	4×10^4	3×10^4
Bolores e Leveduras (UFC/g)	<10	<10	<10	<10
<i>Stafilococcus aureus</i> (UFC/g)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella sp.</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Contudo, a ausência de coliformes, pode ser indicativa de boas condições higiênico-sanitárias, durante o processo de elaboração (LIMA *et al.*, 2009).

Com relação aos microrganismos aeróbios mesófilos, sabe-se que a Instrução Normativa Nº 16 de 23 de Agosto de 2005 não estabelece padrões microbiológicos para estes, mas, as análises foram realizadas para se ter uma noção da qualidade higiênico-sanitária do produto e os resultados interpretados baseando-se nos padrões microbiológicos, onde as amostras com qualidade aceitável apresentam contagens de até $7,5 \times 10^4$ (UFC/ml) (BRASIL, 2005).

A contagem da população de leveduras e bolores e *Stafilococcus aureus* nos iogurtes avaliados, sendo em condições satisfatória para o consumo. Este resultado demonstra a qualidade do produto foi obtido em condições adequadas de sanidade sem que pudessem conferir ao produto características microbiológicas indesejáveis.

5.9.3. Contagem Total de Bactérias Lácteas

A sobrevivência das bactérias lácteas durante o armazenamento até o consumo é considerada importante, pois os efeitos promotores da saúde dos produtos lácteos fermentados podem ser relacionados com a atividade biológica das bactérias empregadas na produção desses alimentos e os metabólitos gerados durante o processo de fermentação (GALLINA *et al.*, 2011).

Para alcançar um efeito terapêutico, o número de bactérias até o consumo deve ser de no mínimo 10^5 a 10^6 UFC/mL (CRUZ et al., 2012; ILLUPAPALAYAM; SMITH; GAMLATH, 2014). Os resultados da viabilidade das bactérias lácteas nos iogurtes formulados durante a estocagem a 4 °C por um período de 35 dias, estão apresentados na Figura 42.

A média da sobrevivência das bactérias lácteas (UFC/mL) nos dias 1, 7, 14 e no final do período de vida útil (dia 35) são mostrados na Figura 42. Observa-se que as bactérias lácteas a partir do 14 dia de armazenamento para o iogurte com 0,25 % de extrato aquoso do rizoma da *C.zerumbet* apresentaram um pico de crescimento com efeito significativo quando comparado ao iogurte natural.

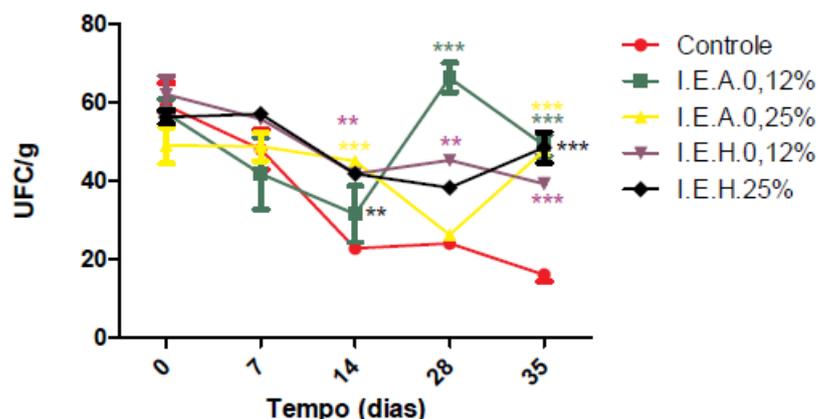


Figura 42: Comparação da viabilidade das bactérias lácteas nos iogurtes formulados durante 35 dias de armazenamento mantidos sob refrigeração (4° C). I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Os iogurtes com extrato aquoso e o hidroalcoólico apresentaram crescimento das bactérias lácteas com picos característicos para 35 dias de armazenamento o que não é comum em iogurtes fabricados. Pode-se verificar que estes apresentaram efeitos significativos quando comparados com o controle (iogurte natural). Esta sobrevivência pode esta relacionada com as proteínas presentes nos extratos onde

desempenham importante função na liberação de aminoácidos, essencial para o crescimento das mesmas.

Ao avaliar os resultados obtidos na Figura 42 observa-se que os iogurtes formulados apresentaram contagens de bactérias lácticas durante todo o período de estocagem compatível à legislação vigente, a qual preconiza para leites fermentados contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo de 10^6 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) do produto (BRASIL, 2007).

Uma característica fisiológica diferenciadora das bactérias lácticas é sua alta tolerância à acidez. A diminuição do pH em um produto pode ser devido a vários fatores incluindo: pH inicial, tempo de fermentação, variação de temperatura e níveis de ácidos orgânicos produzidos no final da fermentação e durante o armazenamento (DONKOR et.al., 2006).

Um pH adverso afeta pelo menos dois aspectos de uma célula bacteriana viva: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes para o interior da célula. Além da interferência da acidez na viabilidade, as bactérias lácticas exigem complexos fatores de crescimento como: vitaminas do complexo B, aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas (LIN et.al., 2005).

Os estudos de Amirdivani e Baba (2011) reportam iogurte de ervas reduzem de forma rápida o pH, diferente do observado por Singh e colaboradores (2011) que em seus estudos a faixa de pH ficou entre 4,5 a 4,1 (ILLUPAPALAYAM; SMITH; GAMLATH, 2014), corroborando com este trabalho como observado na Figura 43. No total, a conversão da lactose em ácido láctico, a composição da cultura fermento de bactérias, e a duração de armazenamento e temperatura de fermentação pode ser a razão para a diminuição no pH durante o armazenamento.

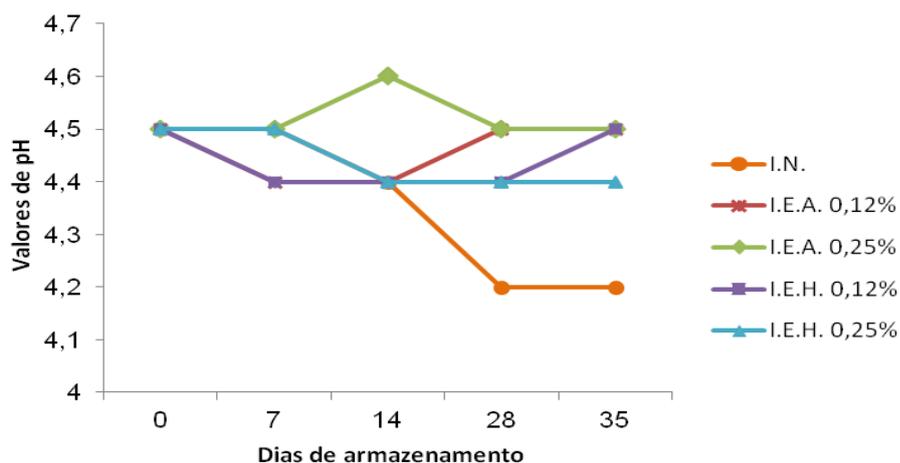


Figura 43: Valores de pH dos iogurtes em refrigeração (4° C) durante 35 dias de armazenamento. I.N. (iogurte natural); I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Produção de ácido por microrganismos provoca uma diminuição no pH durante fermentação a 42 °C, e esta diminuição continua durante o armazenamento a 4 °C (SHAH, 2000). Como resultado, verificou-se uma diferença de pH não esperado após 28 dias de armazenamento, nos quais os iogurtes com extratos apresentaram uma variação de pH de 4,4 a 4,5.

A diminuição dos níveis de pH foi maior no controle produto do que nas amostras suplementadas com os extratos durante o período de armazenamento. Este fenômeno pode ser atribuído à presença de compostos com capacidade de tamponamento nos extratos aquoso quanto hidroalcoólico.

5.10. Avaliação da Atividade Antiúlcera dos Iogurtes

A Figura 44 mostra análise de um estômago *in natura* do rato Wistar sem tratamento onde se observa características anatomo-histológicas do órgão: (a)

apresenta o estômago em visão macroscópica com as pregas presentes e coloração padrão da sua mucosa; (b) apresenta a microscopia do estômago: mucosa (Mc), apresenta pregas que são as evaginações da mucosa, com glândulas gástricas contendo células parietais e principais, lamina própria é limitada pela muscular da mucosa (Mmc). A submucosa (SMc) é composta por tecido conjuntivo propriamente dito. Observa-se ainda no canto inferior esquerdo da foto a muscular própria (Ms).

