

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTO E
HIDROALCOÓLICO DO GENGIBRE AMARGO (*Zingiber
zerumbet* L. Smith) DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA O
ENCAPSULAMENTO FUNCIONAL.

DANIELY DA SILVA PINHEIRO MACHADO

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

DANIELY DA SILVA PINHEIRO MACHADO

ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTO E
HIDROALCOÓLICO DO GENGIBRE AMARGO (*Zingiber
zerumbet* L. Smith) DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA O
ENCAPSULAMENTO FUNCIONAL.

Projeto de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutor (a) em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

ORIENTADORA: Profa. Doutora Rosany Piccolotto Carvalho

COORIENTADOR: Doutor Carlos Cleomir de Souza Pinheiro

MANAUS

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

MACHADO, DANIELY DA SILVA PINHEIRO.

“ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTO E HIDROALCOÓLICO DO GENGIBRE AMARGO (*Zingiber zerumbet* L. Smith) DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA O ENCAPSULAMENTO FUNCIONAL”. / Daniely da Silva Pinheiro Machado, Manaus- AM, 2014.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Curso de Pós-graduação multi-Institucional em Biotecnologia.

“STUDY PHARMACOLOGICAL OF GROSS AND HYDROALCOHOLIC EXTRACTS WILD GINGER (*Zingiber zerumbet* L. Smith) THE AMAZON REGION FOR ENCAPSULATION FUNCTIONAL”

Palavras-chave: 1. Zerumbona 2. Alimento funcional 3. Analgésico 4. Anti-inflamatório

Sinopse:

A tese apresenta a potencialidade dos extratos: bruto e hidroalcoólico dos rizomas do Gengibre amargo (*Zingiber zerumbet* L. Smith). O screening farmacológico revelaram atividades para antiulcera, analgésica e anti-inflamatória. No screening fitoquímico os extratos indicaram a presença de fenóis, taninos, alcalóides e flavonóides. Portanto, os extratos bruto e hidroalcoólico encapsulados podem apresentar um alimento funcional, a fim de introduzir um produto biotecnológico diferenciado no mercado e contribuir para os estudos científicos desta valiosa planta etnomedicinal.

Palavras-chave: 1. Zerumbona 2. Alimento funcional 3. Analgésico 4. Anti-inflamatório.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniely da Silva Pinheiro Machado

ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTO E HIDROALCOÓLICO DO GENGIBRE AMARGO (*Zingiber zerumbet* L. Smith) DA REGIÃO AMAZÔNICA PARA O ENCAPSULAMENTO FUNCIONAL.

Projeto de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutor (a) em Biotecnologia,

Área de concentração: Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Um Sim para um mundo melhor!

“És minha força Senhor... Meu Rochedo... És Meu amparo em teus braços, segura estou... Digo Sim à Vida... Digo Sim a tudo que me destes...”

Maria Paula do Cordeiro Imolado

(Comunidade Aliança de Misericórdia)

“Para Deus nada é impossível”. E Maria disse: “eis aqui a Escrava do Senhor faça se em mim segundo a tua palavra” (Lucas 1, 37-38)

DEDICATÓRIA

Em especial ao meu DEUS todo poderoso,

Ao meu esposo maravilhoso Marcus Paulo Machado,

As nossas lindas filhas Maria Giovanna Machado e Maria Clara Machado,

Ao meu querido Pai Carlos Cleomir Pinheiro,

A minha linda mãe Irlânia Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** que me deu o mais valioso presente, o dom da vida! És o meu Tudo! O meu AMADO SENHOR, O meu Salvador, *Jesus eu confio em vós!* E pela intercessão de Nossa Senhora, Maria, aquela que disse SIM para um mundo melhor.

Ao meu esposo **Marcus Paulo Machado**, as nossas lindas filhas **Maria Giovanna Machado** e **Maria Clara Machado**, obrigada meu José por toda a confiança depositada e todo incentivo, pelo seu amor, um amor que é alicercado na Rocha! Eu o amo muito, as nossas filhas, vocês são um grande Presente de Deus em nossas vidas! Eu amo a minha linda sagrada família!

Aos meus Pais, **Carlos Cleomir Pinheiro** e **Irlânia Pinheiro**, e a minha irmã **Laryssa Pinheiro**, vocês são a minha base, obrigada por tudo, se hoje sou o que sou, é graças a vocês, por terem me gerado com tanto amor, foi por causa do sacrifício e dedicação em cuidar de mim. Amo vocês.

À minha Tia Madrinha **Ilza Pryor** que tanto sonhou e incentivou a cada passo dado na minha vida acadêmica!

À minha Orientadora Professora Dra. **Rosany Piccolotto Carvalho**, por toda a ajuda e paciência.

A minha amiga **Márcia Seixas**, obrigada mana, por toda ajuda, pelas vezes que contei com você e você estava sempre disposta a me ajudar.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório Temático de Química e Produtos Naturais, **Luiziane Mendonça**, **Márcia Moura** e **Rodrigo Queiroz**, que muito contribuíram para o trabalho.

Aos técnicos, a todo o pessoal do **Biotério Central do INPA**, obrigada por toda a ajuda e dedicação.

Aos técnicos do **Laboratório de Tecnologia de alimentos/CPCS-INPA**, **Laboratório de Análise de Solos/INPA**, a Profa. Doutora **Denise Moraes** do Laboratório de Ciências Fisiológicas-UFAM, ao Prof. Dr. **Fernando José Barcellos** do Laboratório de Histologia-UFAM pelas análises realizadas do *Zingiber zerumbet*.

Aos meus amigos da Comunidade Católica Aliança de Misericórdia, em especial: **Marcos Marcelino**, **Vanessa Santos**, **Vitalina**, **Solange**, **Chiara** e **Zé Francisco**, pelas orações e por me fazer acreditar que para Deus nada é impossível!

Ao Prof. Dr. **Edmaz Vaz**, por todo incentivo e ajuda!

A não poderia jamais esquecer... é claro que não... Dos mártires deste trabalho! Os meus amigos **Ratos** e **Camundongos**, muito obrigada pela participação de vocês!

A **CAPES- CNPQ** pelo o incentivo da bolsa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Alimentos funcionais.....	5
2.2 Gengibre amargo <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith.....	7
2.2.1 Aspectos botânicos.....	7
2.2.2 Uso Tradicional.....	8
2.2.3 Teores fitoquímicos da Planta.....	9
2.2.4 Zerumbona (ZER).....	10
2.2.5 Atividades Biológicas.....	11
2.2.6 Toxicologia.....	14
2.2.7 Atividade anti-úlceras.....	14
2.2.8 Atividade nociceptiva.....	15
2.2.9 Atividade anti-inflamatória.....	17
2.3 Encapsulamento de alimentos funcionais.....	18
3.OBJETIVOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 METODOLOGIA (PARTE I)-CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	24
4.1.2 Coleta da Planta.....	24
4.1.3 Técnicas de Extrações.....	24
4.1.3.1 Extrato Bruto.....	24
4.1.3.2 Extrato Hidroalcoólico.....	24
4.1.3.3 Óleo essencial.....	25
4.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	25
4.1.8 Prospecção de constituintes dos extratos.....	26
4.1.8.1 Teste para fenóis e taninos.....	26

4.1.8.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	26
4.1.8.3 Teste de Dragendorff.....	27
4.1.9 Atividade Antioxidante - Atividade sequestradora do radical (DPPH).....	27
4.2 METODOLOGIA (PARTE II)- Análise Físico-química.....	28
4.2.1 Determinação de minerais dos rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i>	28
4.2.2 Composição centesimal.....	29
4.2.2.1 Determinação do Teor da Umidade.....	29
4.2.2.2 Determinação do Teor de Cinzas.....	29
4.2.2.3 Determinação do Teor de Lípidios.....	30
4.2.2.4 Determinação do teor de Proteínas.....	30
4.2.2.5 Determinação do Teor de Carboidratos.....	31
4.2.2.6 Determinação do Teor de Fibras totais.....	31
4.2.2.7 Determinação do Valor Energético.....	31
4.3 METODOLOGIA (PARTE III)- Estudo Toxicológico e Farmacológico.....	32
4.3.1 Teste de Citotoxicidade.....	32
4.3.1.1 Ensaios de Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	32
4.3.2 Toxicologia Pré-Clínica.....	32
4.3.2.1 Animais Experimentais para o estudo de toxicologia pré-clínica e farmacológico	32
4.3.2.2 Animais experimentais utilizada para os testes de toxicologia aguda.....	33
4.3.2.3 Teste de toxicidade aguda.....	34
4.3.2.4 Teste de atividade de Tônus muscular (Teste do Bastão) com os grupos de animais do teste de toxicidade aguda	35
4.3.2.5 Teste de atividade exploratória (Teste do Campo-aberto) com os grupos de animais do teste de toxicidade aguda	35
4.3.2.6 Animais experimentais utilizados para os testes de toxicologia sub-aguda (doses repetidas ou dose subcrônica).	36
4.3.2.7 Teste de toxicidade sub-aguda (doses repetidas ou dose subcrônica).....	38
4.3.1 Atividade Anti-úlceras.....	38

4.3.3.1 Animais experimentais para a Atividade Anti-úlceras.....	38
4.3.3.2 Atividade anti-úlceras induzida por etanol.....	39
4.3.4 Atividade nociceptiva.....	40
4.3.4.1 Animais experimentais no teste de Contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos	40
4.3.4.2 Teste de Contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos.	41
4.3.4.3 Animais experimentais no teste da placa quente.....	41
4.3.4.4 Teste da placa quente.....	42
4.3.4.5 Animais experimentais utilizados para o teste de Analgesia (Dor inflamatória causada por estímulo mecânico)	43
4.3.4.6 Modelo de medida da Analgesia utilizando o aparelho analgesímetro (Dor inflamatória causada por estímulo mecânico)	43
4.3.5 Atividade Anti-inflamatória.....	44
4.3.5.1 Animais experimentais utilizados no teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina (Dor inflamatória causada por estímulo químico)	44
4.3.5.2 Edema de Pata Induzido por Carragenina (Dor inflamatória causada por estímulo químico)	45
4.3.5.3 Animais experimentais utilizados para o teste de Edema de orelha induzido por formol	46
4.3.5.4 Edema de orelha induzido por formol.....	47
4.4 METODOLOGIA (PARTE IV)- Análise Microbiológica.....	48
4.4.1 Atividade Anti- <i>Helicobacter pylori</i>	48
4.5 METODOLOGIA (PARTE V)- Aplicação Biotecnológica do extrato bruto (EAZZ) e hidroalcolico (EHZZ) de <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith (ZZ)	48
4.5.1 Desenvolvimento de cápsulas de EAZZ e EHZZ.....	48
4.5.1.1 Produção das cápsulas.....	48
4.6 METODOLOGIA (PARTE VI)- Análise Estatística.....	50
4.6.1 Análises estatísticas dos experimentos	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Caracterização Fitoquímica.....	50

5.1.1 Rendimento do extrato.....	50
5.1.2 Propriedades organolépticas e pH dos extratos.....	50
5.1.3 <i>Screening</i> Fitoquímico.....	51
5.1.4 Análise Cromatográfica Cromatografia em Camada Delgada.....	54
5.2 Análise Físico-química.....	57
5.2.1 Determinação de minerais.....	57
5.2.2 Composição Centesimal.....	58
5.2.3 Atividade Antioxidante.....	59
5.3 Estudo toxicológico e Farmacológico.....	61
5.3.1 Ensaio de citotoxicidade.....	61
5.3.2 Toxicidade aguda - Avaliação comportamental e Sistêmica.....	63
5.3.2 Toxicidade aguda - Avaliação comportamental e Sistêmica.....	63
5.3.2.1 Teste do Bastão.....	65
5.3.3 Toxicidade Subcrônica	67
5.3.4 Análises hematológicas.....	71
5.3.5 Análises Bioquímicas	75
5.3.6 Análises Peso dos órgãos	78
5.3.7 Análises Macroscópicas dos órgãos.....	80
5.3.8 Análises Histopatológicas.....	80
5.4 Atividade Anti-úlceras.....	83
5.3.4 Atividade Antinociceptiva.....	86
5.3.4.1 Teste de contorção abdominal por ácido acético.....	86
5.3.4.2 Teste da Placa Quente.....	89
5.5.3 Analgesímetro.....	93
5.6 Atividade Anti-inflamatória.....	95
5.6.1 Edema de Pata induzida por Carragenina (Dor inflamatória causada por	95

estímulo químico)	
5.6.2 Edema de Orelha.....	99
5.7 Análise Microbiológica.....	80
5.7.1 Atividade Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (Gastroprotetora).....	80
6. CONCLUSÕES.....	103
7. PERSPECTIVAS.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Informação Global de Herbários que armazenam a planta <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith.	7
Figura 2- Rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	8
Figura 3- Flor de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith	8
Figura 4- Estrutura química da Zerumbona	10
Figura 5- Cromatograma e cálculo do Rf	25
Figura 6- Teste do Campo-aberto	35
Figura 7- Teste da Placa quente	42
Figura 8- Aparelho Analgesímetro	44
Figura 9- Atividade Edema de Pata.	46
Figura 10- Atividade Edema de Orelha	47
Figura 11- Encapsuladora semi-automática	49
Figura 12- Extrato bruto de <i>Zingiber zerumbet</i>	52
Figura 13- Extrato hidroalcoólico de <i>Zingiber zerumbet</i>	52
Figura 14- Placa CCD de Zerumbona revelada em iodo.	56
Figura 15- Placa CCD de Zerumbona e EHZZ revelada em UV 254nm	56
Figura 16- Placa CCD de Zerumbona e EHZZ revelada em UV 365nm	56
Figura 17- Potencial antioxidante de EBZZ frente ao radical livre DPPH.	59
Figura 18- Potencial antioxidante de EHZZ frente ao radical livre DPPH.	60
Figura 19- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetidos ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 1000 mg/kg.	80
Figura 20- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 2000 mg/kg.	81
Figura 21- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg.	81
Figura 22- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 1000 mg/kg.	82