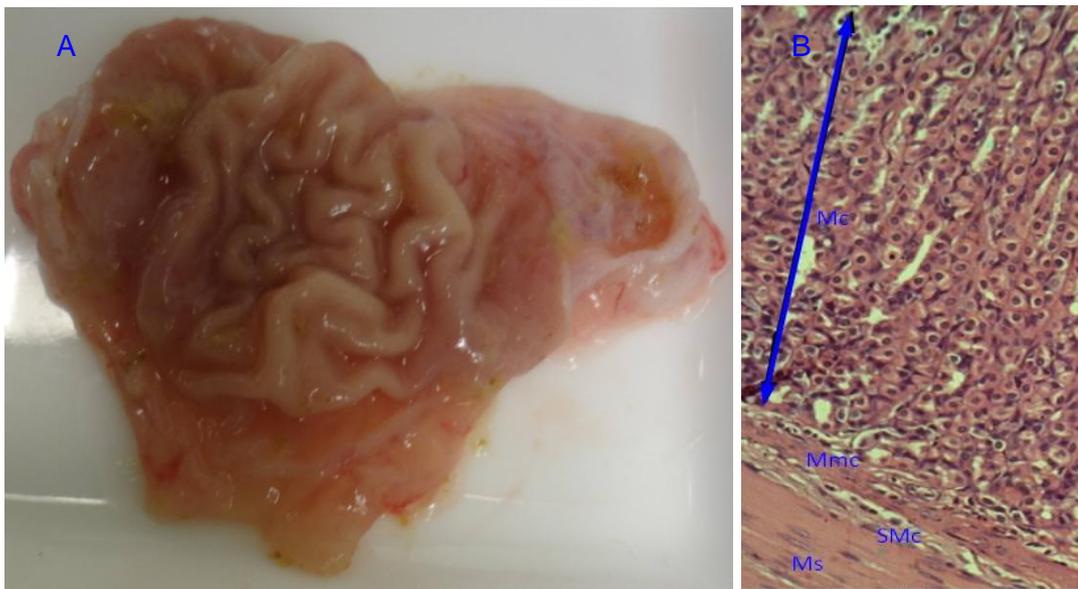


Figura 44: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar; (b) fotomicrografia do estômago (10x), coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

A Figura 45 mostra análise de um estômago do rato Wistar tratado por ranitidina. Em análise macroscópica apresenta leve edema, cor da mucosa rosa (normal) com presença de pregas e algumas microhemorragias. Na análise microscópica, a mucosa apresenta de forma discreta a presença de infiltrado inflamatório e vasos congestionados. Não é possível observar na foto área da lesão (diátese) hemorrágica.

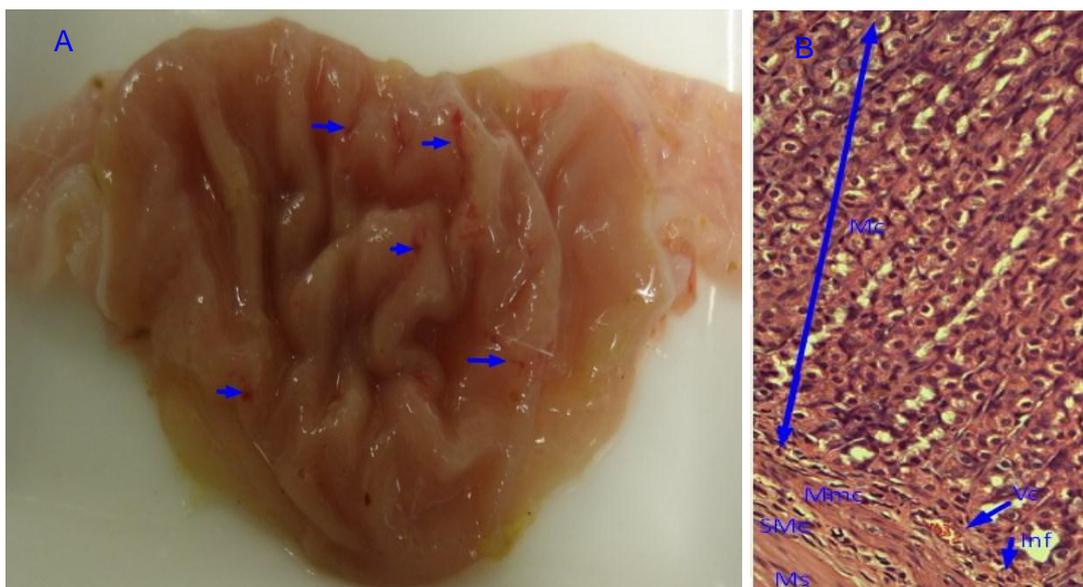


Figura 45: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por ranitidina com áreas microhemorrágicas (setas); (b) fotomicrografia do estômago (20x), coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestos); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

A administração oral de etanol produziu lesões na mucosa gástrica dos ratos que puderam ser visualizadas macroscopicamente na forma de hemorragias (**Figura 46**). As principais características da úlcera gástrica induzida pelo etanol são a perda epitelial, edema da mucosa e a hemorragia sub-epitelial. O etanol penetra rapidamente na mucosa gástrica, a lesão é caracterizada por danos na membrana celular, erosão hemorrágica, áreas com necrose de coagulação difusa e congestão vascular e formação distinta de úlcera (FARIA et al., 2012). Observa-se na fotomicrografia do estômago a presença de vasos congestos, infiltrado inflamatório, hiperemia capilar na mucosa e perda epitelial.

As lesões causadas pelo agente necrosante (etanol) em roedores não simulam integralmente as características da úlcera que se desenvolve em humanos, pois essas lesões nos roedores são temporalmente agudas e, conseqüentemente superficiais. Entretanto, esse modelo ulcerogênico possui respaldo para a pesquisa de novos protótipos de drogas potencialmente efetivas para o caráter clínico (SZABO; GOLDBERG, 1990).

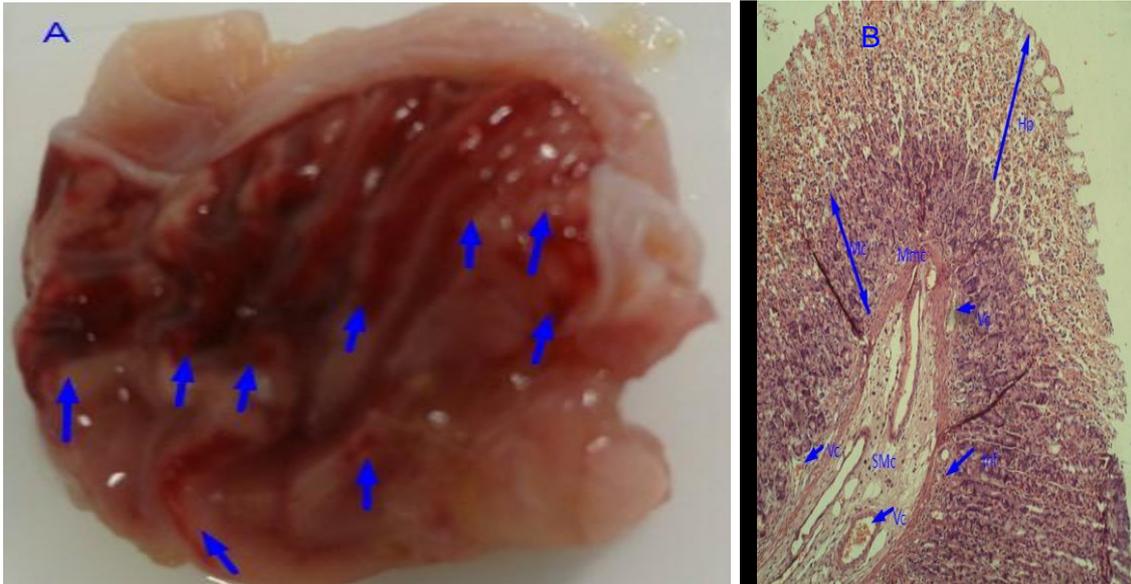


Figura 46: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar com lesões evidentes (setas) induzidas por etanol; (b) fotomicrografia do estômago (20x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Vc (vasos congestionados); Inf (infiltrado inflamatório); Hp (hiperemia). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

Neste estudo, foi observado que o pré-tratamento com o iogurte contendo 0,12 % de extrato aquoso de *C. zerumbet* diminuiu o dano gástrico produzido pelo etanol. Observa-se na Figura 47 que macroscopicamente a parede do estômago apresenta redução da área de lesão causada pelo etanol quando comparada com o estômago do animal que foi induzido a ulceração por etanol (Figura 46) sem tratamento. Na fotomicrografia (Figura 47), a mucosa apresenta intenso infiltrado inflamatório, vasos congestionados e afluxo sanguíneo. Nessa imagem não é possível observar área ulcerada.

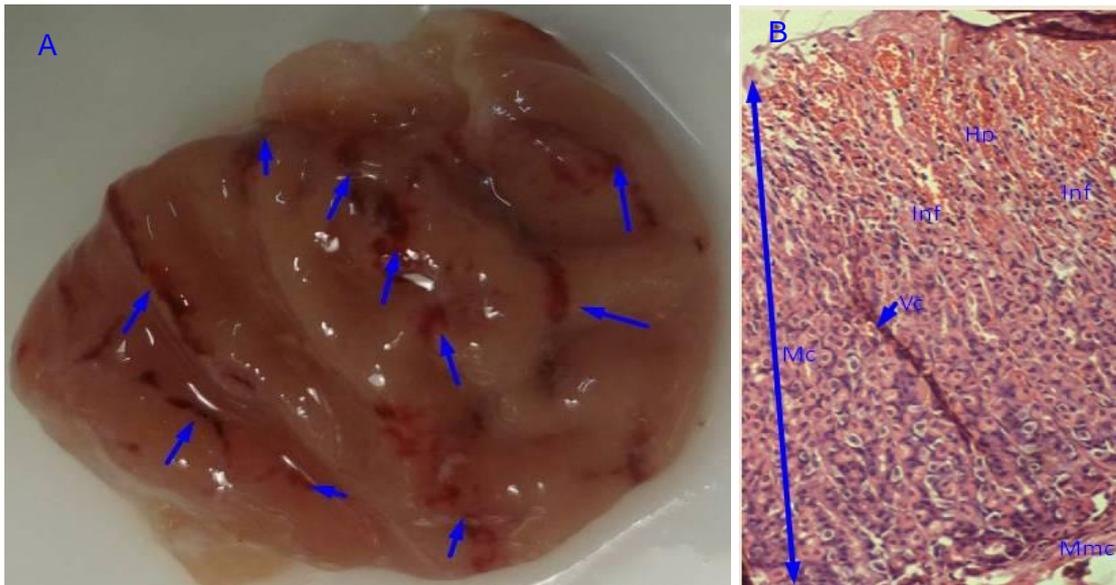


Figura 47: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.A. 0,12 % (iogurte com 0,12 % de extrato aquoso); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); Vc (vasos congestionados); Inf (infiltrado inflamatório); Hp (hiperemia). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

Na Figura 48, no animal tratado com I.E.A. 0,25 % (iogurte com 0,25 % de extrato aquoso), nota-se que não houve alteração macroscópica na mucosa gástrica. A mucosa continua apresentando pregas com coloração normal, sem lesões causadas pelo etanol. Observa-se que a concentração de 0,25 % do extrato aquoso no iogurte obteve uma melhor proteção quando comparada a concentração de 0,12 % do extrato. Na análise microscópica ocorre a presença de infiltrado inflamatório proveniente da ação lesiva do etanol, alguns vasos congestionados e sem lesão na mucosa.

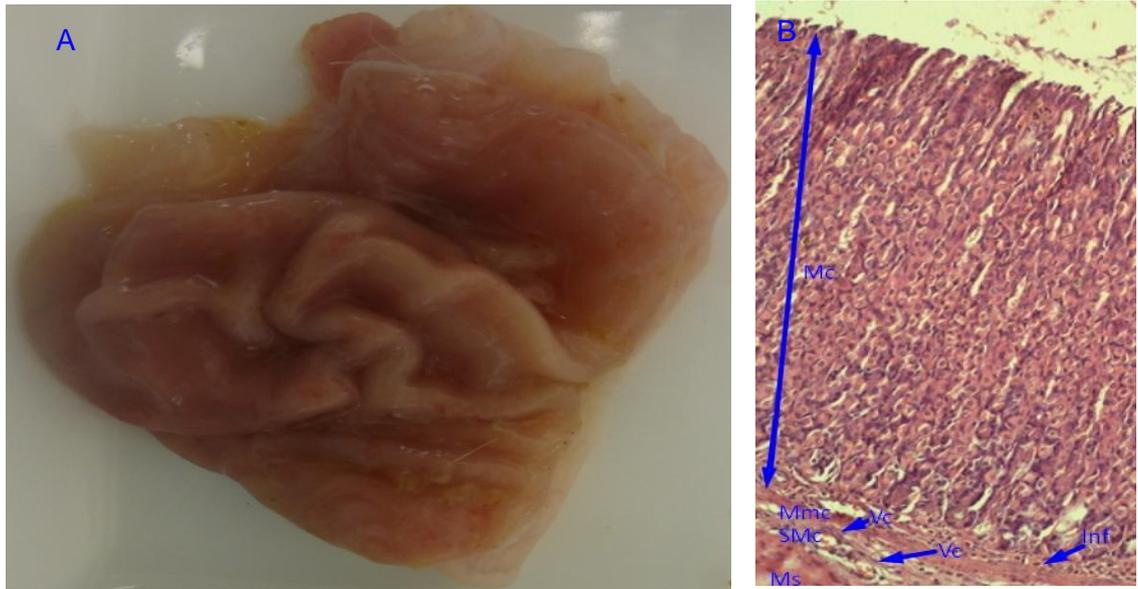


Figura 48: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.A. 0,25 % (iogurte com 0,25 % de extrato aquoso); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestionados); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

A Figura 49 apresenta os resultados da atividade antiúlcera dos tratamentos realizados com iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *C. zerumbet*. Estes administrados por via oral apresentaram atividade antiulcerogênica de 65 a 86 % respectivamente, quando comparados com o controle positivo a ranitidina, o iogurte com maior concentração do extrato não apresentou diferença estatística ($p < 0,001$).

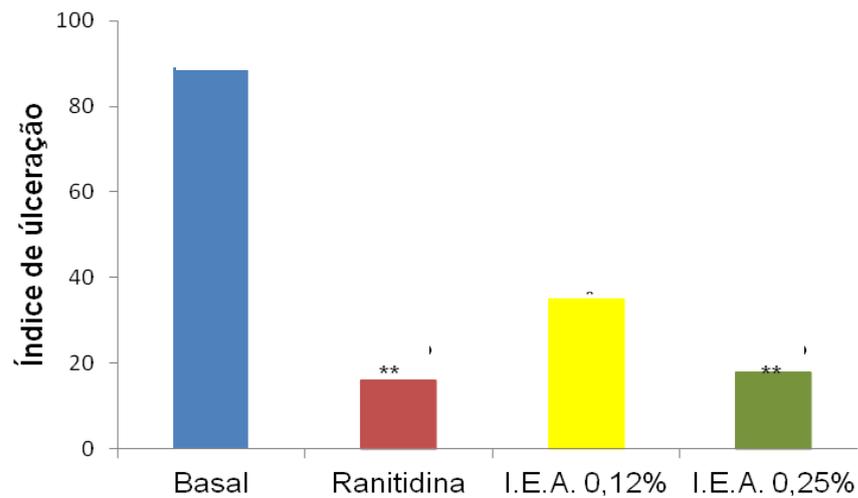


Figura 49: Atividade antiúlcera dos iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % de extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet* administrado via oral. I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

A Figura 50 apresenta a mucosa do estômago do animal que foi tratado com iogurte contendo 0,12 % do extrato hidroalcoólico, a mucosa do estômago macroscopicamente com poucas lesões, apresentando alguns focos de hemorragia, mas preservando as pregas e a coloração da mucosa. Na análise microscópica, a mucosa observa-se íntegra, apresentando infiltrado inflamatório e vasos congestos, além de hipotrofia da mucosa gástrica.

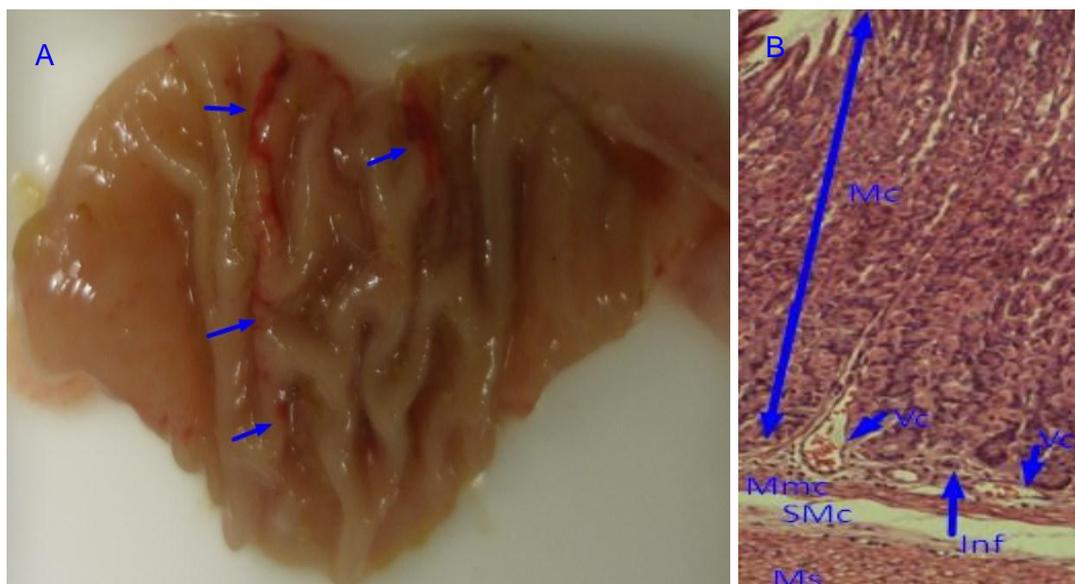


Figura 50: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.H. 0,12 % (iogurte com 0,12 % de extrato hidroalcoólico); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); SMc (submucosa); Ms (muscular própria); Vc (vasos congestionados); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

Observa-se que os animais pré-tratados com o iogurte contendo 0,25 % de extrato hidroalcoólico não apresentaram lesões macroscópicas na mucosa do estômago dos animais (**Figura 51**). A mucosa apresenta pregas e coloração rósea (normal), o agente lesivo (etanol) não promoveu alterações visíveis na mucosa do estômago dos animais experimentais. Na análise microscópica verificou-se a presença de discreto infiltrado inflamatório sem alteração na mucosa gástrica.