Figura 23-	A e B: Fígado de Rato wistar macho, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 2000 mg/kg.	82
Figura 24-	Fígado de Rato wistar macho, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg.	82
Figura 25-	Fígado de Rato wistar fêmea, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg.	82
Figura 26-	- Fígado de A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram tratados apenas com veículo (grupo controle).	83
Figura 27-	Atividade anti-úlceras, resultado da porcentagem de inibição utilizando como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ).	84
Figura 28-	Atividade antiúlceras, porcentagem de inibição utilizando como teste o extrato bruto (EBZZ).	85
Figura 29-	Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético utilizando como padrão a Ketamina e como teste o extrato bruto (EBZZ). O número de contorções versus o tempo em min.	88
Figura 30-	Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético utilizando como padrão a Ketamina e como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ). O número de contorções versus o tempo em min	88
Figura 31-	Teste da placa quente utilizando como padrão a Ketamina e o extrato bruto (EBZZ) como teste. O tempo de permanência do animal na placa versus o tempo em min	90
Figura 32-	Teste da placa quente utilizando como padrão a Ketamina e o extrato hidroalcoólico (EHZZ) como teste. O tempo de permanência do animal na placa versus o tempo em min.	91
Figura 33-	Efeitos da administração do extrato bruto (100 e 500 mg/kg), Ketamina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos utilizando o analgésímetro.	93
Figura 34-	Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico (100 e 500 mg/kg), Ketamina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos utilizando o analgésímetro.	94
Figura 35-	Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico (100 a 500 mg/kg), indometacina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c) na pata traseira esquerda.	96

-
- Figura 36-** Efeitos da administração do extrato bruto (100 a 500 mg/kg), indometacina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c) na pata traseira esquerda. 97
- Figura 37-** Efeito do extrato bruto (100 e 300 mg/kg) e indometacina (50 mg/kg) via oral sobre o estímulo inflamatório pelo formol em camundongos (n=6). Os valores em cada coluna representam a média \pm DP da diferença entre as orelhas (mg) *Indica diferença significativa em relação ao basal (p<0,05). 100
- Figura 38-** Efeito do extrato hidroalcoólico (100 e 300 mg/kg) e indometacina (50 mg/kg) via oral sobre o estímulo inflamatório pelo formol em camundongos (n=6). Os valores em cada coluna representam a média \pm DP da diferença entre as orelhas (mg) *Indica diferença significativa em relação ao basal (p<0,05). 101

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Algumas propriedades medicinais de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith.	12
Tabela 2- Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.	27
Tabela 3- Parâmetros observados para o teste de Toxicidade aguda.	36
Tabela 4- Escala para avaliação da ulceração da mucosa gástrica em Camundongos	39
Tabela 5- Prospecção fitoquímica dos extratos bruto e hidroalcoólico de <i>Zingiber zerumbet</i> .	53
Tabela 6- Cromatografia de camada delgada dos extratos bruto e hidroalcoólico de ZZ.	54
Tabela 7- Análise de Teor de Minerais dos rizomas secos de gengibre amargo <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith em Manaus- AM	57
Tabela 8- Análise Centesimal dos rizomas secos e extrato bruto liofilizado do gengibre amargo <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith em Manaus- AM.	58
Tabela 9- Percentuais de inibição do DPPH para amostras do Extrato bruto de ZZ.	59
Tabela 10- Percentuais de inibição do DPPH para amostras do Extrato hidroalcoólico de ZZ.	60
Tabela 11- Percentual de mortalidade das larvas de <i>Artemia salina</i> utilizando várias concentrações do extrato bruto de <i>Z.zerumbet</i> teste.	62
Tabela 12- Percentual de mortalidade das larvas de <i>Artemia salina</i> utilizando várias concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet</i> como teste.	62
Tabela 13- Avaliação comportamental do extrato bruto dos rizomas de ZZ via oral	59
Tabela 14- Avaliação comportamental do extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ via oral.	60
Tabela 15- Teste do Bastão tempo dos animais sobre o bastão antes e após o tratamento com o extrato bruto de ZZ.	66

Tabela 16-	Teste do Bastão tempo dos animais sobre o bastão antes e após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de ZZ.	66
Tabela 17-	Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos.	67
Tabela 18-	Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos.	68
Tabela 19-	Efeito da Administração oral do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos, consumo de água, ração, volume de urina e fezes em 24 horas na gaiola metabólica.	69
Tabela 20-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos, consumo de água, ração, volume de urina e fezes em 24 horas na gaiola metabólica.	70
Tabela 21-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas, parâmetros hematológicos.	71
Tabela 22-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar Machos, parâmetros hematológicos.	72
Tabela 23-	Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas, parâmetros hematológicos.	73
Tabela 24-	Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar machos, parâmetros hematológicos.	74
Tabela 25-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos wistar fêmeas e machos, parâmetros Bioquímicos.	75
Tabela 26-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos, parâmetros Bioquímicos.	77
Tabela 27-	Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos, peso dos órgãos animais.	78
Tabela 28-	Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de <i>Z. zerumbet L. Smith</i> em ratos Wistar fêmeas e machos, peso dos	79

	órgãos animais.	
Tabela 29-	Efeito do Extrato bruto do gengibre amargo e de Ranitidina em lesões gástricas induzidos por etanol em camundongos.	83
Tabela 30-	Efeito do Extrato hidroalcoólico do gengibre amargo e de Ranitidina em lesões gástricas induzidos por etanol em camundongos	83
Tabela 31-	Teste de contorção abdominal por ácido acético utilizando como teste o extrato bruto (EBZZ) dos rizomas de ZZ	85
Tabela 32-	Teste de contorção abdominal por ácido acético utilizando como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ) dos rizomas de ZZ	87
Tabela 33-	Teste da placa quente utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ	87
Tabela 34-	Teste da placa quente utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ.	90
Tabela 35-	Teste de Hiperalgisia utilizando o extrato bruto dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i>	91
Tabela 36-	Teste de Hiperalgisia utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ.	93
Tabela 37-	Edema de Pata utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ	94
Tabela 38-	Edema de Pata utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ	96
Tabela 39-	Atividade Antibacteriana frente a <i>H. pylori</i> utilizando o extrato bruto, Extrato Hidroalcoólico e óleo essencial dos rizomas de ZZ	97
Tabela 40-	Edema de Orelha utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ.	99
Tabela 41-	Edema de Orelha utilizando o extrato Hidroalcoólico dos rizomas de ZZ.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ZZ	= <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith
ZER	= Zerumbona
EBZZ	= Extrato Bruto dos rizomas de <i>ZZ</i>
EHZZ	= Extrato Hidroalcoólico dos rizomas de <i>ZZ</i>
INPA	= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
UFAM	= Universidade Federal do Amazonas
CIM	= Concentração inibitória mínima
CI50	= Concentração máxima inibitória
CL50	= Concentração Letal Média
DP	= Desvio Padrão
DL50	= Dose letal média
v.o	= Via Oral
i.p	= Via intraperitoneal

RESUMO

Alimento funcional é aquele que apresenta em sua formulação uma ou mais substâncias que comprovadamente além de nutrir tenha uma função benéfica ao organismo. Alimentos apresentados em cápsula, comprimidos e tabletes, constituídos de partes comestíveis de frutas e vegetais submetidos a processamento de secagem ou desidratação, devem ser avaliados como novos alimentos. O *Zingiber zerumbet* L. Smith (ZZ) é um importante membro da família Zingiberaceae tem sido tradicionalmente usado na medicina popular em todo o mundo, especialmente no Sul asiático, incluindo a Índia. Essa espécie é divulgada internacionalmente, principalmente pela fabricação de xampu elaborado da flor e apresenta inúmeras propriedades medicinais tais como: atividade anti-inflamatório, antitumoral, anti-alérgica, antipirético e atividade anti-agregação plaquetária. A Zerumbona, o princípio ativo extraído dos rizomas da planta é uma substância de alto poder terapêutico. Neste contexto, o presente trabalho propõe o encapsulamento dos extratos aquoso e hidroalcoólico dos rizomas de ZZ, para as mesmas serem utilizadas como alimento funcional, portanto, foi necessário avaliar algumas atividades e também a toxicidade dos extratos. Para o extrato aquoso (EAZZ) os rizomas de ZZ foram processados, e para o extrato hidroalcoólico os rizomas triturados foram submetidos ao processo de maceração. A determinação de minerais dos rizomas de ZZ foi pelo método da AOAC (1995). O *screening* fitoquímico dos extratos foi através da metodologia de Mattos (1997). A Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel utilizando como reveladores o iodo, sulfato sérico e UV 254nm e 365nm. Foram utilizados camundongos para o teste de toxicidade aguda sendo avaliados durante 14 dias, para o teste de citotoxicidade, o teste com *Artemia salina* segundo Meyer (1982). Para a atividade anti-úlceras foi utilizado o modelo gástrico de indução por etanol em camundongos, e a atividade antinociceptiva foi verificada através dos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético, teste de placa quente e hiperalgesia. A atividade anti-inflamatória foi avaliada os Edema de pata em ratos e Edema de orelha em camundongos. Dos resultados preliminares, obteve-se um teor extrativo de 60g de EBZZ e 10g de EHZZ, em um percentual de 1% e 0,16%, respectivamente. Os extratos possuem um odor característico. Na determinação de minerais dos rizomas de ZZ existe maior quantidade de ferro (231 mg/kg). O *screening* fitoquímico de EBZZ e EHZZ revelou a presença dos seguintes compostos: xantonas, flavonóides, fenóis, taninos e alcalóides. Na CCD do EBZZ indicou uma mancha revelada no iodo com o fator de retenção de aproximadamente 0,7 cm semelhante ao da Zerumbona (0,8) e EHZZ apresentou três manchas reveladas em iodo e UV 254nm. Na toxicidade aguda e subcrônica, pode-se afirmar que os extratos EBZZ e EHZZ não produzem nenhuma toxicidade ou mortalidade em camundongos e ratos. EBZZ e EHZZ apresentaram uma CL50 de 117.49 e 181.9µg/mL no teste de citotoxicidade com *Artemia salina*. Os extratos tiveram um potente efeito inibitório contra lesões gástricas, possuem efeito gastroprotetor. Na avaliação do teste de contorção abdominal pode-se constatar que EBZZ e EHZZ nas doses de 250 e 500 mg/kg produziram um efeito anti-nociceptível significativo. No teste de placa quente e hiperalgesia os extratos demonstraram que possuem atividade analgésica. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi significativa na ação fisiológica em determinadas doses em modelos de dor inflamatória causada por estímulo químico. De acordo com os resultados preliminares de EBZZ e EHZZ ambos apresentaram efeitos antinociceptível, anti-inflamatório e anti-ulceroso, e não tiveram toxicidade, possivelmente os extratos podem ser encapsulados como alimento funcional introduzindo um produto biotecnológico diferenciado no mercado e contribuindo para os estudos científicos desta valiosa planta medicinal.

Palavras-chave: 1. Zerumbona 2. Extrato bruto 3. Extrato hidroalcoólico 4. Alimento funcional 5. Analgésico 6. Anti-inflamatório

ABSTRACT

Functional food is the one presenting in its formulation one or more substances, which have proved to both nourish the organism and hold a beneficial function for it. Foods presented in capsules or pills constituted by edible pieces of fruits and vegetables which, have been submitted to drying or dehydration processing, must be assessed as being novel. *Zingiber zerumbet* L. Smith (ZZ), an important member of family Zingiberaceae, used traditionally in folk medicine throughout the world, especially in the south of Asia including India. This species is marketed worldwide, mostly through the manufacture of the shampoo elaborated from its flower and, it presents countless medicinal properties, such as anti-inflammatory, antitumor, anti-allergic, antipyretic and anti-platelet aggregation activities. Zerumbona, the major active component extracted from the plant rhizome is a highly therapeutic-powered substance. Under this context, the present work proposes to encapsulate the aqueous and hydroalcoholic extracts from the rhizome of ZZ for being utilized as functional food, therefore, it was necessary to assess some their medicinal and toxic activities. ZZ rhizomes were processed for attaining the gross extract (ZZGE), and ground and submitted to maceration for achieving hydroalcoholic extracts. Determination of the minerals held by rhizomes of ZZ was determined by the AOAC (1995) method. The phytochemical *screening* of the extracts was carried out through Mattos (1997) methodology. Thin Layer Chromatography (TLC) in silica gel utilized iodine, serum sulfate, UV 254nm and 365nm as developers. The test with *Artemia salina* according to Meyer (1982) was employed for the cytotoxicity assay. Mice were utilized for the acute toxicity test, and followed up for 14 days. The ethanol-induced gastric model was utilized to determine the anti-ulcer activity. The anti-nociceptive activity was ascertained through acetic acid-induced abdominal writhing, hot plate and hyperalgesia. The anti-inflammatory activity was verified through Paw edema test in rats and ear edema test in mice. From the preliminary results we obtained a extractive rate of 60g from ZZGE and 10g from ZZHE, in a percentile of 1% and 0.16%, respectively. The extracts hold a characteristic odor. In the determination of ZZ rhizomes, there is a larger quantity of iron (231 mg/kg). The ZZGE and ZZHE extracts phytochemical *screening* revealed the presence of the following substances: xanthenes, flavonoids, phenols, tannins and alkaloids. The TLC of ZZGE indicated a spot developed in iodine with a retention factor of approximately 0.7 cm similar to that of Zerumbona (0.8) and ZZHE presented three spots developed in iodine and UV 254nm. In acute toxicity and Subchronic, one may assert that ZZGE and ZZHE extracts do not produce any toxicity or mortality in mice and rats, yet some dependent doses caused some significant. ZZGE and ZZHE presented the LC50 of 117.49 and 181.9µg/mL on the assays with *Artemia salina*. The extracts had a strong inhibitory effect against gastric lesions have gastroprotective effect. Assessment of abdominal writhing test demonstrated that ZZGE and ZZHE in the doses of 250 and 500 mg/kg produced a significant anti-nociceptive effect. In the hot plate test, the extracts showed to hold analgesic activity. The anti-inflammatory activity assessment showed it to be significant in physiological action in determined doses in models of anti-inflammatory pain brought about by chemical stimulus. According to their preliminary outcomes both ZZGE and ZZHE presented anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-ulcerous effects, and held no toxicity. Probably, these extracts may be encapsulated as functional food, thus introducing a differentiated product into the Market and contributing to the scientific studies on this valuable, medicinal plant.

Keywords: 1. Zerumbone 2. Gross Extract 3. Hydroalcoholic Extract 4. Funcional food 5. Analgesic 6. Anti-inflammatory

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais o consumidor busca alimentos que além de nutrir tenha um papel de benefício à saúde. Atualmente a atenção está voltada para a promoção da saúde e bem estar, e uma peça chave para o alcance deste resultado é uma alimentação saudável. Desde os tempos antigos sabe-se que uma alimentação saudável pode prevenir e tratar muitas doenças.