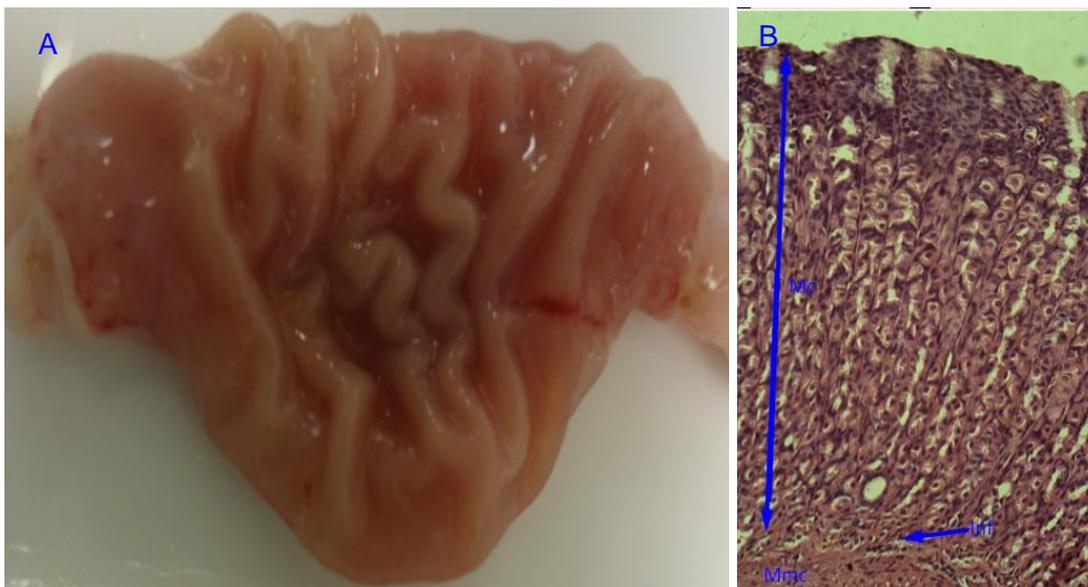


Figura 51: (a) Imagem macroscópica do estômago *in natura* do rato albino Wistar tratado por via oral com I.E.H. 0,25 % (iogurte com 0,25 % de extrato hidroalcoólico); (b) fotomicrografia do estômago (10x) coloração HE. Mc (mucosa); Mmc (muscular da mucosa); Inf (infiltrado inflamatório). **Fonte:** Márcia Castro, 2015.

A Figura 52 apresenta os resultados da atividade antiúlcera dos tratamentos realizados com iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *C. zerumbet*. Estes administrados por via oral apresentaram atividade antiulcerogênica de 76 a 86 % respectivamente, quando comparados com o controle positivo, a ranitidina, o iogurte com maior concentração de extrato não apresentou diferença estatística ($p < 0,001$).

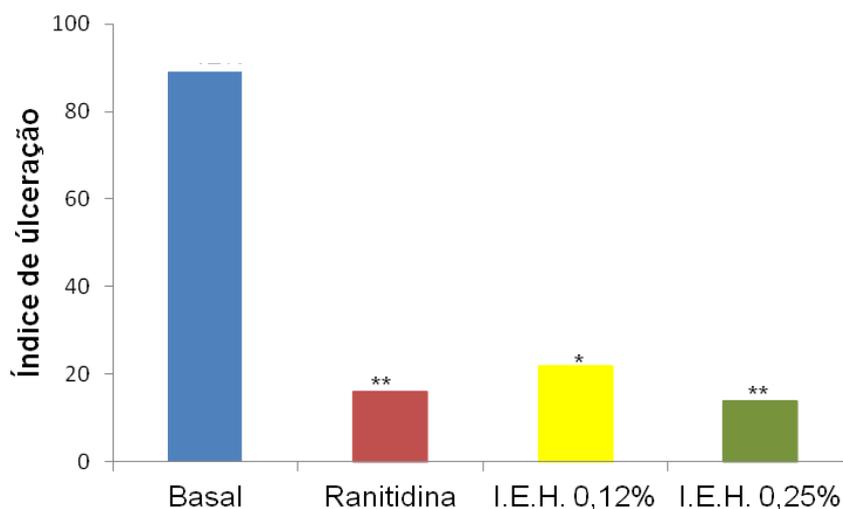


Figura 52: Atividade antiúlcera dos iogurtes contendo 0,12 e 0,25 % de extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* administrado via oral. I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*, I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

O resultado anatômico e histopatológico da avaliação gástrica induzida por etanol apresentou semelhanças com estudos anteriores que também utilizaram esse lesionante (agente estressante). O etanol é altamente corrosivo para a mucosa gástrica, sua ação abrange erosão superficial, liberação de histamina via mastócitos de mucosa e submucosa e leucotrienos, ocorrendo assim geração de edema. Seu mecanismo de ação se baseia no seu efeito solvente, dissolvendo lipídeos da membrana celular e, também reduz o nível de proteínas dos tecidos, que por sua vez, levam a diminuir o fluxo sanguíneo gástrico, resultando em necrose (BHARTI; WAHANE; KUMAR, 2010; MAHMOOD; AL-BAYATY; SALMAH, 2011; AL-QARAGHULI, et al., 2013).

Os iogurtes analisados não alteraram a permeabilidade microvascular após administração de etanol, indicando que o efeito gastroprotetor do mesmo não se deve a manutenção da integridade microvascular da mucosa gástrica, como foi observado, mas, por sua vez, reduziu a ação erosiva.

Existem dois mecanismos de ação para as drogas antiulcerogênicas. O primeiro refere-se aos mecanismos que controlam o processo de secreção ácida gástrica e atuam como potentes antioxidantes. O segundo refere-se aos que aumentam a resistência das células da mucosa gástrica aos fatores agressivos pelo

aumento da síntese de prostaglandinas e/ou estimulando a secreção de muco e bicarbonato (BARROS et al., 2008).

A atividade antiulcerogênica promovida pelos iogurtes sugere o envolvimento de fatores citoprotetores da mucosa gástrica como: as prostaglandinas, que tem o papel de estimular a secreção de bicarbonato e muco e manter o fluxo sanguíneo da mucosa regulando a renovação e o reparo celular (BATISTA et al., 2004); a presença de compostos fenólicos, saponinas, triterpenos encontrados nos extratos da *C. zerumbet* são compostos bioativos que oferecem proteção a mucosa gástrica, com ação relacionada a indução da produção do muco (VASCONCELOS et al., 2010).

5.11. Avaliação Sensorial dos iogurtes

Para a análise sensorial, os provadores escolhidos ao acaso avaliaram o sabor global das amostras de iogurtes obtidos comparando-os entre si. Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância e demonstraram que houve diferença de sabor global entre as amostras analisadas ao nível de significância 5 %. As médias da aceitação das amostras estão representadas na Figura 53.

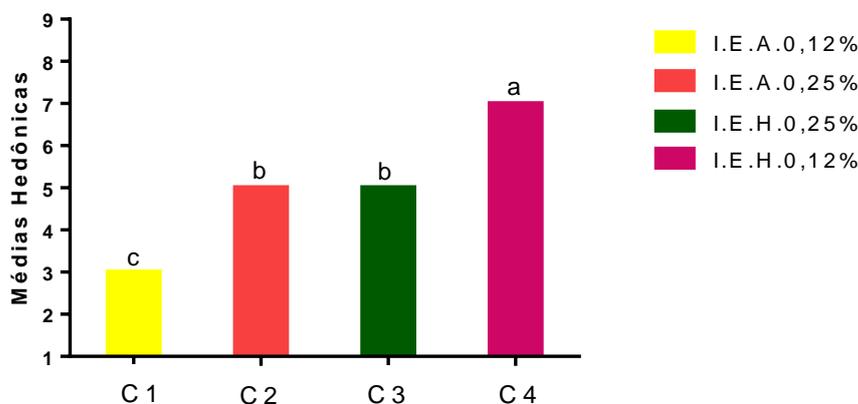


Figura 53: Médias de aceitação dos iogurtes obtidos na análise sensorial. Pares de médias com a mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). I.E.A.0,12 % = iogurte com 0,12 % do extrato aquoso do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.A. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato aquoso do rizoma da

Curcuma zerumbet; I.E.H. 0,12 %= iogurte com 0,12 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*; I.E.H. 0,25 % = iogurte com 0,25 % do extrato hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet*.

Verificou-se que as amostras C1 e C2 diferiram significativamente, podendo-se, assim, dizer que apresentam diferença de sabor mesmo sendo do mesmo extrato aquoso de *C.zerumbet*. Mas por serem de concentrações diferentes (0,25 e 0,12 %), o sabor do extrato aquoso atenuou-se no iogurte - as médias de aceitação variaram entre 3,3 (C1) e 5,4 (C2), ficando entre os termos hedônicos “indiferente” e “normal”. No entanto, a amostra C2 (iogurte + extrato aquoso), observa-se que a mesma não diferiu significativamente da amostra C3 (iogurte + extrato hidroalcoólico). Por conterem mais extratos (0,25 %) os provadores avaliaram como “indiferentes”.

Ao se comparar os valores obtidos das análises, pode-se afirmar que a amostra C4 recebeu a maior nota na análise sensorial 7,2 com valor termo hedônico “bom”, sendo a mais aceita entre os provadores. Iogurte com extratos do rizoma de *C. zerumbet* se torna, portanto, em mais um produto com tendência a entrar no mercado, com boa aceitação do público e com propriedade terapêuticas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir:

- ✓ O extrato aquoso e hidroalcoólico apresentam componentes bioativos de interesse para a indústria alimentícia funcional e farmacêutica;
- ✓ O extrato aquoso e hidroalcoólico do rizoma da *Curcuma zerumbet* apresentaram atividade antiúlcera, analgésica e anti-inflamatória em dose dependente;
- ✓ Os iogurtes formulados apresentaram gastroproteção com concentrações de 0,25 % de extrato aquoso e hidroalcoólico;
- ✓ Os iogurtes formulados apresentaram boa aceitabilidade;
- ✓ Extrato aquoso e hidroalcoólico de *Curcuma zerumbet* são potentes suplementos ou ingredientes para serem adicionados em iogurtes e obterem propriedades terapêuticas.
- ✓ Os iogurtes formulados apresentam mais uma alternativa terapêutica na profilaxia de várias enfermidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA - American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 95, 493-96, 1993.

AL-HABORI, A.M.; AL-AGHBARI, M.; AL-MAMARY; M. BAKER. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 209–217, 2002.

ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology Cellular Physiology*, 288, 1-19, 2005.

ALMEIDA, F.R.C.; OLIVEIRA, F.S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R.N. *Psicofarmacologia: Fundamentos práticos*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 11, pp. 131-137.

ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 357 p.

AL-QARAGHULI, A. M.; ABDEL, W. E.; AL-ANI, I. M.; FAISAL, G. G. Effects of Xiang Sha Yang Wei Wan on Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Sprague Dawley Rats: a Histological Study. *The International Medical Journal*, 12, 3-10, 2013.

ALVES, T.A.; LU, D.L.; PEREIRA, A.; CREMASSO, C. Q.; MOURA, J.C.; SOUZA, A.R.M. Avaliação do Efeito da Radiação Gama em Rizomas de Açafrão (*Curcuma longa* L) Secos e Frescos. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Brasil, 2010.

AMIRDIVANI, S.; BABA, A. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *Lwt-food Science and Technology*, 44, 1458-1464, 2011.

ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 83-90, 2007.

ANVISA. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. Resolução nº 18 de 30

abr. 1999. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 3 maio 1999. Seção 1, p. 16.

ARVANITOYANNIS, I. S.; KOUKALIAROGLU, M. V.H. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 385-404, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16^a Ed. Washington, 1998. 1190 p.

AZAM, G.; NOMAN, S.; AL-AMIN, M. Phytochemical Screening and Antipyretic Effect of *Curcuma zedoaria* Rosc. (Zingiberaceae) Rhizome. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 569-575, 2014.

BARRETO, A.M.C.; TOSCANO, B.A.F.; FONTES, R.C. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) in cancer patients treated with chemotherapy. *Com Ciências Saúde*, 22, 257-270, 2011.

BARROS, M.P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; LEITE, M.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal Ethnopharmacol*, 120, 372-377, 2008.

BARTIMEUS, P. 100 *Receitas de Saúde: alimentos terapêuticos*. São Paulo: Publifolha, 2010, 128p.

BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.B.; MAGRI, L.P.; TOMA, W.; CALVO, T.R. VILEGAS, W.; BRITP, A.R.M. Gastric Antiulcer Activity of *Syngononthus arthrotrichus* Silveira. *Biology Pharmacology*, 27, 328-332, 2004.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoides quercentina: aspectos gerais e ações biológicas. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 15, 285-292, 2004.

BHARTI, S.; WAHANE, V. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 440-444, 2010.

BIANCO, A.L. *Os alimentos funcionais entre ciência e comunicação*. Santa Catarina: 2010. 160 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia Política)-Universidade Federal de Santa Catarina.

BICUDO, M.O.P.; VASQUES, E.C.; ZUIM, D.R.; CANDIDO, L.M.B. Elaboração e caracterização de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa com polpa de frutas. *Boletim Ceppa*, 30,19-26, 2012.

BLECHARK, K.K. ; PEIRCHAL, A.; JONIEC, I.; PYRZANOWSKA, J.; Pharmacological and biochemical effects of *Ginkgo biloba* extract on learning, memory consolidation and motor activity. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 69, 217-231, 2009.

BOBBIO, P.A. ; BOBBIO, F.O. Água. In :*Química do Processamento de Alimentos*. 2 ed. São Paulo : Varela, 2001, cap 1. pp 1-13.

BOISSIER, J.R. ; DREMONT, C. ; ROBINS, R. ; PAGNY, J. Tentative de pharmacologie previsionelle dans de domain des neuroleptique: actions sedative centralle et adrenolytique de la N(dimethoxy-3,4 phenethyl) N(chloro-2 phenyl) piperazine. *Arch Int Pharmacodyn*, 133, 29-32, 1961.

BHUTANI, M.K.; BISHNOI, M.; KULKARNI, S.K. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacology Biochemistry end Behavior*, 92, 39–43, 2009.

BORSATO, M.L.C.; GRAEL, C.F.F.; SOUZA, G.E.P. ; LOPES, N.P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, 55, 809-813, 2000.

BRANCALION, P.H.S. Instrumentos legais podem contribuir para a restauração de Florestas tropicais biodiversas. *Revista Árvore*, 34, 455-470, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução no 54. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria no46, de 23 de novembro de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, Instrução Normativa Nº 16, de 23 de Agosto de 2005. Aprovar o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Disponível

em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12792>> Acesso em: 14 Set. 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de outubro de 2002, Brasília.

BRASIL. Resolução n.5, de 13 de novembro de 2000. A secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal –DIPOA-determina a entrada em vigor dos padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial da União, Brasília.

BRÔRING, S.; CLOUTIER, L.M.; LEKER, J. The front end of innovation in an era of industry convergence: evidence from nutraceuticals and functional foods. *R&D Management*, 36, 5-10, 2006.

CALDER, PC. N3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 88, 117-24, 2001.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. 29, 193-203, 2005.

CARDOSO, R.M.; BARRÉRE, A.P.N.; TROVÃO, F.C.S. Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde. *Educação Contin Saúde*, 07, 106-109, 2009.

CHISTÉ,R.C.; COHEN, K.O.; MATHIAS, E.A.; RAMOA JÚNIOR, A.G.A. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27, 265-269, 2007.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. *Alimentos Funcionais: Componentes bioativos e efeitos*. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. 536 p.

CRUZ, A.G.; CADENA, R. S.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; DANTAS, C.; FERREIRA, M. M. C. PARAFAC: Adjustment for modelling consumer study covering probiotic and conventional yogurt. *Food Research International*, 45, 211-215, 2012.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; FARIA, J.A.F.; CHAVES, A.C.S.D.; CARVALHO, L.M.J.; SAAD, S.M.I. Leites Fermentados e Iogurtes Probióticos e Prebióticos. In: *Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas*. 1 ed. São Paulo:Varela, 2011, cap. 12. pp 271-304.

CLIFFE, S; FAWER, M.S.; MAIER, G.; TAKATA, K.; RITTER, G. Enzymes assays for phenolic content of natural juices. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 42, 1824-1828, 1994.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, MC.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 19, 403-11, 2009.