O estilo de vida atual é tido como causador de muitas doenças que antes não tinham tanta importância epidemiológica, como as crônicas-degenerativas, com destaque para os diversos tipos de câncer. Nem sempre o uso de medicamentos resolve ou melhora os problemas das doenças acima citadas. Por isso, novas alternativas têm sido buscadas, com destaque para as terapias ditas naturais ou integrais e complementares. Entre estas, duas delas merecem destaque: a Dietoterapia e a Fitoterapia. No campo da Dietoterapia muito se tem estudado a respeito dos nutracêuticos e dos alimentos funcionais (BRASIL et al., 2006).

Segundo à agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA alimento funcional é aquele que apresenta em sua formulação uma ou mais substâncias que comprovadamente além de nutrir tenha uma função benéfica ao organismo. A ANVISA ainda complementa dizendo que estes alimentos devem ser seguros para o consumo sem que seja necessária supervisão médica (BRASIL, 1999).

As farmácias recebem muitos alimentos que prometem revigorar a saúde, alimentos em forma de cápsulas ou em pó, mais do que complementos alimentares podem evitar doenças. Os extratos vegetais não são considerados alimentos, em exceção os extratos que possuem Padrão de Identidade e Qualidade estabelecido. Alimentos apresentados em cápsulas ou comprimidos, constituídos de partes comestíveis de frutas e vegetais submetidos a processamento de secagem ou desidratação, devem ser avaliados como novos alimentos (BRASIL, 2015a).

A planta *Zingiber zerumbet* é conhecida internacionalmente, principalmente, pela sua utilização na fabricação de xampus, elaborados de suas flores, e também, na medicina tradicional, pois apresenta inúmeras propriedades medicinais. No Amazonas essa espécie é mais utilizada na ornamentação e é confundida com o gengibre (*Zingiber officinale*) (ZAKARIA, et al. 2010; BASAK, et al., 2010).

Há diferentes estudos científicos relacionados ao uso de extratos obtidos do gengibre amargo (*Zingiber zerumbet* L. Smith), os principais são: aquoso, etanólico, metanólico, éter de petróleo, éter dietílico, clorofórmico e do óleo essencial (volátil) extraído de seus rizomas,

a fim de verificar atividades biológicas, tais como: atividade anti-inflamatória, anti-nociceptiva, antitumoral entre outras, sendo que a maioria dos trabalhos são realizados por pesquisadores da Malásia e do Japão (KHALID et al., 2011; YOB et al., 2011; HAMID et al., 2012).

O gengibre amargo (*Zingiber zerumbet*) apresenta uma série de compostos químicos, o princípio ativo, a Zerumbona, é extraída dos rizomas da planta, esta substância tem um alto poder terapêutico, possui atividade citotóxica para célula neoplásica, anti-inflamatória, antiespasmódica e antibacteriana, e atualmente este composto é recomendado para o tratamento do câncer e AIDS (PINHEIRO, 2009).

O objetivo deste estudo foi produzir cápsulas contendo extratos: bruto e hidroalcoólico de gengibre amargo *Zingiber zerumbet* (L.) Smith cultivado na cidade de Manaus- Amazonas, para as mesmas serem utilizadas como alimentos funcionais possivelmente atuarão na prevenção e na redução do risco de doenças inflamatórias, nociceptivas e úlceras além de promover benefícios à saúde, a fim de introduzir um produto biotecnológico diferenciado no mercado e contribuir para os estudos científicos desta valiosa planta etnomedicinal.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alimentos funcionais

A busca pela saúde vem desde a antiguidade, como citado pelo filósofo grego Hipócrates: “que o alimento seja seu medicamento e o medicamento seja o seu alimento”. No mundo desenvolvido a alimentação deixou de ser somente uma questão de sobrevivência, satisfação da fome e ausência de doenças relacionadas com deficiência de nutrientes. Promover a saúde e bem estar e reduzir os riscos de doenças crônicas é atualmente um novo conceito de alimentação saudável (SARIS et al., 2002; GARCIA, 2004).

O uso de alimentos na redução de riscos de doenças crônicas não transmissíveis vem motivando o desenvolvimento de novas pesquisas que esclareçam os efeitos benéficos dos elementos fitoquímicos ou compostos bioativos das dietas (GAMARANO FRAIGE FILHO, 2015).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

De acordo com a ANVISA no Brasil são permitidos dois tipos de alegações nas rotulagens de alimentos: a) ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento e outras funções normais do organismo humano; b) ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE DE SAÚDE: é aquela que sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou com condição relacionada à saúde. Estas declarações de rotulagens podem se referir às seguintes substâncias bioativas: carotenóides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolípidos, organosulfurados, polifenóis, e probióticos e outros desde que precedido da prévia aprovação e comprovação científica (CÂNDIDO, 2015).

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 e se refere aos alimentos processados, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde,

definidos FOSHU-Foods for Specified Health Use “Alimentos para uso específico de saúde” (STRINGHETA et al., 2007).

Os alimentos funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto a fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem atuando em seis 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 (SOUZA et al., 2003).

Entre os possíveis benefícios à saúde da ingestão dos alimentos funcionais estão: redução do risco de osteoporose e hipertensão, melhoria da saúde gastrointestinal, melhoria da saúde óssea, atraso no processo de envelhecimento, reforço no sistema imunológico, melhoria de estados depressivos, melhoria da qualidade do sono, aumentos dos níveis de energia, e melhoria do desempenho de atletas (SARIS et al., 2002).

Segundo Landstrom et al. (2007), o consumo de determinados alimentos funcionais é influenciado pelas enfermidades apresentadas, tais como: Diabetes, hipertensão arterial, entre outras e também pela busca pessoal por uma melhoria da saúde.

Uma recente pesquisa realizada em parceria pela FIESP e ITAL, a Brasil Foods Trends 2002, apontou o conhecimento de 60% dos entrevistados do termo e do significado de alimentos funcionais. Os consumidores ainda disseram acreditar que os alimentos funcionais podem sim trazer benefícios à saúde e que num futuro próximo, poderiam vir substituir alguns medicamentos (BRASIL FOOD TRENDS, 2015).

No mercado estão disponíveis diversos tipos de alimentos funcionais, destacam-se os que favorecem o desenvolvimento infantil e crescimento, a regulação de processos metabólicos básicos, a defesa contra o stress oxidativo, a melhoria da performance mental e cognitiva, a melhoria da performance e boa forma física, bem como efeitos na fisiologia cardiovascular e na gastrointestinal (MARTINS et al., 2004).

O mercado global de alimentos funcionais estima em pelo menos 33 Bilhões nos E.U.A (HILIAM, 2000). Outros especialistas, como Sloan (2000; 2002) relata que o mercado de alimentos funcionais global seja U\$ 47,6 bilhões, sendo os Estados Unidos, o maior mercado em segmento, seguido pela Europa e Japão. Os três mercados dominantes contribuem com mais de 90% do total de vendas (BENKOUIDER, 2004).

2.2 Gengibre amargo (*Zingiber zerumbet* L. Smith)

O *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (ZZ), objeto do presente estudo, comumente conhecido como pinha, é uma planta perene com rizomas tuberosos e podem ser cultivadas naturalmente em ambiente úmido, ou em planície ou encostas sombreadas (BASAK et al., 2010).



Figura 1- Informação Global de Herbários que armazenam a planta *Zingiber zerumbet* L. Smith.

Fonte: DISCOVERLIFE, 2015.

2.2.1 Aspectos Botânicos

O *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (ZZ) da Família-Zingiberaceae é uma erva de rizoma perene articulado, possui caules eretos de 30 a 120 cm de altura, de um a dois centímetros de espessura, carnosos, com folhas dísticas, glabras a pubescentes na parte axial, flores hermafroditas, zigomorfas, dispostas em espigas ovóides ou elipsóides. Os rizomas do *Z. zerumbet* apresentam corpo alongado, um pouco achatado, como ramos fragmentados irregularmente de três a 16 cm de comprimento, de três a quatro centímetros de largura e dois centímetros de espessura. Externamente sua coloração vai do amarelo ouro ao marrom brilhante. O amido é o principal constituinte do córtex do cilindro central, internamente de cor marrom amarelado (BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA, 1983).



Figura 2- Rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.

Fonte: FELIPE MORAIS, 2009.



Figura 3- Flor de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.

Fonte: FELIPE MORAIS, 2009.

O gengibre amargo apresenta hastes de cerca de 1-2m de altura que são eretas, oblíquo, redondo, anual e investido pelas bainhas das folhas lisas. As folhas são finas, cerca de 25-35 cm de comprimento, com sua nervura central levantada fortemente na superfície inferior. A parte mais importante de *Z.zerumbet* é seus rizomas que são perene, grosso, escamosa, aromático, e amarelo pálido internamente, é usada exclusivamente por esta planta abriga reprodutor assexuada para propagação (SABU, 2003).

2.2.2 Uso tradicional

Zingiber zerumbet vem sendo utilizado na medicina tradicional asiática há cerca de dois mil anos. Na medicina tradicional da Indonésia *Zingiber zerumbet*, conhecido como Jamu é utilizado no tratamento da dor, purificação do sangue, aumento do apetite e como antiespasmódico. Os rizomas de *Zingiber zerumbet* são especialmente utilizados para temperar sushi. Já os seus óleos essenciais e os rizomas secos são utilizados para dar aroma e sabor a bolos, biscoitos, molhos e bebidas leves. No Japão, os rizomas são utilizados em conserva, na arte culinária, principalmente, em alimentos e por seus efeitos medicinais como no tratamento de doenças dos rins e do fígado (LE COINTE, 1947; CORREA, 1968).

O uso mais frequente de *Z. zerumbet* é na fabricação de cosméticos para cabelos. Esta planta é conhecida como Xampu de gengibre, porque a substância mucilaginosa presente na inflorescência é utilizada pelos havaianos como cosmético (Xampu e Condicionador) para cabelo natural (BHUIYAN, et al.2009; ZAKARIA, et al. 2010; BASAK, et al., 2010).

Na medicina chinesa, os rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith são utilizados para tratamentos de tosses, resfriados, diarreias, vômitos e dor abdominal associada ao resfriado (rizoma fresco); hemorragia uterina e sangue na urina (rizoma fresco carbonizado); inchaço do abdômen e edema (rizoma); perturbações digestivas e bronquite crônica (rizoma seco) (CORREA, 1968).

A espécie *Zingiber zerumbet* contém zerumbona, um componente citotóxico usado na China para o tratamento do câncer (PINHEIRO, 2009).

2.2.3 Teores Fitoquímicos da Planta

Vários trabalhos foram publicados em relação ao conteúdo fitoquímico dos óleos essenciais de *Zingiber zerumbet*, as tentativas de isolar e identificar os compostos bioativos a partir dos óleos essenciais dos rizomas começaram desde 1944, com a identificação do humuleno, monoterpênicos e zerumbona (VARIER,1944).

Damodaran e Dev (1968a; 1968b) relataram o isolamento de novos sesquiterpenóides a partir de frações obtidas dos óleos essenciais de *Z. zerumbet* (Exemplos: epóxido humuleno-I, II-humuleno epóxido, humulenol-II, hidro- ψ -photo-zerumbone e ψ -photozerumbone) e álcoois de sesquiterpeno (humulenol-I e humulenol-III). Chhabra e col. (1975) isolaram com sucesso dos óleos essenciais o óxido de zerumbona.

De acordo com Hasnah (1991) utilizando o método de extração hidrodestilação e identificação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-MS) verificou que a zerumbona e o α -cariofileno são os principais componentes dos óleos voláteis das folhas e dos rizomas do gengibre amargo, em destaque a zerumbona apresentando um rendimento de 36.98% e o α -cariofileno 16.35%.

De acordo com Pinheiro (2005) a recristalização dos óleos essenciais obtidos de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, forneceu um percentual de 97% de cristais translúcidos e claros, este composto puro foi identificado como a Zerumbona. Yu e colaboradores (2008) também relataram a presença de aproximadamente 86% de zerumbona sendo o maior componente dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*.

As frações do extrato metanólico de *Zingiber zerumbet*, contém sesquiterpenóides, flavonóides, compostos aromáticos, vanilina, derivados de canferol, além de outros compostos polifenólicos, utilizando o método extrativo Soxhlet (JANG et al., 2004).

O *Screening* fitoquímico do extrato aquoso (método de maceração) dos rizomas do gengibre amargo foi realizado por Hashemi e colaboradores (2008), o estudo revelou a presença de compostos fenólicos, saponinas e terpenóides.

Estudos recentes de KADER e colaboradores (2010; 2011) com o extrato etanólico de *Zingiber zerumbet* demonstraram a presença de: zederone (sesquiterpeno), compostos fenólicos, saponinas e terpenóides. Em outro estudo em ensaios fitoquímicos do extrato etanólico da planta revelou a presença de zerumbona, epóxido zerumbona, diferulometano, feruloil-p-cumarol-metano, sesquiterpenóides di-p-cumarol-metano, flavonóides, compostos aromáticos e vanilina, sendo que através deste estudo a atividade inibitória antibacteriana do extrato etanólico de *Z. zerumbet* pode ser atribuída por estes componentes químicos acima citados (HASHEMI et al., 2008). Na maioria dos estudos descrevem a presença de zerumbona, o composto tem sido relatado como componente predominante.

2.2.4 Zerumbona (ZER)

A Zerumbona (2,6,10-cy-cloundecatrien- 1-one, 2,6,9,9-tetramethyl), um sesquiterpeno cíclico é o componente majoritário dos óleos essenciais das raízes e folhas de *Zingiber zerumbet* L. Smith, esta substância apresenta atividade citotóxica para células cancerígenas, possuindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e atualmente este composto é recomendado para o tratamento do câncer e HIV (NOTÍCIAS INPA, 2015).

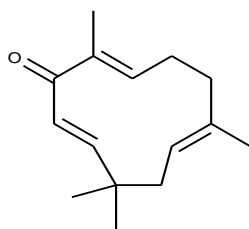


Figura 4- Estrutura química da Zerumbona.

Fonte: SOFTWARE CHEMDRAW.

Dai et al. (1997), demonstraram que Zerumbona teve atividade citotóxica e inibiu o vírus do HIV. Em estudos de Chien e col. (2008), utilizaram a Zerumbona (10mg/kg) para o

teste do edema de pata, onde obteve uma excelente atividade induzido por carragenina em camundongos, esta substância demonstrou ser tão eficaz quanto à indometacina (100 mg/kg) um anti-inflamatório não esteroidal - AINE.