DAÍ, J.R.; CARDELINNA, J.H.II; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R. Zerumbone, na HIV-Inibitory and Cytotoxic Sesquiterpene of *Zingiber zerumbet* and *Zingiber aromaticum*. *Natural Product Letters*, 10,115-118, 1997.

DALE, M.M.; HAYLLET, D.G. *Farmacologia condensada*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA, 2009, 127 p.

DAS, D.; GEUL, B.; CHOI, S.B. Photosynthesis-dependents anthocyanin pigmentation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 6 , 23-25, 2011.

DEVICICH, D.A.; PEDERSEN, I.K.; PETRIE, K.J. You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48, 333–33, 2007.

DIAS, J.M.C.S.; REIS, L. Alimentos funcionais e nutracêuticos. In: *Encontro Franco Brasileiro de Biotecnologia e Biotecnologia*. Brasília, Distrito Federal, 2002.

DOUGAN, S.; TURKOGLU, I. Iron-deficiency anemia detection from hematology parameters by using decision trees. *International Journal of Science & Technology*, 3, 85-92, 2008.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189, 2006.

EPSTEIN, J.; SANDERSON, I. R.; MACDONALD, T. T. Curcumin as atherapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *British Journal of Nutrition*, 103, 1545-1557, 2010.

FAILACE, R. *Hemograma: manual de interpretação*. Porto Alegre: Artmed, 2009, 424 p.

FARIAS, F. M., ALMEIDA, A. C., FERREIRA, A. L., DUNDEE, R. J., TAKAYAMA, C., SILVA, M. S. Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 234– 243, 2012.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A.R.; JAHANIANI, F. Antiinflammatory and analgesic activity of *biebersteinia multifida* dc. root extract. *Journal Ethnopharmacology*, 71, 443-447, 2000.

FERREIRA, D.S.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; TURATTI, I.C.; BETARELLO, H.L.. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. *Revista Brasileira Farmacologia*, 84, 47-49, 2003.

FOOD, INGREDIENTES BRASIL. Extratos vegetais. Revista-fi, 11, 16-20, 2010. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>. Acesso em: 02/06/2012.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587-605, 2002.

FRANCO, R.C. *Análises comparativas de legislação referente aos alimentos funcionais*. 2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição humana aplicada)-Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo.

GALLINA, D.A.; ALVES, A.T.A.; TRENTO, F. K. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas Saúde*, 13, 239-44, 2011.

GALLINA, D.A. Leites fermentados funcionais: tendências e inovações. *Revista Ingrediente Tecnológica*, 9, 26-30, 2010.

GHIDINI, E; DELCANALE, M.; FANTI, D.R.; RIZZI, R.; MAZZUFERI, M.; RODI, D.; SIMONATO, M.; LIPRERI, M.; BASSANI, F. Synthesis and anticonvulsant activity of a class of 2-amino, 3-hydroxypropanamide and 2- aminoacetamide derivatives. *Bioorganic end Medicinal Chemistry*, 14, 63-74, 2007.

GOMES, A. C.; RODILLA, J. M. L. Diterpene lactones with labdane, halimane and clerodane frameworks. *Natural Product Communications*, 6, 497–504, 2011.

GONZALES, A.M.; ORLANDO, R.A. Curcumim and revestrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition end Metabolism*, 5, 17, 2008.

GONZÁLEZ, F.D.H.; SCHIFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F. D. H., Campos, R. (eds): Anais I Simpósio de Patologia Clínica da Região Sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 73-89. 2003

GOODMAN, L.; GILMAN, J.K. *As bases farmacológicas e terapêutica*. Mccgraw-Hill, 2007, 128 p.

GOTO, H.; SASAKI, Y.; FUSHIMI, H.; SHIBAHARA, N.; SHIMADA, Y.; KOMATSU, K. Effect of curcuma herbs on vasomotion and hemorheology in spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Chinese Medicine*. 3, 449-457, 2005.

GUGGISBERG, D.; EBERHARD, P.; ALBRECHT, B. Rheological Characterization of Set Yoghurt Produced With Additives of Native Whey Proteins. *International Dairy Journal*, 17, 1353-1359, 2007.

GUPTA, S.C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors*, 39, 2-13, 2013.

GUPTA, S. C.; SUNG, B.; KIM, J. H.; PRASAD, S.; LI, S. Multitargeting by turmeric, the golden spice: from kitchen to clinic. *Molecular Nutrition & Food Research* -, 45, 354-358, 2012.

HADDAD, M.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E. Curcuma as a parasiticidal agent: a review. *Planta Medice*, 77, 672–678, 2011.

HARRIS, L.E.; ASPLUND, J.M.; CRAMPTON, E.W. An international fed nomenclature and methods for summarizing and using fed data to calculate diets. *Utah Agricultural Experiment Station Bulletin*, 479, 47-53, 1968.

HATTINHG, A.L.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17, 2001.

HOSSAIN, S.; KADER, G.; NIKKON, F.; YEASMIN, T. Cytotoxicity of the rhizome of medical plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 125-127, 2012.

ILLUPAPALAYAM, V.; SMITH, S.C.; GAMLATH, S. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yogurt with spices. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 255-262, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Normas analíticas- métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JANG, M.K.; SOHN, D.H.; RYU, JH. A curcuminoid and sesquiterpenes as inhibitors of macrophage TNF- α release from *Curcuma zedoaria*. *Letters. Planta Medice*, 67, 550-552, 2001.

JANTAN, I.B.; YASSIN, M.S.M.; CHIN, C.B.; CHEN, L.L.; SIM, N.L. Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species. *Pharmaceutical Biology*, 41, 392–397, 2003.

JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. Tradução de Eduardo Cesar Tondo. Porto Alegre: Artmed®, 2005, 712 p.

KHURANA, H.K.; KANAWJIA, S.K. Recent trend in development of fermented milks. *Current Nutrition and Food Science*, 3, 91-108, 2007.

KIM, D. O.; HEO, H. J.; KIM, Y. J.; YANG, H. S.; LEE, C. Y. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 9921, 2005.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoides and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96, 229-45, 2004.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI M.; TAMAKI, T. Effects of the extracts and an active compound curcumenone isolated from *Curcuma zedoaria* rhizomes on alcohol-induced drunkenness in mice. *Fitoterapia*, 84, 163–169, 2013.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira Ciências Farmacêutica*, 44, 329-347, 2008.

KOSTER, R. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc.* 18, 412-421, 1959.

KULKARNI, S.K.; BHUTANI, M.K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology*, 201, 435–42, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (eds.) Robbins e Contran. *Patologia – bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, cap. 10, pp 49-90.

KUMAR, S.P.; SABIHA, M.; NISHA, R.; ANKITA, K.; ANIL, D.K. Evaluation of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* rhizome as a crude drug from their etnanolic extract. *International Research Journal of Pharmacy*, 4, 74-76, 2013.

LAJOLO, F. M. O que são os alimentos funcionais? Conceitos e componentes. Disponível em: <www.abiad.org.br/pdf/alim_funcionais_jan06.pdf>. Acesso em: 13/02/2012.

LANTZ, R.C.; CHEN, G.J.; SOLYOM, A.M; JOLAD, S.D.; TIMMERMANN, B.N. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*, 12, 445-452, 2005.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. *Plantas medicinais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica*. Campinas: UNIFESP, 2008, 144 p.

LEE, E.B.; KIM, O.J.; KANG, S.S.; JEONG, C. Araloside A, an antiulcer constituent from the root bark of *Aralia elata*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 523–526, 2005.

LEES, D.H.; FRANCIS, F.J. Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*, 7, 83-84, 1972.

LI, S.; YUAN, W.; DENG, G.; WANG, P.; YANG, P. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*, 2, 28–54, 2011.

LIMA, R.M.T.; FERRAZL, P.S.; LIMA, R.C.T.; ARAÚJO, G.T.; PAIVA, J.E.; SHINOHARA, N.K.S.; LOPES, E.J.T. *Análise microbiológica e Físico-química de bebidas Lácteas comercializadas no Recife – PE*. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Recife - PE. 2009.

LIN, W.; HWANG, C.; CHEN L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, 23, 74 - 81, 2005.

LIST, P.H.; SCHIMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical technology*. Londor: CRC Press, 1989, 374 p.

LIU, R.; ROY, S.S.; ROGER, H. C.; NEBIE, A.; ZHANG, Y.; NAIR, G.M. Functional Food Quality of *Curcuma caesia*, *Curcuma zedoaria* and *Curcuma aeruginosa* Endemic to Northeastern India. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 72–77, 2013.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal Nutrition*, 134, 3479-3485, 2004.

LIU, Y.; NAIR, M.G. *Curcuma longa* and *Curcuma mangga* leaves exhibit functional food property. *Food Chemistry*, 135, 634–640, 2012.