A ZER inibiu a proliferação da linhagem de células humanas de adenocarcinoma, enquanto as células normais humanas: fibroblastos da derme e do colo do útero, foram menos afetados. O α -humuleno, uma estrutura análoga faltando apenas uma carbonila do grupo da Zerumbona, foi inativo em todos os experimentos conduzidos, indicando que o grupo carbonílico α , β - insaturado da Zerumbona que é responsável pela atividade inibitória (MURAKAMI et al., 2002).

Sulamain e colaboradores (2010) relataram que ZER foi responsável por inibir a liberação de mediadores responsáveis pela inflamação incluindo: histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandina, o autor cita que a zerumbona pode ser utilizado em reações inflamatórias agudas (SULAMAIN, 2009; SULAMAIN, 2010).

Em um estudo com a Zerumbona (20mg/kg) isolada, verificou-se a sua atividade anti-inflamatória e analgésica com efeitos similares ao Piroxicam (20 mg/kg), um anti-inflamatório não-esteroidal (SOMCHIT et al., 2012).

2.2.5 Atividades Biológicas

O suco dos rizomas de *Zingiber zerumbet* é utilizado na medicina indígena tailandesa para o tratamento de infestação de verme em crianças (PETARD, 1986). Estudos desenvolvidos por Huang et al. (2005) relataram a atividade antitumoral do extrato de diclorometano dos rizomas de *Zingiber zerumbet* em camundongos. O extrato diclorometano conseguiu prolongar a vida dos camundongos que estavam com diagnóstico de câncer de mama.

Rashid e Pihie (2005) investigaram os efeitos dos extratos de éter de petróleo, aquoso e metanólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* para determinar a atividade anticancerígena em linhagem de células humana com câncer de mama (MCF-7). Os extratos exibiram um efeito anticancerígeno, produziram uma CE_{50} 4.25 ± 0.05 , 8.38 ± 0.08 , 21.31 ± 0.43 , respectivamente, em comparação com o tamoxifeno (4.39 ± 0.21) agente quimioterapêutico padrão para o câncer de mama.

Algumas propriedades medicinais do Gengibre amargo *Zingiber zerumbet* se encontram na **Tabela 1**.

Tabela 1- Algumas propriedades medicinais de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.

Propriedades Medicinais	Extrato dos rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i>	Referências
Vermífugo	Extrato Aquoso (suco dos rizomas)	PETARD, 1986
Atividade antitumoral	Extrato de diclorometano	HUANG et al., 2004
Atividade antiproliferativa	Extrato de petróleo, aquoso e metanólico	RASHID; PHILIE et al., 2005
Atividade antimicrobiana	Óleo essencial Extrato clorofórmico Extrato aquoso	VORAVUNTHIKUNCHAI; PHONGPAICHIT; SUBHADHIRASAKUL , 2005
Atividade Antioxidante	Aquoso (Chá)	LAKO et al, 2007
Anti-hipertensiva e anti-inflamatória	Extrato aquoso	CHAUNG et al, 2008
Antiinflamatória, Antinociceptiva	Extrato metanólico	ZAKARIA et. al, 2010
Atividade Citotóxica	Extrato etanólico e Extrato clorofórmico	BASAK et al., 2010

De acordo com Jantan e colaboradores (2005) e Tan e col. (2006), o extrato metanólico de *Z. zerumbet* apresentou a atividade proteolítica sobre o vírus da Dengue (NS2B/NS3).

Para a atividade antimicrobiana, Jantan e colaboradores (2005) relataram que o óleo essencial dos rizomas de *Zingiber zerumbet* exibiu efeito antifúngico. Em estudos referentes à atividade bactericida os extratos clorofórmico, metanólico e aquoso dos rizomas de *Zingiber zerumbet* foram testados frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, que são comumente detectadas em pacientes infectados com o HIV. Os extratos metanólico e aquoso tiveram efeito contra *S. aureus* e *S. mutans*, enquanto o clorofórmico não apresentou atividade sobre a bactéria gram-negativa *S. aureus* (VORAVUNTHIKUNCHAI; PHONGPAICHIT; SUBHADHIRASAKUL, 2005).

Na Tailândia, em um estudo realizado com doze plantas medicinais, incluindo a espécie de *Zingiber zerumbet*, os extratos clorofórmico, metanólico e aquoso dos rizomas foram administrados na medicação de pacientes com HIV, que estavam co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. De todos os extratos de ZZ, os extratos de clorofórmio e metanólico apresentaram atividade inibitória de 125 e 1000µg/mL respectivamente, para esta bactéria (PHONGPAICHIT et al., 2006).

Lako et al. (2007) investigaram em 70 frutas e vegetais mais consumidos na ilha de Fiji (Oceania), verificaram a atividade antioxidante além de polifenóis, antocianinas, flavonoides e carotenoides. As duas espécies de gengibre foram estudados *Zingiber officinale* (gengibre branco) e o *Zingiber zerumbet* (gengibre amargo), relataram que ambos possuem um alto potencial antioxidante, e o Gengibre selvagem muito rico em caenferol.

A literatura mostra que alguns compostos isolados a partir do óleo essencial tais como: Zerumbona, humuleno, zederone e campreno possuem propriedades ant-inflamatória, antiviral, antitumoral, antioxidante, anti-alérgica e antimicrobiana (ABDUL et al., 2008; YOB et al., 2011).

Estudos de Basak e col. (2010) comprovaram que os extratos etanólico e clorofórmico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* inibiram a expressão do vírus EBV (*Epstein-Barr Virus*). Ambos os extratos foram capazes de causar a supressão do vírus em células Raji.

Esta planta também apresenta uma potente atividade antioxidante e o extrato etanólico é citotóxico em baixas concentrações (NAG; BANDYOPADHYAY; MUKHERJEE, 2013).

Os extratos de diclorometano e metanólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* foram avaliados para o teste com larvas de crustáceo *Artemia salina* e atividade larvicida para os mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles nuneztovari*. Os resultados revelaram que os extratos de Diclorometano e Metanólico de *Zingiber zerumbet* apresentaram baixa toxicidade significativa frente à *Artemia salina* durante 48 horas com concentração letal (CL₅₀) de 30.9µg/mL do extrato de diclorometano e extrato metanólico de 64.0 µg/mL. Os extratos de Diclorometano e Metanólico de *Zingiber zerumbet* apresentaram uma boa atividade larvicida frente os mosquitos *A. aegypti* e *A. nuneztovari*. A razão da mortalidade foi diretamente proporcional à concentração. O bioensaio com o extrato de diclorometano de *Z. zerumbet* foi mais tóxico que o extrato metanólico para as larvas de ambas espécies de mosquitos, e que *A. nuneztovari* (CL₅₀ de < 70 µg/mL) tratado com o extrato de diclorometano de *Z. zerumbet* foi mais suscetível do que *A. aegypti* (CL₅₀ de < 300µg/mL) em ambos os tratamentos (BUCKER et al., 2013).

2.2.6 Toxicologia

Chang e colaboradores (2012) realizaram a atividade de toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico de *Zingiber zerumbet*, em hamsters machos pesando entre 90± 10g, em

análises de 14 e 30 dias, respectivamente. As doses do extrato etanólico foram 100, 200 e 300 mg/kg de extrato em um volume de 1.5 ml/kg de água destilada, via oral.

Durante estes períodos de observação não houve mortalidade e, portanto o extrato etanólico não apresentou toxicidade em todas as doses. No entanto, para a comprovação da seguridade da via oral, do extrato etanólico de ZZ para uso em humanos, serão necessários Testes-clínicos realizados em seres humanos.

O extrato aquoso (método de extração maceração) a 2000 mg / kg de peso corporal não causou quaisquer alterações comportamentais para os frangos de corte imediatamente após a sua administração, indicados pelos movimentos normais. No entanto, após 1 hora as aves tratadas com extrato exibiram sinais de inapetência que durou até 24 horas após a administração de extrato. Não houve mortalidade até 14 dias após a administração extrato enquanto a observação histopatológica dos fígados e rins em níveis macroscópico e microscópico, os resultados não indicaram nenhuma alteração para os órgãos tratados. O exame clínico químico do sangue indicaram significativo aumentos no nível sérico de ALT, ALP e AST da fêmea frangos após 7 e 14 dias de tratamento com extrato aquoso os 2,000 mg / kg peso do corpo quando comparado com o grupo de controle. O extrato também aumentou significativamente o consumo de alimento até ao fim da experiência (35 dias), quando comparado com o grupo de controle (HASHEMI et al., 2008).

2.2.7 Atividade Anti-úlcera

Em estudos da atividade antiúlcera com o extrato metanólico dos rizomas de *Zingiber Montanum* (Zingiberaceae), utilizando o modelo de indução das lesões gástricas pela administração de ácido clorídrico 1N, em camundongos, foram obtidos 77.44%, 61.97% e 83.10% de inibição das lesões, nas respectivas doses testadas: 40 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg; e quando foi testada a zerumbona (o composto purificado da fração hexânica dos rizomas), nas doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg, foram observadas 45.77% e 92.0% de inibição, respectivamente. Com a atividade de indução gástrica por etanol 95%, a zerumbona apresentou 29.07% e 45.35% de inibição, também nas doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg comparada com a Indometacina (Anti-inflamatório comercial) com a qual foram obtidos 64.74% e 72.38% de inibição. Este estudo demonstrou que a zerumbona teve um potente efeito inibitório contra lesões gástricas, podendo ser considerada uma nova droga natural antiúlcera (AL-AMIN; SULTANA; HOSSAIN, 2012).

Recentemente, Sidahmed e col. (2015) relataram a atividade gastroprotetora da Zerumbona extraída dos rizomas de *Zingiber zerumbet*, a substância conseguiu produzir um efeito de gastroproteção para úlceras gástricas induzida por etanol em ratos, utilizando a administração intraduodenal de zerumbona em doses de 5 e 10 mg/kg por peso corporal e Omeprazol 30 mg / kg (droga comercial) em ratos. Os resultados foram significativamente estatísticos ($p < 0.05$) inibiu a formação de úlceras a 76,77%, 75,59% e 88,75%, respectivamente. A atividade anti-secretora da zerumbona foi também avaliada, produzindo um aumento da proteção gástrica na ligadura do piloro. Além disso, a zerumbona demonstrou atividade antimicrobiana para *Helicobacter pylori* produzindo um bom índice concentração inibitória (MIC) de 250. Essas evidências científicas tornam a Zerumbona como um composto antiulcera promissor.

2.2.8 Atividade Anti-nociceptiva

Somchit e col. (2005) recentemente informaram sobre os perfis anti-nociceptivos do extrato aquoso de ZZ e extrato etanólico de ZZ (método de extração Soxhlet) administrando por via intraperitoneal em ratos e avaliando com o teste de contorção induzido por 0,6% de ácido acético. Neste estudo, apenas o extrato etanólico de ZZ verificou ser eficaz significativamente ($P < 0,05$) na redução do número de contorções em uma dose-dependente. A atividade foi observada com a dose mais baixa (10mg / kg) 20 min após a administração do agente fisiológico durou-se até ao final da experiência (40 min). A morfina, nas doses de 2 e 8 mg / kg, foi usado como o medicamento de referência padrão.

O composto sesquiterpênico zerumbona obtido dos óleos essenciais dos rizomas do *Zingiber zerumbet* L. Smith apresentou uma importante ação analgésica, quando avaliadas em camundongos e ratos (PINHEIRO, 2009). Em camundongos entre 20-30g , machos e fêmeas 200- 300g. As doses de zerumbona foram administradas via oral e intraperitoneal, os resultados obtidos nas doses de 500 a 1500 mg/kg por *v.o.*, mostraram efeitos significativos, aumentando o tempo de latência em 99%, tempo de permanência dos animais na placa quente dos animais à estimulação da dor.

Estudos por Zakaria e colaboradores (2011) utilizaram o extrato metanólico de *Z.zerumbet* (25, 50, e 100 mg / kg; administrado por via subcutânea) e óleo essencial de ZZ (30, 100, e 300 mg / kg; via *i.p.*). O extrato e o óleo essencial demonstraram atividade anti-

nociceptiva nos níveis centrais e periféricos, foram estatisticamente significativos ($P < 0,05$) quando avaliados pelos testes de formalina, contorção abdominal e placa quente. A atividade anti-nociceptiva de extrato metanólico e óleo essencial de *Z. zerumbet* atenuou-se pela naloxona (5 mg / kg) indicando que a atividade anti-nociceptiva foi observada pelo receptor opióide. Ambos os extratos tiveram a capacidade de inibir a nocicepção no teste da placa quente e em ambas as fases neurogênicas e inflamatórias pelo teste da formalina.

Zacaria e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de contorção abdominal, utilizaram o Ácido Acetil Salicílico - ASA (5 mg / kg) que produziu cerca de 63% de anti-nocicepção em comparação com o extrato metanólico (100 mg / kg) de *Zingiber zerumbet* resultando numa faixa entre 17-55% de antinocicepção. Também utilizaram a Morfina no teste nociceptivo, os resultados foram um aumento de latência 90min após a sua administração, enquanto o extrato metanólico de *Z.zerumbet* (100 mg/kg) exerceu alta atividade antinociceptiva a 120 min após a sua administração. No teste da formalina, o ASA e a morfina produziram na primeira fase 8% e 63% de anti-nocicepção, e na segunda fase 67% e 23%. Em comparação, o extrato metanólico de *Z.zerumbet* produziu aproximadamente 27-45% e 34-62% de anti-nocicepção em ambas as fases, respectivamente.

Khallid e col. (2011), relataram o efeito do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* utilizando o teste de contorção abdominal induzido por ácido acético nas doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg. Na administração do óleo essencial via intraperitoneal, obteve-se uma boa inibição do efeito nociceptivo, a porcentagem de inibição foram: 23.02, 53.89, 83.63 e 98.57% respectivamente, similar aos resultados administrando via oral, 13.04, 28.30, 54.69 e 75.68% respectivamente. O Ácido acetil salicílico-ASA (100 mg/kg, *i.p.* e *v.o.*), droga comercial utilizado para comparação, produziu um efeito similar ao óleo essencial de *Z. zerumbet*. A dose intraperitoneal do óleo essencial foi mais potente via intraperitoneal do que via oral.

Recentemente Deooun et al. (2014) publicaram o efeito antinociceptivo de Tree-Phon-Thad-TPT, um medicamento natural tradicional na Tailândia, utilizado por ser antipirético e anti-inflamatório, este medicamento contém raízes de três plantas conhecidas pela medicina tradicional: *Zingiber zerumbet*, *Zingiber motanum* e *Cymbopog nadus*. Verificaram a atividade nociceptiva pelo teste de placa quente (Hot-plate) em camundongos. No teste de placa quente em todas as doses do medicamento TPT (75,150 and 300 mg/kg) tiveram um

aumento significativo da latência ($p < 0.01$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectivamente), ou seja tempo de permanência do animal sobre a placa, sendo comparando com o grupo controle.