LOBO, R.; KIRTI, S.; PRABHU, A.; SHIRWAIKAR, A.; SHIRWAIKAR, A. *Curcuma zerumbet* (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *Pharmacy and Pharmacology*, 61, 13-21, 2009.

MAHATTANADUL, S.; NAKAMURA, T.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; PHDOONGSOMBUT, N.; TUNGSINMUNKONG, K.; BOUKING, P. Comparative antiulcer effect of bisdemethoxycurcumin and curcumin in a gastric ulcer model system. *Phytomedicine*, 16, 342–351, 2009.

MAHMOOD, A. A.; AL-BAYATY, F. H.; SALMAH, I. Enhancement of gastric ulcer by *Areca catechu* nut in ethanol-induced gastric mucosal injuries in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2562-2569, 2011.

MAKABE, H.; MARU, N.; KUWABARAM, A.; KAMO, T.; HIROTA, M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. *Natural Product Research*, 20, 7, 680–685, 2006.

MAO, C.; XIE, H.; LU, T.; KHALLIL, A.H. Studies on antiplatelet aggregation and anticoagulant action of *Curcuma phaeocaulis*. *Zhong Yao Cai*, 23, 212-213, 2002.

MARQUES, N. *Fitoterapia: Análise clínica*. São Paulo: Valeria Paschoal. 2011, 328p.

MARTINS, G.H.; KWIATKOWSKI, A.; BRACHT, L.; SRUTKOSKE, C.L.Q.; HAMINIUK, C.W.I. Perfil físico-químico, sensorial e reológico de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e suplementado com inulina. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 15, 93-102, 2013.

MATOS, F.J.A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. UFC Edições, 1997, 150 p.

MEOTTI, F. C.; LUIZ, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; KASSUYA, C. A. L.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin:

evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316, 789-96, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31-4, 1982.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 17, 94-101, 2007.

MIGUEL, P.R.; MARMITT, T.; SCHLABITZ, C.; HAUSCHILD, F.A.D.; SOUZA, C.F.V. Desenvolvimento e caracterização de "iogurte" de soja sabor morango produzido com extrato de soja desengordurado enriquecido com cálcio. *Alimento Nutrição*, 21, 57-63, 2010.

MIGUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J.M.; DIAZ-ALPERI, J.; RAMIREZ, A. The cúrcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, 37-46, 2002.

MINIM, V.P.R. *Análise Sensorial: Estudos com consumidores*. Visçosa: Ed. UFV, 2010, 308 p.

MOHANTA, T.K.; TAMBOLI, Y.; ZUBAIDHA, P.K. *Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L*. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 234- 237, 2013.

MOREIRA, M.E.C.; SANTOS, M.H.; PEREIRA, I.O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L.C.A.; SCHNEEDORF, J.M. Atividade antiinflamatória de carboidratos produzidos por fermentação aquoso de grãos de quefir. *Revista Química Nova*, 7, 1738-1742, 2008.

MORIKAWA, T.; MATSUDA, H.; NINOMIYA, K.; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs XXIX. Potent protection effects of sesquiterpenes and Curcumin from zedoariae rizoma on liver injury induced by D-galactosamine/Lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biology Pharmacol Bulletin*, 25, 627-631, 2002.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, 225, 115-21, 2003.

MUNDIM, S. A. P. *Elaboração de iogurte funcional com leite de cabra, saborizado com frutos do cerrado e suplementado com inulina*. Rio de Janeiro, 2008. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MURNIGSIH, T.; SUBEKI, M.H.; TAKAHASHI,K.; YAMASAKI, M.; YAMATO, O.; MAEDE, Y.; KATAKURA, K.; SUZUKI, M.; KOBAYASHI, S.; CHAIRUL, Y.T. Evaluation of Indohesion traditional medicinal plants agains *Plasmodium falciparum* and *Babesia gibsoni*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 829-931, 2005.

NAM, N.H. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 945–51, 2006.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenaninduced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 128, 853–859, 1999.

NAVARRO, D.F.; SOUZA, M.M.; NETO, R.A.; GOLIN, V.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL, F.V. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. *Phytomedicine*, 9, 427-432, 2002.

NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates de Galeno e Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansh. *RVq*, 3, 2009.

OHE, K.K. M. “Selective conjugate addition to zerumbone and transannular cyclization of its derivatives”. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 21, 3627-3634, 2000.

OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae):uma revisão. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s, Botucatu, 11, 92-99, 2009.

OLIVEIRA, V. M. *Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais*. Rio de Janeiro, 2006. 180f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal Fluminense.

OLIVEIRA, A.L.; PADILHA, A.D.; ORTEGA, P.R.; PETROVIEK, R.G. *Caderno de Farmácia*, UFRGS, 17, 98p, 2001.

OLSON, G.H.; BETTON, D.; ROBINSON,D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, P.; HELLER, A.“Concordance of the toxicity of

pharmaceuticals in humans and in animals.” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 56–67, 2000.

PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Review: Physiologically Functional Foods. *Brazilian Journal Food Technology*, 2, 7-19, 2008.

PAMPLONA, C.R. *Perfil fitoquímico e biológico de diferentes partes da Curcuma zedoaria (Christm.) Roscoe, (Zingiberaceae) em relação a variação sazonal*. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica)-Universidade do Vale Itajai.

PARAMASIVAM, M.; POI, R.; BANERJEE, H.; BANDYOPADHYAY, A. High performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* germplasm. *Food Chemistry*, 113, 640-644, 2009.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8, 395-400, 2001.

PASTRAS, A.; BRUNTON, N.P.; O’DONNAELL, C.; TIWARI, B. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanism and kinetics of degradation. *Trends Food Science Technology*, 21, 3-11, 2010.

PENG, C.H.; CHIU, W.T.; JUAN, C.W.; MAU, J.L.; CHEN, C.C.; PENG, C.C.; LAI, E.Y.; CHYAU, C.C. Pivotal role of curcuminoids on the antimutagenic activity of *Curcuma zedoaria* extracts. *Drug and Chemical Toxicology*, 33, 64-76, 2010.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLUCKE, A.P.B. *Alimentos Funcionais: Introdução as principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95p.

POLICEGOUDRA, R.S.; ARADHYA, S.M. Structure and biochemical properties of starch from an unconventional source—Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *Food Hydrocolloids*, 22, 513–519, 2008.

POSSETI, A.; CARVALHO, J.E.; MONTEIRO, K.M.; DIAS, I.M.G.; GIBRIM, N.F.; JACOBUCCI, H.B. Antiulcer activity and mechanism of fermented food based on wheat and soy beans used as functional food. *GED: Gastroenterologia Endoscopia Digestiva*, 30, 125-131, 2011.

POZZI, A.C.S. *Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do “maracujá”*. São Paulo, 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em

Ciências na área de Química Analítica) -Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. *Tecnologia farmacêutica*. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian. 1995. 569p.

RABELO, O.L. *Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa de pequi (Caryocar spp) processado e in natura*. São Paulo, 2010, 100f Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RAJASEKARAN, S.A. Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. *World Journal Gastrointest Pathophysiol*, 15, 1-14, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007, 848 p.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar. Análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. *Revista de Sociologia e Política*, 16, 85-100, 2008.

RAZI, A.S.; ONJIA, B.; POTKONJAK, J. Determination of metal content in some herbal drugs empirical and chemometric approach. *Talanta*, 67, 233-239. 2005.

RIL, F.T.; LOCH, C.R.; VALDUGA, A.T.; MACEDO, S.M.D.; CICHOSKI, A.J. Scientific Note: Biochemical profile of rats fed yogurt containing yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14, 332-337, 2011.

RÍOS, E. V.; DUQUE, A.L.C.; LEÓN, D.F.R. Spectroscopy and chromatography characterization of curcumin extracted from the rhizome of turmeric crops in the department of Quindío (Colombia). *Revista Investiga Universidad Quindio*, 19, 18-22. 2009.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. *Gastroenterology*, 77, 433-443, 1979.

ROCHA, N.F.M.; OLIVEIRA, G.V.; ARAÚJO, F.Y.R.; RIOS, E.R.V.; CARVALHO, A.M.R. ; VASCONCELOS, L.F.; MACEDO, D.S.; SOARES, P.M.G.; DE SOUZA, D.P.; SOUZA, F.C.F. (-)- α - Bisabolol-induced gastroprotection is associated with

reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 455-461, 2011.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Probiótico e prebiótico em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas*. São Paulo: Varela, 2011. 598 p.

SAIDU, Y. L. S.; BILBIS, M. L.; ISEZUO, S. A. ; HASSAN, S. W.; ABBAS, A. Y. Acute and sub-chronic toxicity studies of crude aqueous extract of *Albizzia chevalieri* harms (Leguminosae). *Asian Journal of Biochemistry*, 4, 224–236, 2007.