2.2.9 Atividade anti-inflamatória

Recentemente, a bioatividade da zerumbona e de seus derivados foram reportados para as atividades anti-inflamatória e anti-tumoral (MURAKAMI e TAKAHASHI, 1999). A colite úlcerosa e a doença de Crohn's são desordens inflamatórias de causa desconhecida difíceis de tratar. A zerumbona pode ser uma estratégia anti-inflamatória eficaz para o tratamento dessas doenças (MURAKAMI, 2002).

Chien e col. (2008), utilizaram a Zerumbona extraída de *Z. zerumbet* para avaliar a atividade antinflamatória em ratos através do teste de edema de pata induzido por carragenina. Na injeção intraplantar de carragenina na região da pata traseira do animal observou-se um inchaço após 1 hora, seguindo até duas horas e meia de tratamentos dos ratos. A administração via oral de Zerumbona (10 mg/kg) ou Indometacina - Droga anti-inflamatória comercial (100 mg/kg), produziu redução significativa no teste de edema de pata em relação ao grupo controle. O tratamento com Zerumbona inibiu o edema de pata induzido pela administração de carragenina em 1 hora esse efeito ocorreu até 6 horas. O efeito de Zerumbona sobre o edema de pata comparando com a indometacina, ambas produziram uma boa duração da inibição sobre edema.

O extrato aquoso (método de extração Soxhlet) de *Zingiber zerumbet* exibiu significativa atividade anti-inflamatória apenas com as doses de 50 e 100 mg / kg, com a dose de 50 mg/kg produziu uma atividade entre 1-4 h enquanto a dose de 100 mg / kg exibiu uma atividade entre 0,5-4 h após a administração de prostaglandinas E2 (PGE_2). Por outro lado, o extrato etanólico de ZZ não afetou o teste de edema de pata com PGE_2 em todas as doses testadas. O ácido mefenâmico (20 mg / kg), foi utilizado como droga padrão e produziu os efeitos do pico de efeito aproximadamente 50% de inibição inflamatória em 2 h após a sua administração antes de ser constantemente reduzido até que atingiu 30% de inibição no final do experimento no intervalo de tempo de 4 h. O extrato aquoso de ZZ teve um percentual de inibição inflamatória de aproximadamente 50%, sendo essa atividade anti-inflamatória comparável com o ácido mefenâmico com 2 horas de intervalo. O extrato metanólico de ZZ (25-100 mg / kg; administrado por via subcutânea) também demonstrou ser significativo (P

<0,05) quando avaliados os testes de atividade anti-inflamatória: edema de pata utilizando a carragenina. (ZAKARIA et al., 2010).

2.3 Encapsulamento de alimentos funcionais

Produtos a base de plantas também podem ser comercializadas como novos alimentos na forma de cápsulas ou comprimidos, podendo causar engano aos consumidores devido à similaridade desses produtos com medicamentos (BRASIL, 1999).

Vários materiais estão sendo encapsulados pela indústria alimentícia: antioxidantes, vitaminas, adoçantes, minerais, aminoácidos, corantes, enzimas entre outros (SHAHIDI E HAN, 1993).

Devido à crescente demanda do uso de ingredientes naturais, os extratos vegetais estão cada vez mais em foco (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015). Segundo à Aditivos & Ingredientes (2015) as ervas mais comuns utilizadas como ingredientes em alimentos funcionais são:

1. Ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*) - componentes ativos: Ginkgolides, flavonoides, glicosilados e lactonas diterpênicas; Alegações de funcionalidade: Memória percepção; Atuação no organismo: Cérebro, sistema circulatório.
2. Erva de São João (*Hypericum perforatum*) - componentes ativos: Hipericina, pseudo-hipericina, pseudo-hipericina, flavonóides, naftodiantronas; Alegações de funcionalidade: Antidepressivo; Atuação no organismo: Cérebro.
3. Kava Kava (*Piper methysticum*) – componentes ativos: Kavalactonas; Alegações de funcionalidade: Ansiolíticos, relaxantes; Atuação no organismo: Cérebro.
4. Valeriana (*Valeriana officinalis*)- componentes ativos: Valepotriatos, ácido valerênico, sesquiterpenos; Alegações de funcionalidade: Indução do sono; Atuação no organismo: Cérebro.
5. Espinheiro (*Crataegus oxycantha*) - componentes ativos: Flavonóides, procianidinas, saponinas triterpênicas, aminas cardioativas; Alegações de funcionalidade: Insuficiência cardíaca; Atuação no organismo: Sistema circulatório.
6. Equinácea (*Echinacea purpúrea E. pallida E. angustifólia*) – componentes ativos: Equinósideos, ácidos caféico e ferúlico, glicoproteínas e polissacarídeos;

Alegações de funcionalidade: Imunomodulador; Atuação no organismo: Imunidade inata.

7. Óleo de Menta (*Mentha x piperita*): Mentol; Alegações de funcionalidade: Doença do intestino irritável; Atuação no organismo: Trato gastro-intestinal.
8. Gengibre (*Zingiber officinale*) –componentes ativos: Gingerol e gingerdióis , óleos voláteis; Alegações de funcionalidade: Antiemético, náuseas; Atuação no organismo: Trato gastro-intestinal.

Atualmente no mercado várias cápsulas contendo extratos vegetais consideradas alimentos funcionais, entre as mais conhecidas estão: Cápsulas de guaraná, Cápsulas de Ômega 3 (Óleo de peixe) e Cápsulas de Lecitina de soja (NATUERVAS, 2015).

As cápsulas de guaraná combatem o estresse e a fadiga causada pela grande carga de trabalho muscular, restabelecendo temporariamente a capacidade física e mental. As cápsulas de Ômega 3- óleo de peixe, ácidos graxos ômega 3, auxiliam na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos. A Lecitina de soja em cápsulas é um derivado da soja, rica em ácidos graxos poli-insaturados, atua de forma benéfica nas alterações hormonais (menopausa) (NATUERVAS, 2015).

Outras cápsulas como alimento funcional estão no mercado, tais como: Cápsulas de feijão branco, cápsulas de óleo de alho, cápsulas de quitosana, cápsulas de óleo de germe de trigo, cápsulas de óleo de linhaça e cápsulas de gengibre.

As cápsulas de feijão branco, promove o emagrecimento assim como a redução dos níveis de açúcar no sangue, isto porque a proteína responsável faseolamina, entra no organismo, inibindo a absorção da glicose controlando a diabetes (NATUERVAS, 2015).

As cápsulas de óleo de alho, ajuda a regular o colesterol, reduzindo os níveis de LDL – o mau colesterol – e aumentando os níveis de HDL – o colesterol bom – fator importante para quem pretende emagrecer, além de beneficiar o sistema imunológico e oferecer proteção contra doenças cardíacas, reduzindo o risco de ataques cardíacos e derrames, fator de risco principalmente para pessoas com sobrepeso. O consumo em forma de cápsulas pode evitar problemas de indigestão, que podem ocorrer em algumas pessoas que consomem o alho fresco (RIQUEZANATURAL, 2015).

As cápsulas de quitosana promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal, auxilia também na redução da absorção da gordura (COSTA SILVA, 2006).

As cápsulas contendo Óleo de germe de trigo (*Triticum aestivum*), é um alimento funcional, fonte de vitamina E, protege a pele prevenindo contra ressecamento e as rugas, atua no fortalecimento cardíaco e ativação da circulação sanguínea (SAUDE PURA, 2015).

As cápsulas moles de óleo de linhaça, é considerado um alimento funcional, o óleo é extraído da semente do linho (*Linum usitatissimum*). Possui alto poder alimentício, desintoxicante, reidrata o intestino, utilizado em casos de diverticulite, alcalinizante, refrescante. Estudos mostram que é ótima para os diabéticos, pois estabiliza os níveis de açúcar no sangue e também auxilia para a prevenção da obesidade, pois ela ativa mais o metabolismo (FERREIRA, 2008).

As cápsulas de gengibre *Zingiber Officinale*, como suplemento alimentar, contém compostos ativos classificados como grupo fenólico que são shogaols, gingeróis e óleos voláteis, são utilizadas para reduzir náuseas na mulher grávida e o shogaols estimula a produção de enzimas que contribuem para a flatulência (ASYA SHOPPING, 2015).

Baseado nessas informações, diante das diversas comprovações científicas das propriedades medicinais da espécie *Zingiber zerumbet* L. Smith. Uma vez que ainda não foi criado, o presente trabalho desenvolveu cápsulas do extrato aquoso ou hidroalcolico do gengibre amargo (*Zingiber zerumbet*) como alimento funcional.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o extrato bruto e hidroalcoólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith para produzir um alimento funcional.

3.2 Específicos

- a) Preparar os extratos: bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* (ZZ);
- b) Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos de ZZ;
- c) Avaliar a toxicidade Pré-clínica dos extratos de ZZ;
- d) Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos de ZZ;
- e) Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos de ZZ;
- f) Avaliar a atividade antiúlcera dos extratos de ZZ;
- g) Avaliar a atividade Gastroprotetora dos extratos de ZZ;
- h) Desenvolver cápsulas dos extratos bruto e hidroalcoólico de ZZ;

Materiais e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 METODOLOGIA (PARTE I) – Caracterização Fitoquímica

4.1.2 Coleta da planta

Os rizomas de *Zingiber zerumbet* foram coletados na área rural de Manaus-Amazonas localizado no Tarumã Mirim, uma amostra da exsicata foi enviada para ser identificada no herbário da Universidade de Utrecht localizada em Netherlands (País do Reino Unido) pelo Prof. Doutor Paul Maas (Departament of Plant Ecology and Evolucionary Biology). O material encontra-se atualmente depositado no herbário do INPA sob n^o 186913.

4.1.3 Técnicas de Extrações

4.1.3.1 Extrato Bruto

Para obtenção do extrato bruto 1 kg dos rizomas do *Z. zerumbet* foram cortados em cubos e processados em um processador da marca CARREFOOUR[®], não houve a utilização de água. Após a obtenção do caldo bruto (1500 ml) extraído do gengibre, o caldo foi submetido à liofilização utilizando-se o liofilizador – Modelo VIRTIS AdVantage, Marca SP SCIENTIFIC. A liofilização foi durante 72 horas, com temperatura do condensador de – 50^oC, o vácuo menor que 750 rpm.

4.1.3.2 Extrato Hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi obtido pelo método de maceração, no qual 1 kg de rizomas frescos processados em um processador da marca CARREFOOUR[®], foi acondicionado em um frasco mariott (2 litros), contendo 1 litro de álcool etílico comercial (92,6%) e 1 litro de água destilada (v/v; 1:1) por 72 horas. Após os três dias, o líquido do frasco foi retirado, em seguida, filtrado e congelado submetido à liofilização. A liofilização foi durante 72 horas, com temperatura do condensador de – 50^oC, o vácuo menor que 250 rpm.

4.1.3.3 Óleo essencial

Para a extração do óleo essencial foi utilizado o método de hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger acoplado a balão de 2000 mL. O *Zingiber* em pó (2kg) e 4 L de água foram colocados no balão e levado para manta aquecedora. A extração foi feita durante 6 horas contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial foi coletado do condensador (AOAC, 1995). Todo o sistema foi protegido da luz por meio de papel alumínio e o óleo essencial foi armazenado em frascos âmbar sob congelamento.

4.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato aquoso e hidroalcoólico de ZZ foram analisados por CCD - Cromatografia em Camada Delgada, utilizando-se solventes ou misturas de solventes de diversas polaridades e reveladores como iodo-ressublimado, luz ultravioleta dragendorff e sulfato cérico, para a verificação da presença de compostos e substâncias presentes nos extratos de *Zingiber zerumbet*. O padrão foi utilizado para as placas de CCD foi a Zerumbona, componente majoritário do óleo essencial de *Z. zerumbet*. As placas de CCD foram analisadas e o Fator de retenção (Rf) foi calculado conforme mostra a **figura 5**.

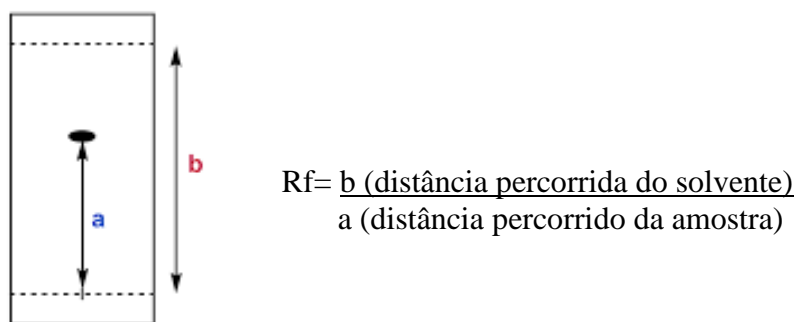


Figura 5 – Cromatograma e cálculo do Rf

Fonte: ASLAN, 2014.

As análises qualitativa e quantitativa de cada substância foram verificadas preliminarmente no CLAE –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando-se como fase móvel, solventes puros ou em misturas de solventes de diversas polaridades observadas.

4.1.5 Prospecção de constituintes dos extratos

Os testes para fenóis e taninos, antocianina, antocianidinas e flavonóides, alcalóides foram realizados segundo a metodologia de Mattos (1997).

Para o início dos experimentos foram separados sete tubos de ensaios enumerados contendo 3 mL de extrato bruto ou hidroalcoólico. Os extratos foram concentrados em banho-maria a 40°C até obter a metade do volume, em seguida, foi levado ao pH 4 e o líquido acidulado filtrado. Em seguida realizou-se os testes para fenóis e taninos, antocianina, antocianidinas e flavonóides.

4.1.5.1 Teste para fenóis e taninos

Para este teste foi utilizado o tubo número 1 (contendo 3 mL de EAZZ ou EHZZ) e adicionado três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 . O tubo foi agitado e observado qualquer variação de sua cor ou formação de precipitado abundante, escuro. Comparou-se com um teste em branco, usando apenas água e cloreto férrico. Observou-se no seguinte tubo: se o teste for “branco” é negativo, se a coloração é variável entre o azul e o vermelho esse é indicativo da presença de fenóis, porém, se surgir um precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolizáveis e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos) (MATTOS, 1997).

4.1.5.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Neste teste utilizamos os tubos de número 2, 3, 4 (contendo 3 mL de EAZZ ou EHZZ), e um deles foi acidulado a pH 3, alcalinizar e o outro a pH 8,5 e o terceiro a pH 11. Observou-se qualquer mudança da coloração do material em cada variação do pH, a **tabela 2** foi utilizada para a verificação dos constituintes de acordo com a cor que o extrato apresentava em determinado pH. (MATTOS, 1997).

Tabela 2 – Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido ³	Alcalino ^{8,5}	Alcalino ¹¹
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavanonas e Xantonas.	—	—	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	—	Vermelha púrpura
Flavonóis	—	—	Vermelho-laranja

Obs: A presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro.

4.1.5.3 Teste de Dragendorff

Para a detecção de alcaloides, a placa de CCD foi feita aplicando o extrato bruto (EBZZ) ou o hidroalcoólico (EHZZ). Em seguida, a placa foi eluída no sistema polar básico e aplicou-se o reagente DRG – Reativo de Drangendorff e ácido sulfúrico 10% sobre a mesma, o resultado para alcaloides é uma coloração amarronzada (MATTOS, 1997).

4.1.6 Atividade Antioxidante - Atividade sequestradora do radical DPPH' (2,2- difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante dos extratos bruto e hidroalcoólico foi realizada no Laboratório de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas- UFAM, foi obtido de acordo com o método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) que baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radical, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção.

O método de DPPH foi de acordo com MAHMOUDI *et al.*, (2009) com algumas modificações. Inicialmente foi pesado 2 mg de DPPH e dissolvido em 12 mL de etanol absoluto. Em uma placa de 96 poços de fundo chato foi adicionado 170 µL da solução etanólica de DPPH mais 30µL de DMSO. Posteriormente foi adicionado mais 100 µL da solução etanólica de DPPH. Diferentes concentrações do extrato (5, 10, 25, 50 e 100 µg / mL) foram adicionadas na microplaca, em um volume igual (30µL), para uma solução etanólica (170 µL) e fez-se a leitura A₁ no leitor de microplaca (DTX 800, na absorbância de

492 nm). Em seguida, 100 µL da solução etanólica de DPPH[·] (100 mM) foi adicionado e a reação foi incubada por 30 minutos (no escuro e a temperatura ambiente) e feito a leitura A₂. Foi utilizado ácido ascórbico e o ácido gálico como antioxidantes padrões. No branco foi adicionado 30 µL do EEP com 270 µL de etanol e no controle foi usado etanol no lugar do extrato/padrão. Os experimentos foram repetidos em triplicatas.

A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}^{\cdot} = 100 - (A_2 - A_1 / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$$

Onde:

A₂= Absorbância da amostra

A₁= Absorbância do branco

Abs=Absorbância do controle negativo

Foi determinada a CI50, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de radical livre do meio em 50%. Para o cálculo do CI50 foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

4.2 METODOLOGIA (PARTE II) – Análise Físico-química

4.2.1 Determinação de minerais dos rizomas de *Zingiber zerumbet*.

Os rizomas do *Zingiber zerumbet* foram retirados das plantas, submetidos para a trituração e secagem na estufa de circulação (60^oC). Após a secagem os rizomas secos foram enviados para as análises de teor de minerais no Laboratório de Solos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA. Os teores de minerais foram determinados por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado com mineralização por via seca ou úmida de acordo com a metodologia da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995) empregada pelo laboratório local.

4.2.2 Composição centesimal

As análises bromatológicas dos rizomas secos de *Zingiber zerumbet* foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, do Centro de Pesquisas de Ciências da Saúde-CPCS/INPA. As análises foram feitas de acordo com a metodologia da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995) e Instituto Adolpho Lutz (2008) empregadas pelo laboratório local.

4.2.2.1 Determinação do Teor da Umidade

Para a determinação do teor de umidade dos rizomas secos de ZZ, foram usadas placas de petri previamente desumificadas em estufa com circulação de ar forçada a 105°C por um período de 1 h, seguidas de resfriamento em dessecador e pesagem. As placas foram adicionadas 2 g dos rizomas secos ou EAZZ e em seguida foram submetidas à secagem em estufa a 105°C por 4 horas (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008). Para o cálculo do teor de umidade utilizou-se a equação:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(P_1 - P_2)}{(P_1 - P_0)} \times 100$$

Onde:

P₀ = peso da placa

P₁ = peso da placa + amostra integral

P₂ = peso da placa + amostra seca

4.2.2.2 Determinação do Teor de Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas 3 g dos rizomas secos contidas em cadinhos de porcelana previamente calcinados foram carbonizados em bico de Bunsen, estas foram incineradas a 550°C em mufla por período de aproximadamente 5 h, até obtenção da amostra carbonizada. Após este período, os cadinhos contendo cinzas foram resfriados em um dessecador e posteriormente pesados (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008). O cálculo para o teor de cinzas foi feito de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{\text{Peso da cinza}}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

4.2.2.3 Determinação do Teor de Lípidios

Foram pesadas 80 mg dos rizomas secos em cartucho de papel e, colocada em tubo extrator Soxhlet. Os balões isentos de umidade foram previamente pesados e montados em um sistema de Soxhlet, onde foi adicionado o solvente éter etílico P.A para a extração dos lipídios. Após a extração, o balão contendo os lipídios foi á estufa a 105°C por 2h. Após este período, os balões foram retirados da estufa e colocados em um dessecador para refriar em seguida pesados (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008). O Teor de lipídios foi calculado:

$$\text{Lipídio (\%)} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_3} \times 100$$

Onde:

P₁= Peso do balão + lipídio

P₂= Peso do Balão

P₃= Peso da amostra

4.2.2.4 Determinação do teor de Proteínas

Foram pesados 0,5g dos rizomas secos em tubos de proteínas, as quais adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, 600 mg de sulfato de potássio e 300 mg de sulfato de cobre. Em seguida, os tubos foram submetidas a 450°C até o material ficar límpido. Após este período as amostras foram destiladas com a adição de cerca de 20 mL de hidróxido de sódio 50% em destilador de nitrogênio. O destilado foi recolhido em erlenmeyer de 250 mL, contendo 15 mL, de ácido bórico e 3 gotas do indicador composto por 1 parte de vermelho de metila e 5 partes de verde bromocresol. Em seguida, o destilado foi titulado com ácido clorídrico 0,02N (AOAC, 1998). Para o cálculo do teor de proteína seguiu-se a fórmula apresentada abaixo:

$$\text{Proteínas. (\%)} = \frac{\text{vol. HCL} \times [\text{HCL}] \times 14 \times 6,25}{\text{Peso da amostra (mg)}} \times 100$$

Onde:

14= fator de conversão de nitrogênio

6,25= fator de conversão de proteína

4.2.2.5 Determinação do Teor de Carboidratos

O valor do teor de carboidratos foi calculado por diferença, subtraindo-se de 100 os valores de proteínas, lipídios, fibras, cinza e umidade (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008).

4.2.2.6 Determinação do Teor de Fibras totais

Para determinação de fibras totais foi utilizada a combinação do método enzimático e gravimétrico (Instituto Adolfo Lutz (2008)). O método consiste em pesar em béquer de 250 mL, em triplicata, e adicionar cerca de 1 g da amostra dos rizomas secos tratados. O peso entre as triplicatas não diferiu a 20 mg. Adicionou-se 40 mL de solução-tampão (MES-TRIS), pH 8,2, dispersando completamente a amostra. Adicionou-se 50 µg de α -amilase termorresistente, agitou-se levemente. Tampou-se com papel alumínio e foi levado ao banho-maria a (95 - 100)°C, por 35 min com agitação contínua. Os béqueres foram removidos do banho e resfriados até (60 ± 1)°C. Adicionou-se 100 µL de solução de protease preparada no momento do uso (50 mg/mL em tampão MES-TRIS), cobriu-se com papel alumínio e levou-os a banho-maria a (60 ± 1)°C com agitação por 30 minutos. Removidos o papel alumínio dos béqueres e adicionando-se 5 mL de ácido clorídrico 0,561 M, com agitação. Mantendo a temperatura a (60 ± 1)°C e ajustando o pH entre 4,0 - 4,7, com adição de solução de hidróxido de sódio 1 M e/ou ácido clorídrico 1 M. Adicionou-se 300 µL de solução de amiloglicosidase. Os béqueres foram cobertos com papel alumínio e levados ao banho-maria a (60 ± 1)°C, por 30 minutos, com agitação.

$$\text{Fibra alimentar total (\%)} = \frac{(\text{RT}-\text{P}-\text{C}-\text{BT}) * 100}{m}$$

RT= resíduo total da amostra

BT= resíduo total do branco

C= cinzas

M= massa da tomada da amostra

P= teor de proteínas

4.2.2.7 Determinação do Valor Energético

O cálculo da energia foi feito a partir dos teores em proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando os coeficientes específicos que levam em consideração o calor de combustão e a digestibilidade. A conversão de Atwater (INSTITUTO ADOLPHO LUTZ, 2008):

Valor Energético (Kcal) = [4 x g proteína] + [4 x g de carboidratos] + [9 x g lipídeos].

4.3 METODOLOGIA (PARTE III)- Estudo Toxicológico e Farmacológico

4.3.1 Teste de Citotoxicidade

4.3.1.1 Ensaio de Toxicidade sobre *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. Possui 4 estágios de desenvolvimento: ovo, náuplio, metanáuplio e adulto, apresentam pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão da espécie. O ensaio de toxicidade utilizando estes microcrustáceos é um método seguro prático e de baixo custo para determinar a bioatividade de compostos sintéticos e/ou produtos naturais (NUNES et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Para o teste de toxicidade com *Artemia salina*, foram utilizados ovos adquiridos no comércio de Manaus-AM, provenientes da cidade do Arraial do Cabo-RJ e comercializado pela Maramar Aquacultura Ltda.

Os ensaios de toxicidade foram realizados conforme o método de Meyer et al. (1982), onde 25, 50, 75 e 100 µg/mL do extrato bruto ou hidroalcoólico (EBZZ ou EHZZ), preparados em solução aquosa de sal marinho (38g/L) com 1% de tween 20 (v/v), foram incubados em placas “multiwell” durante 48 horas com *Artemia salina* (n=10) a 30°C. Após a incubação foi feito a contagem do número de microcrustáceo mortos sendo calculado a porcentagem de mortalidade e a Concentração Letal Média (CL50), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população.

4.3.2 Toxicologia Pré-Clínica

4.3.2.1 Animais Experimentais para o estudo de toxicologia pré-clínica e farmacológico

Para a utilização dos animais farmacológicos *in vivo*, o presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Uso dos Animais- CEUA/INPA, sendo aprovado pelo numero do parecer 005/2012, de acordo com as normas vigentes.

As atividades em animais foram desenvolvidas no Biotério Central do Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia após a submissão e aprovação do projeto pelo CEUA-INPA. O Controle sanitário das colônias de criação do Biotério Central do INPA é realizado trimestralmente pelo Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA) do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal-Fiocruz). O SCQA é responsável pelo monitoramento da saúde dos animais de laboratório produzidos no biotério central do INPA, mediante o emprego de programas rigorosos e rotineiros de análises. Os animais são mantidos em cabines para biotério, marca Insight, modelo EB273, já adquiridas pelo Biotério Central. Essas cabines possuem controle permanente e automático de temperatura (mantida entre 22-26°C), iluminação controlada (ciclos 12hs claro/escuro), umidade monitorada (mantida entre 40-60%), sistema insuflador e exaustor de ar (10 a 15 trocas de ar por hora). Ambas as cabines são ligadas em sistemas Nobreak que garantem o funcionamento delas mesmo frente a quedas de energia. As cabines de biotério são abrigadas em sala equipada com aparelho de ar condicionado. Não são utilizadas áreas de alojamento ao ar livre.

A quantidade total de animais utilizados nos experimentos foram 300 camundongos Balb-C (*Mus musculus*) machos e fêmeas pesando entre 18 a 30 g e 150 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas, pesando entre 200 a 300 g.

4.3.2.2 Animais experimentais utilizados para os testes de toxicologia aguda

Para o teste de toxicidade aguda com extrato bruto- EBZZ foram utilizados 35 camundongos Balb-C (machos e fêmeas) divididos em 7 grupos contendo cinco animais (n=5) em cada, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

EAZZ2 - Grupo que recebeu a dose de 10 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZ3 - Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZ4 – Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZ5 – Grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZ6 – Grupo que recebeu a dose de 3500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZ7 – Grupo que recebeu a dose de 5000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

Para o teste de toxicidade aguda com o Extrato hidroalcoólico- EHZZ foram utilizados 35 camundongos Balb-C (machos e fêmeas) divididos em 7 grupos contendo cinco animais (n=5) em cada, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL) não foi tratado com o extrato.

EHZZ2 – Grupo que recebeu a dose de 10 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZ3 - Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZ4 – Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZ5 – Grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZ6 – Grupo que recebeu a dose de 3500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZ7 – Grupo que recebeu a dose de 5000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

4.3.2.3 Teste de toxicidade aguda

A toxicidade aguda foi avaliada via oral em camundongos da espécie *Mus musculus* da dose letal 50% (DL₅₀), segundo o método de Morrison et al. (1998) ; Litchfield e Wilcoxon (1949). Os animais utilizados no teste estavam em jejum completo (18 horas).

Após uma hora da administração dos extratos, os animais foram submetidos ao teste de tônus muscular (Teste do bastão) e teste de atividade exploratória (Teste do Campo-aberto) e permaneceram em observação por 14 dias, pelo horário matutino (1 hora). Após a observação os animais foram sacrificados sendo realizada a dissecação para a análise dos órgãos.

4.3.2.4 Teste de atividade de Tônus muscular (Teste do Bastão) com os grupos de animais do teste de toxicidade aguda

Neste teste os animais tentam se equilibrar no bastão e cai em uma superfície, sendo feita a contagem do tempo em que passaram no bastão. Em seguida, esses animais foram direcionados para o teste de atividade exploratória no Campo-aberto.

4.3.2.5 Teste de atividade exploratória (Teste do Campo-aberto) com os grupos de animais do teste de toxicidade aguda (DL₅₀)

Para este teste os animais procedentes do teste de tônus muscular foram colocados cada um individualmente em um campo-aberto, um campo confeccionado em madeira (30 x 30 x 15 cm) usado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo) na periferia (atividade exploratória) e no centro (atividade ansiolítica ou sedativa) do campo, assim como o tempo que permanece parado (imobilidade=sedação ou medo) e a sua defecação, como índice de emocionalidade, foram observados no campo-aberto durante 5 min, houve também a observação até 1 hora fora do campo-aberto dos parâmetros comportamentais de droga estimulante do SNC ou depressora do SNC (LAPA et al., 2005).