SALVEMINE, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 18, 829-838, 1996.

SCHAFFER, M.; SCHAFFER, M.P.; ZIDAN, J.; SELA, G.B. Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14, 588–597, 2011.

SCHIMIDT, D.F.N. *Estudo Químico, Farmacológico e Biológico dos Rizomas de Curcuma zedoaria (ZINGIBERACEAE)*. Florianópolis, 2000. 109f. Dissertação (Mestrado em Química)-Curso de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. Barueri: Manole, 2002. 406p.

SEVERI, J.A.; LIMA, Z.P.; KUSHIMA, H.; BRITO, A.R.M.S.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Polyphenols with antiulcerogenic action from aqueous decoction of mango leaves (*Mangifera indica* L.). *Molecules*, 14, 1098–1110, 2009.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907, 2000.

SILVA, L.; GOMES, A. C.; RODILLA, J. M. L. Diterpene lactones with labdane, halimane and clerodane frameworks. *Natural Product Communications*, 6, 497–504, 2011.

SILVA, M.S.; ALMEIDA, A.C.A.; FARIA, F.M.; FERREIRA, A.L.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; PELLIZZON, C.A.; BRITO, A.R.M. Abarema cochliacarpus: Gastroprotective and ulcer-healing activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 134-142, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo:Varela, 1997a. 317p.

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C; OLIVEIRA, L; COSTA JÚNIOR, L.C.G. *Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos*. Minas Gerais. 1997b.190p.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 18, 618-26, 2008.

SINGH, G.; KAPOOR, I.; SINGH, P. Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2, 1745-4549, 2011.

SINGH, S.; GUPTA, A.K. Evaluation of Phenolics Content, Flavonoids and Antioxidant activity of *Curcuma amada* (Mango Ginger) and *Zingiber officinale* (Ginger). Research and Reviews: *Journal of Chemistry*, 2, 32-35, 2013.

SINGH, P.; SINGH, S.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, G.; ISIDOROV, V.; SZCZEPANIAK L. Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part 74. *Food Bioscience*, 3, 42-48, 2013.

SMITH, J E; ROWAN, N J; SULLIVAN, R. 2007. Regulatory and safety criteria for functional foods and dietary supplements and pharmaceutical medicines; the role for medicinal mushrooms. Chapter 9. In: *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. Disponível em: <www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt9.pdf>. Acesso em: 13/ 02/ 2014.

SOARES, L.Y.V. ALVES, M. 2004. Estudo fitoquímico e farmacológico dos constituintes fixos e voláteis de *Hedygium coronarium* J. Koeng (Zingiberaceae). Universidade Federal de Rondonia, Departamento de Química. Disponível em: www.unir.br/.../. Acesso: 23 de dezembro de 2012.

SOSHI, S.C.; MATHELA, C.S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil and its constituents furanodienone and curzerenone from *Lindera pulcherrina* (Nees) Benth. Ex Hook.f. *Phcog Revision*. 4, 80-84, 2012.

SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M.R.G.; RODRIGUES, R.S. *Experimentação com Animais de laboratório*, Manual básico. Pelotas: Editora Universitária/UFPEL, 2009. 468p.

SOUZA, S.R.; STARKE, M.L.; FERNANDES, M.S. Teores e qualidade das proteínas de reserva de arroz, em função de aplicação suplementares de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28, 575-583, 1993.

SRIVASTAVA, S.; MEHROTRA, S.; RAWAT, A. Pharmacognostic evaluation of the rhizomes of *Curcuma zedoaria* Rosc. *Pharmacognosy Journal*. 3, 20-25, 2011.

STRIMPAKOS, A.S.; SHARMA, R.A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants Redox Signaling*, 10, 511–545, 2008.

SUH, H.W.; CHOI, S.S.; LEE, J.K.; LEE, H.K.; HAN, E.J.; LEE, J. Regulation of c-fos and c-jun gene expression by lipopolysaccharide and cytokines in primary cultured astrocytes: effect of PKA and PKC pathways. *Archives of Pharmacal Research*, 27, 396–401, 2000.

SUKARI, M.A; WAH, T.S.; SAAD,S.M.D.; RASHID, N.Y.; RAHMANI, M.; LAJIS, N.H.; HIN, T.Y.Y. Bioactive sesquiterpenes from *Curcuma ochrorhiza* and *Curcuma heyneana*. *Natural Product Research*, 24, 9, 838–845, 2011.

SZABO, S.; BROWN, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Experimental Biology and Medicine*, 185, 493-497, 1987.

SZABO, S.; GOLDBERG, I. Experimental pathogenesis: drugs and chemical in the gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterol*, 174, 1-8, 1990.

TAMINE, A.Y.; ROBINSON,R.K. *Yogurt: Science and Technology*. New York: CRC Press. 2007. 791p.

TANAKA, T.M. SHIMIZU. “Chemoprevention of azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci by dietary zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet*. *Life Sciences*, 69, 1935-1945, 2001.

TEIXEIRA, A.P. Anvisa registra 91 alimentos funcionais em 2013. Disponível em:< www.abifisa.org.br/noticia/11-02-2014-anvisa-registra-91-alimentos-funcionais-em-2013>. Acesso em: 10/04/2014.

TIBI, S. The medical use of opium in ninth-century Baghdah. *Social History of Medicine*, 21, 192-193, 2008.

TSINMAN, K.; AVDEEF, A.O.; TSINMAN, D.; VOLOBOY. *Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. Pharmaceutical Research*. 26, 2093-2100. 2009.

VALADARES, MC. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 93-98, 2006.

VASCONCELOS, P. C. P.; ANDREO, M.A.; VILEGAS, W.; HIURUMA, L.C.A.; PELLIZON, C.H. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 146-153, 2010.

VÁZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue & Cell*, 39, 151-160, 2007.

WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Journal Neuropharmacology*, 3, 369-378, 1964.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; HUGO, G.W. TROVATO, A. Carrageenan-induced o edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Perspectives in Biology and Medicine*, 111, 544-547, 1962.

WORLD HEALTH ORGANISATION-WHO. Report of a WHO consultation, Geneva: WHO, 1998.

WOOLFE, G.; DONALD, M.A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* , 80, 300-307, 1944.

WRIGHT, R. The Herbs & Botanicals Market: Returning to its Roots. *Nutraceuticals World*. 2, 29-31, 2006.

WU, S.J.; TAM, K.W.; TSAI, Y.H.; CHANG, C.C.; CHAO, J.C.J. Curcumin and saikosaponin A inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats. *American Journal Chinese Medicine*, 38, 99-111, 2010.

XIANG, Z.; WANG, X.; GAO, H.; ZHANG, M.; ZENG, S. GC-MS and hplc metabolic profiling studies of curcuma wenyujin rhizomes obtained at different harvest times. *Analytical Letters*, 45, 1–14, 2012.

YANG, F.Q.; WANG, H.K.; CHEN, H.; CHEN, J.D.; XIA, Z.N. Fractionation of Volatile Constituents from Curcuma Rhizome by Preparative Gas Chromatography. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 6, 145-151, 2011.

YANG, F.Q.; LI, S.P.; ZHAO, J.; LAO, S.C.; WANG, Y.T. Optimization of GC-MS conditions based on resolution and stability of analytes simultaneous determination of nine sesquiterpenoids in three species of *Curcuma* rhizomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 73-82, 2007.

YANG, F.Q.; LI, S.P.; WANG, Y.T.; CHEN, Y.; LAO, S.C. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of *Curcuma* rhizomes by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 552-558, 2005.

YODKEEREE, S.; AMPASAVATE, C.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B.; LIMTRAKUL, P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *European Journal of pharmacology*, 10, 8–15, 2010.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3, 24-28, 2006.

ZATTA, D.T.; PIMENTA, F.C.; TRESVENZOL, L.M.F.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; PUCCI, L.L.; GARROTE, C.F.D.; OLIVEIRA, F.N.M.; PAULA, J.R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. *Latin American Journal Pharmacology*, 28, 485-9, 2009.

ZHANG, J.S.; GUAN, J.; YANG, F.Q.; LIU, H.G.; CHENG, X.J.; LI, S.P. Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1024-1028, 2008.

ZHOU, L.; ZHANG, K.; LI, J.; CUI, X.; WANG, A.; HUANG, S.; ZHENG, S.; LU, Y.; CHEN, W. Inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis involved in reproductive toxicity induced by sesquiterpenoids of *Curcuma zedoaria* in rats. *Reproductive Toxicology*, 37, 62-69, 2013.

ZHU, K.; FAN, Z.; XU, C.; JIA, L. Studies on impact of health factor on yogurt consumption behaviors of Beijing consumers. *Journal of Chinese Institute of Food Science e Technology*, 9, 185-188, 2009.