Figura 6 – Teste do Campo-aberto

Fonte: Daniely Machado, 2013.

Tabela 3 – Parâmetros observados para o teste de Toxicidade aguda.

Estimulantes SNC*	Depressores SNC*
Motilidade	Motilidade
Tremores finos	Alienação ao Ambiente
Frequência respiratória	Frequência Cardíaca
Tremores Grosseiros	Tônus da Costa
Piolerção	Catatonía
Sialorréia	Exolftalmia
Exolftalmia	Ptose palpebral
Fasciculações	Paralisia tremores posterior
Movimentos Estereotipados	Analgesia
Midríase	Sedação
Lamber as patas	Anestesia
Ereção Cauda	Diâmetro pupilar
Coçar Focinho	Perda do reflexo corneano
Tremor Cauda	Ataxia
Morder cauda	Dispneia
Diâmetro pupilar	
Convulsão crônica	
Convulsão Tônica	

*SNC: Sistema Nervoso Central. Fonte: LAPA et al., 2005

4.3.2.6 Animais experimentais utilizados para os testes de toxicologia sub-aguda (doses repetidas ou dose subcrônica).

Para o teste de toxicidade subaguda com extrato bruto- EBZZ foram utilizados 24 ratos Wistar divididos em 4 grupos contendo 6 animais (3 machos e 3 fêmeas, n=6) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu diariamente somente o veículo salina 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

EBZZSUB2- Grupo que recebeu diariamente a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZSUB3- Grupo que recebeu diariamente a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZSUB4- Grupo que recebeu diariamente a dose de 3000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

Para o teste de toxicidade subaguda com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 24 ratos Wistar divididos em 4 grupos contendo 6 animais (3 machos e 3 fêmeas, n=6) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu diariamente somente o veículo salina 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL) não foi tratado com o extrato.

EHZZSUB2- Grupo que recebeu diariamente a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZSUB3- Grupo que recebeu diariamente a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZSUB4- Grupo que recebeu diariamente a dose de 3000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

4.3.2.7 Teste de toxicidade sub-aguda (doses repetidas ou dose subcrônica).

Os ratos da espécie *Rattus nuvergicos* foram avaliadas através da exposição única e diária por um período de 30 dias. O peso corporal e a quantidade de água e ração foram monitorados diariamente ao longo dos 30 dias estabelecidos, assim como, a presença de sinais e sintomas de toxicidade (HAYES e WILSON, 1994).

Ao final desse período os animais foram anestesiados e o sangue coletado através da veia cava inferior, para a realização de exames hematológicos (contagem de leucócitos, plaquetas, hemácias, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM e linfócitos). E bioquímicos (glicoses, TGO, TGP, albuminas, colesterol total, uréia e creatinina). Em seguida os animais foram sacrificados e seus órgãos pesados: pulmões, coração, fígado, rins, estômago e retirados para análises macroscópicas, os fígados dos animais para análises histopatológicas foram enviados para o laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O material foi armazenado em tubos próprios para os exames contendo heparina, apenas os tubos para os exames bioquímicos foram centrifugados em centrífuga a 100 rpm. Os tubos com o material foram conservados no isopor com gelo para serem analisados em laboratório de análises clínicas Multicenter (Manaus-Amazonas).

4.3.3 Atividade Anti-úlceras

4.3.3.1 Animais experimentais para a Atividade Anti-úlceras

Para a atividade antiulcera com extrato bruto - EBZZ foram utilizados 30 camundongos Balb-C (15 machos e 15 fêmeas) divididos em 6 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu somente o veículo água da torneira 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

Ranitidina- Grupo controle positivo receberam Ranitidina- Antiúlcero comercial (50 mg/kg, *v.o*) não foi tratado com o extrato.

EBZZU3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZU4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZU5- Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZU6- Grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*.

EBZZU7- Grupo que recebeu a dose de 5000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*.

Para a atividade antiulcera com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 30 camundongos Balb-C (15 machos e 15 fêmeas) divididos em 6 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo que recebeu somente o veículo água da torneira 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL) não foi tratado com o extrato.

Ranitidina- Grupo controle positivo receberam Ranitidina- Antiúlcero comercial (50 mg/kg, *v.o*) não foi tratado com o extrato.

EHZZU3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZU4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZU5- Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZU6- Grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*.

EHZZU7- Grupo que recebeu a dose de 5000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*.

4.3.2 Atividade anti-úlceras induzida por etanol

Para atividade anti-úlceras, o agente lesivo foi o etanol, a lesão se caracteriza pela presença de focos hiperêmicos e hemorrágicos, indicando o comprometimento de fluxo sanguíneo pelo agente lesivo (GLAVIN e SZABO, 1992).

Os animais utilizados no experimento estavam em jejum por 18 horas, e receberam o tratamento conforme citado anteriormente. Após uma hora dos tratamentos, o etanol foi administrado (75%, 1 mL/ 100g, *v.o*). Após 1 hora da administração do etanol os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sem anestesia.

Os animais sacrificados tiveram a parede abdominal exposta, o estômago foi localizado e removido. O órgão foi mantido em placa de petri sobre gelo, lavou-se externamente e abriu-se ao longo da pequena curvatura. Através da “leitura cega” o índice de lesão e o número de úlceras foram determinados, de acordo com a **tabela 4**, verificando a pontuação da lesão gástrica (LAPA et al., 2005).

Tabela 4 – Escala para avaliação da ulceração da mucosa gástrica em camundongos.

Parâmetros	Pontuação
Perda de pregas da mucosa	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	2 pontos
Patéquias	3 pontos
Úlceras até 1mm	*n x 2 pontos
Úlceras maior que 1mm	*n x 3 pontos
Úlceras perfuradas	*n x 4 pontos

*n corresponde o número de úlceras encontradas. Fonte: LAPA et al., 2005.

4.3.4 Atividade nociceptiva

4.3.4.1 Animais experimentais no teste de Contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos

Para o teste de contorção abdominal com extrato bruto- EBZZ foram utilizados 25 camundongos Balb-C (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EBZZCA3- Grupo que recebeu a dose de 250 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZCA4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZCA5- Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

Para o teste de contorção abdominal com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 25 camundongos Balb-C (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL) não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EHZZCA3- Grupo que recebeu a dose de 250 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZCA3- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZCA4- Grupo que recebeu a dose de 1000 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*.

4.3.4.2 Teste de Contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos

Os animais (camundongos) foram submetidos ao jejum durante 18 horas e distribuídos em seguida foram administrados com o tratamento conforme citado anteriormente. Após 1 hora, as contorções foram induzidas por ácido acético 1% (0,01 ml/100g, *i.p*). Em seguida, foram avaliadas as contorções abdominais decorridos 15, 30, 45, 60 minutos após a administração do ácido acético (LAPA et al., 2005). Os resultados serão representados como médias e erros padrão do n° do percentual de contorção.

4.3.4.3 Animais experimentais no teste da placa quente

Para o teste da placa quente (52°C) com extrato bruto - EBZZ foram utilizados 35 camundongos Balb-C (18 machos e 17 fêmeas) divididos em 7 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EBZPQ3- Grupo que recebeu a dose de 30 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZPQ4- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZPQ5- Grupo que recebeu a dose de 250 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZPQ6- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZPQ7- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*.

Para o teste da placa quente (52°C) com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 35 camundongos Balb-C (18 machos e 17 fêmeas) divididos em 7 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL) não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EHZPQ3- Grupo que recebeu a dose de 30 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZPQ4- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZPQ5- Grupo que recebeu a dose de 250 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZPQ6- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZPQ7- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

4.3.4.4 Teste da placa quente

Este teste caracteriza-se pela colocação do animal sobre uma superfície aquecida a 52°C que determinará uma resposta característica, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés, levanta ou lambe as patas. O aparecimento destas respostas pode ser indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico (LAPA et. al., 2005).

Os animais estavam em jejum por 18 horas e foram colocados individualmente no equipamento HOT PLATE F361-INSIGHT com temperatura constante de 52 a 54°C. Os animais foram distribuídos em grupos e receberam o tratamento conforme citado anteriormente. A resposta foi avaliada, decorridos 15, 30, 45, 60 minutos da administração das drogas.

O tempo máximo de contato do animal com a placa quente foi mantido em 25s, (tempo de corte) com o objetivo de evitar lesões nas patas dos animais. A redução da temperatura da placa quente associada à aplicação de um estímulo inflamatório intraplantar fornece um modelo simples e sensível para a avaliação da hiperalgesia térmica (LAPA et. al., 2005).

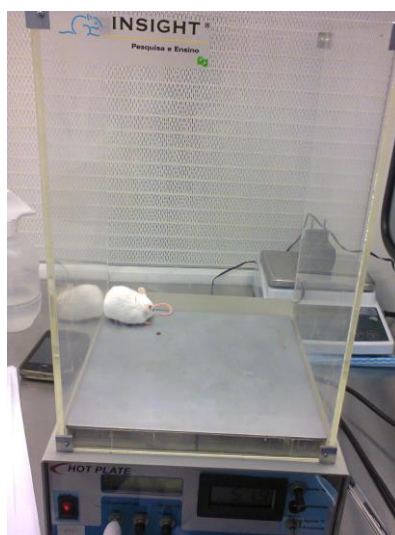


Figura 7 – Teste da Placa quente

Fonte: Daniely Machado, 2013.

4.3.4.5 Animais experimentais utilizados para o teste de Hiperalgisia (Dor inflamatória causada por estímulo mecânico).

Para o teste de Hiperalgisia com extrato aquoso- EAZZ foram utilizados 25 ratos Wistar (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o*, não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EBZHIP3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZHIP4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZHIP5- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

Para o teste de Hiperalgisia com extrato hidroalcoólico- EHZZ foram utilizados 25 ratos Wistar (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL *v.o* e Tween 4% (0,1mL), não foi tratado com o extrato.

Ketamina- Grupo controle positivo que recebeu Ketamina® um analgésico comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EHZHIP3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZHIP4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZHIP5- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*.

4.3.4.6 Modelo de medida da Hiperalgisia utilizando o aparelho analgesímetro (Dor inflamatória causada por estímulo mecânico)

Os ratos da espécie *Rattus norvegicus* estavam em jejum por 18 horas para serem submetidos à medida do volume de ambas as patas, utilizando o aparelho LE 7306 Analgesy Meter. Em seguida, os animais foram distribuídos em grupos e receberam o tratamento conforme citado anteriormente.

Com a pressão do aparelho foi possível determinar a resposta à estimulação da dor através da pressão aplicação à pata dos ratos, esta força é aplicada através de uma ponta cônica que pressiona o membro do animal, esta ponta move-se para baixo (aumento de força) e para cima (libera estímulo) através de um motor controlado. Através dessa ação, o aparelho indica o número da massa máxima e mínima aferida na pata do animal registrada pelo aparelho, obtendo assim a massa em minutos. A resposta (número da massa máxima e mínima) foi avaliada em 15, 30, 45 e 60 minutos (LAPA et al., 2005).

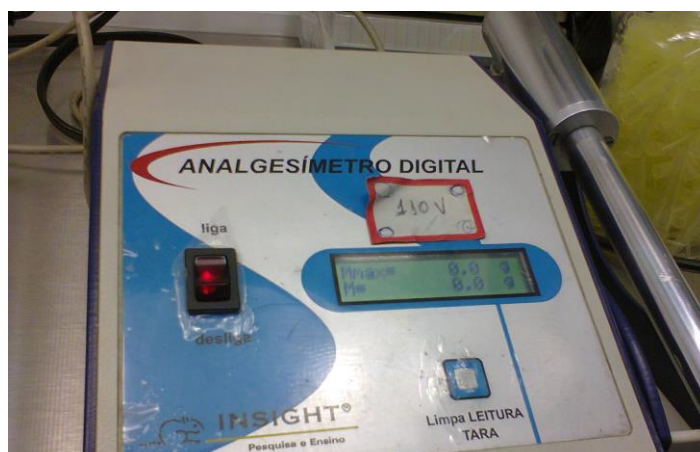


Figura 8 – Aparelho Analgesímetro.

Fonte: Daniely Machado, 2013.

4.3.5 Atividade Anti-inflamatória

4.3.5.1 Animais experimentais utilizados no teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina (Dor inflamatória causada por estímulo químico).

Para o teste de Edema de Pata com extrato bruto- EBZZ foram utilizados 25 ratos Wistar (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 9% (5 mg/kg, *v.o*) não foi tratado com o extrato.

Indometacina- Grupo controle positivo que recebeu Indometacina anti-inflamatório comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EBZZEP3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZEP4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EAZZEP5- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato bruto de *Z. zerumbet*

Para o teste de Edema de Pata com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 25 ratos Wistar (13 machos e 12 fêmeas) divididos em 5 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o veículo salina 0,9 mL e Tween 4% (0,1mL), não foi tratado com o extrato.

Indometacina- Grupo controle positivo que recebeu Indometacina anti-inflamatório comercial (50 mg/kg, *i.p*), não foi tratado com o extrato.

EHZZEP3- Grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZEP4- Grupo que recebeu a dose de 500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*

EHZZEP5- Grupo que recebeu a dose de 1500 mg/kg *v.o* do extrato hidroalcolico de *Z. zerumbet*.

4.3.5.2 Edema de Pata Induzido por Carragenina (Dor inflamatória causada por estímulo químico).

Para este teste foi utilizados *Ratus norvegicus* machos ou fêmeas em grupos de cinco animais por grupo experimental. Após o jejum de 16 horas, os animais foram distribuídos em grupos, em seguida receberam o tratamento conforme citado anteriormente. Após uma hora dos tratamentos, foi injetado nos animais, na região suplantar (*s.c*), nas patas traseiras direitas, 0,01 mL de carragenina (1%) igual e volume de salina (0,9%) na pata contra lateral. Ao final da experiência, foi representada a evolução do edema em função do tempo através da medição

das pastas por meio de um paquímetro digital nos tempos decorridos 15, 30, 45, 60 e 90 min e foi testada estatisticamente a diferença entre os grupos (WHINTTLE, 1963).



Figura 9 – Atividade Edema de Pata.

Fonte: Daniely Machado, 2013.

4.3.5.3 Animais experimentais utilizados para o teste de Edema de orelha induzido por formol

Para o teste de Edema de orelha com extrato bruto - EBZZ foram utilizados 20 camundongos Balb-C (10 machos e 10 fêmeas) divididos em 4 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o gel indutor não foi tratado com o extrato.

Indometacina- Grupo controle positivo que recebeu Indometacina anti-inflamatório comercial (50 mg/kg), não foi tratado com o extrato.

EBZZEO1- Grupo que recebeu 100 mg/kg do extrato bruto de *Z. zerumbet*

EBZZEO2- Grupo que recebeu 300 mg/kg do extrato bruto de *Z. zerumbet*.

Para o teste de Edema de Pata com extrato hidroalcolico- EHZZ foram utilizados 20 camundongos Balb-C (10 machos e 10 fêmeas) divididos em 4 grupos contendo 5 animais (n=5) em cada grupo, a seguir os grupos trabalhados:

Basal- Grupo controle negativo que recebeu somente o gel indutor não foi tratado com o extrato.

Indometacina- Grupo controle positivo que recebeu Indometacina anti-inflamatório comercial (50 mg/kg), não foi tratado com o extrato.

EHZZEO3- Grupo que recebeu 100 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

EHZZEO4- Grupo que recebeu 300 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet*

4.3.5.6 Edema de orelha induzido por formol

O efeito não anti-inflamatório tópico foi também avaliado por este modelo, sendo utilizado cinco camundongos por grupo experimental de acordo com o método empregado por Recio et al. (1995) e Romay, et al. (1998). Os animais foram distribuídos em grupos, em seguida, receberam o tratamento, aplicando topicamente 20µL do Extrato bruto (EBZZ) ou Extrato Hidroalcoólico (EHZZ) ou Indometacina (Controle positivo) nas orelhas direitas e o veículo (gel neutro indutor, utilizado para uso tópico- Controle Negativo) nas orelhas esquerdas dos animais, mantendo as soluções em contato com a orelha por 5 min. Uma hora após os tratamentos foi aplicado também topicamente 10 µL de formol (5%v/v em acetona) na orelha direita e o mesmo volume de acetona na orelha esquerda. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e foram retirados os fragmentos de 6 mm de diâmetro de cada orelha e pesados em balança analítica. Os resultados foram representados como médias e erros padrão das diferenças de peso entre as orelhas direita e esquerda, quanto menor a diferença de peso maior o potencial de inibição (ROCHA et al, 2008). A porcentagem de inibição do edema foi calculada pela subtração da média dos pesos do controle negativo, pela média dos pesos do controle positivo (Indometacina) ou EBZZ ou EHZZ, dividindo-se pelo controle negativo e multiplicando-se por 100.

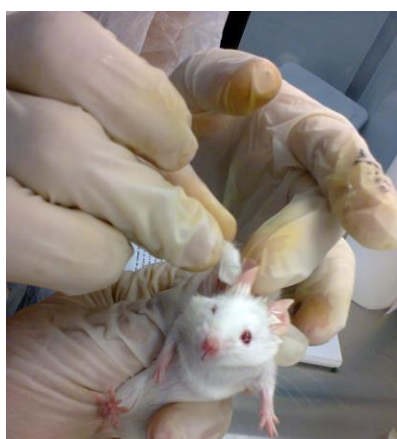


Figura 10– Atividade Edema de Orelha.

Fonte: Daniely Machado, 2013.

4.4 METODOLOGIA (PARTE IV)- Análise Microbiológica

4.4.1 Atividade Anti- *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria flagelada e microaerofílica, coloniza a mucosa do estômago e duodeno e está associada a patologias gástricas, como gastrite, ulcera péptica e adenocarcinoma, esta bactéria foi descrita pela primeira vez por Marshall e Warren (USTUN et al., 2006).

Para determinar a atividade dos extratos EBZZ, EHZZ e EOZZ - Óleo essencial de *Z.zerumbet* frente a *H.pylori*, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Fisiologia e Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo- UNESP em Araraquara-SP. A atividade anti- *H. pylori* (cepa ATCC 43504) utilizou-se o método de microdiluição das amostras nas concentrações de 1000 à 7,81µg/mL (Ensaio realizados em triplicata), o meio utilizado foi Mueller Hinton suplementado com soro bovino, foram realizadas diluições seriadas, o controle positivo foi com amoxicilina. O inóculo bacteriano foi preparado baseado na escala turbidimétrica 0.5 de Mac Farland. Após a solidificação do meio de cultura, foi semeado 1 µL da suspensão bacteriana em cada vidro com os extratos diluídos no meio de cultura. Foram incubados em condições ideais de microaerofilia e umidade, a 35° C por 48-72 horas (CLSI, 2006).

4.5 METODOLOGIA (PARTE V)- Aplicação Biotecnológica do extrato bruto (EBZZ) e hidroalcólico (EHZZ) de *Zingiber zerumbet* L. Smith (ZZ).

4.5.1 Desenvolvimento de cápsulas de EBZZ e EHZZ

4.5.1.1 Produção das cápsulas

As cápsulas escolhidas foram as de gelatinas duras , onde são as formas farmacêuticas de medicamentos consumidas de maior frequência nas administrações orais.

As cápsulas foram desenvolvidas de acordo com o método empregado pela ANVISA (BRASIL, 2015b). Onde os principais procedimentos envolvidos na manipulação foram:

1. Pesagem
2. Moagem ou tamisação dos pós
3. Mistura
4. Enchimento das cápsulas
5. Limpeza externa
6. Acondicionamento

A pesagem foi realizada individual dos componentes da fórmula manipulada em balança. O tamanho das cápsulas utilizadas para o extrato bruto e hidroalcolico de ZZ foi de 0.00, onde 1,40 mL do extrato mais adjuvante foi adicionado.

O adjuvante o amido foram utilizados como adjuvantes, para realizar a mistura de cada extrato, utilizou-se grau e pistillo fazendo movimentos circulares com o pistillo do centro à periferia e da periferia ao centro.

Para o enchimento das cápsulas foram utilizadas diversas técnicas, mas a técnica escolhida para o presente trabalho foi a da encapsuladora semi-automática da marca CAPSUTEC (**Figura 11**), com o intuito de criar modelos para futuramente estarem no mercado.



Figura 11– Encapsuladora semi-automática

Fonte: Daniely Machado, 2015.

4.6 METODOLOGIA (PARTE VI)- Análise Estatística

4.6.1 Análises estatísticas dos experimentos

Os resultados foram expressos através da Média \pm desvio padrão (DP) para cada grupo de animais o número (n) foi indicado nas tabelas. As análises estatísticas foram realizados pela Análise única de variância (ANOVA). O teste de t student foi utilizado para a determinação da diferença significativa. O valor $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os dados foram computados e registrados pelo programa Graph Prisma 6. Para o cálculo da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi obtida por regressão linear simples utilizando o programa Microcal TM Origin Versão 6.0 da Microcal Software Inc, e os resultados foram apresentados em forma de figuras e tabelas.

Resultados e Discussão

5.1 Caracterização Fitoquímica

5.1.1 Rendimento do extrato

Nas análises de variância dos percentuais de rendimento dos rizomas de *Zingiber zerumbet* verificou-se que 6 kg dos rizomas de ZZ obteve-se um teor extrativo de 60g do extrato bruto e 10g do extrato hidroalcoólico, em um percentual de 1% e 0,16%, respectivamente.

5.1.2 Propriedades organolépticas e pH dos extratos

O extrato bruto apresentou a coloração verde-clara e o extrato hidroalcoólico amarelo escuro. O extratos possuem um odor característico. Ambos os extratos tinham o pH em torno de 6,0.

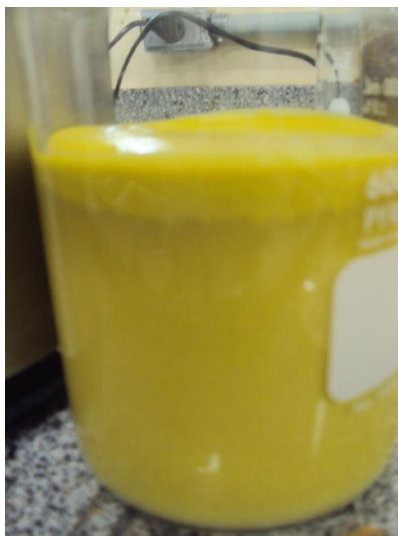


Figura 12– Extrato bruto de *Zingiber zerumbet*.

Fonte: Daniely Machado, 2013.



Figura 13– Extrato hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet*.

Fonte: Daniely Machado, 2013.

Os princípios amargos são substâncias que estimulam os receptores de sabores amargos na base da língua. Acredita-se que isso pode desencadear uma reação no nervo vago, que por sua vez, estimula a produção de secreções gástricas. Ervas de sabor amargo têm longa tradição como estimulantes da função digestiva, e em muitos sistemas tradicionais de medicina, são utilizadas como tônicos para o estômago, fígado, vesícula e pâncreas (SELEÇÕES DO READER'S DIGEST, 2014).

5.1.3 Screening Fitoquímico

O *screening* fitoquímico dos extratos bruto e hidroalcoólico do *Zingiber zerumbet* L. Simth revelou a presença dos seguintes compostos: xantonas, flavonóides, fenóis e taninos de acordo com a **Tabela 4**.

Tabela 5 – Prospecção fitoquímica dos extratos bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet*.

Substância	EBZZ	EHZZ	Método
Antocianinas	-	-	*Teste Antocianinas, Antocianidinas e flavonoides.
Antocianidinas	-	-	---//---
Xantonas	+	+	---//---
Chalconas	-	-	---//---
Auronas	-	-	---//---
Flavonóides	+	+	---//---
Fenóis	+	+	*Teste FeCl ₃
Taninos	+	+	*Teste FeCl ₃
Alcaloides	-	-	*Teste de Dragendoff e Meyer

*Método empregado de acordo com Mattos (1997).

Uma planta é classificada como medicinal por possui substâncias que têm ação farmacológica. Estas substâncias são denominadas de princípios ativos e, na maioria das vezes, não se sabe quais destes realmente estão atuando (FURLAN, 1998).

Em estudos de Chang et al. (2012) o *screening* fitoquímico revelou a presença de compostos da classe química: alcaloides, flavonóides, taninos e fenóis no extrato etanólico de *Zingiber zerumbet*, em nossos estudos também foram encontrados essas substâncias em EBZZ e EHZZ, em exceção os alcaloides.

Em nosso *screening* fitoquímico foram encontrados flavonóides em EBZZ e EHZZ, Nag e colaboradores (2013) também encontraram flavonóides no extrato etanólico de *Z.*

zerumbet. Jang et al. (2004) encontrou flavonóides aromáticos no extrato metanólico, tais como: p-hidroxibenzaldeído, vanilina e caenferol. Fagundes e Costa (2003) afirmam que os flavonóides possuem atividade antioxidante, atuam na redução do risco de câncer e doença cardiovascular.

Conforme os nossos estudos também foram encontrado fenóis, de acordo com Drenownski e Gomez (2000), os mais importantes compostos fenólicos são: pólifenóis, ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos) e os flavonóides. O sabor amargo e adstringente da maioria dos alimentos e bebidas que contêm essas substâncias se deve à presença de compostos fenólicos.

Rocha (2014) cita que os compostos fenólicos apresentam um gosto amargo, excitam as células gustativas, estimulam o apetite e aumentam a secreção dos sucos gástricos. A farmacologia agrupa, sob o nome de princípios amargos, as substâncias vegetais terpênicas.

Neste estudo também foram encontrados em EBZZ e EHZZ, as xantonas são uma classe de polifenólicos, cuja grande maioria tem proveniência natural ocorrendo como metabólitos secundários bastante comuns em várias famílias de fungos, líquens, e principalmente, plantas. Em geral, as plantas produzem esses compostos como finalidade de defesa contra o ambiente externo e de predadores (RAI; CARPINELLA, 2006).

Também foram encontrados em EBZZ e EHZZ os taninos que são substâncias de composição química variável apresentam uma característica comum: a capacidade de coagular as albuminas, os metais pesados e os alcaloides. São hidrossolúveis e tem a importância medicinal reside essencialmente na sua natureza adstringente: possuem a propriedade de coagular as albuminas das mucosas e dos tecidos, criando assim uma camada de coagulação isoladora e protetora, cujo efeito é reduzir a irritabilidade e a dor. Os taninos de alto peso molecular estão presentes nos vinhos e dão sabor adstringente, os de baixo peso molecular tendem ao sabor amargo. (DREOWNOSKI; GOMEZ, 2000; ROCHA, 2014).

5.1.4 Análise Cromatográfica

5.1.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

Na **Tabela 6**, apresenta-se a cromatografia delgada do extrato bruto (EBZZ), indicando uma mancha revelada no iodo com o fator de retenção (Rf) de aproximadamente 0,7 cm, comparando com o fator de retenção do padrão Zerumbona (ZER), apresentando semelhanças nos Rfs, possivelmente a mancha encontrada em EBZZ é a Zerumbona.

No extrato hidroalcoólico (EHZZ) apresentaram três manchas reveladas no iodo a 254nm tendo fatores de retenção distintos comparados com o padrão e o extrato aquoso.

A revelação da placa cromatográfica com o sulfato sérico, corando o extrato de Diclorometano e Zerumbona, como uma mancha de coloração laranja escuro com Rf =0.7 (EBZZ) e 0.6 para EHZZ, todas as placas foram positivas para o reagente utilizado, sugerindo-se de que as substâncias testadas possuem características para terpenóide.

Tabela 6– Cromatografia de camada delgada dos extratos aquoso e hidroalcoólico de ZZ.

Amostra	Eluente	Revelador	UV	Rf
Zerumbona (Padrão)	8:2 Acetato clorofórmio	Iodo Sulfato sérico	254 nm	0,8
EBZZ	8:2 Acetato clorofórmio	Iodo Sulfato sérico	254nm 352 nm	0,7
EHZZ	8:2 Acetato clorofórmio	Iodo Sulfato sérico	254 nm 352 nm	0,6

A seguir, a placa cromatográfica de Zerumbona (ZER) revelada em iodo conforme mostra a **figura 14** e EHZZ revelada em UV 254 nm e 365 nm (**figura 15 e 16**), utilizando como solvente de corrida o Acetato de Etila e Clorofórmio na proporção 8:2, verifica-se que existe uma mancha em EHZZ semelhante a Zerumbona, a mesma substância como Rf também semelhante ao de ZER.



Figura 14– Placa CCD de Zerumbona revelada em iodo. Fonte: Daniely Machado, 2013.

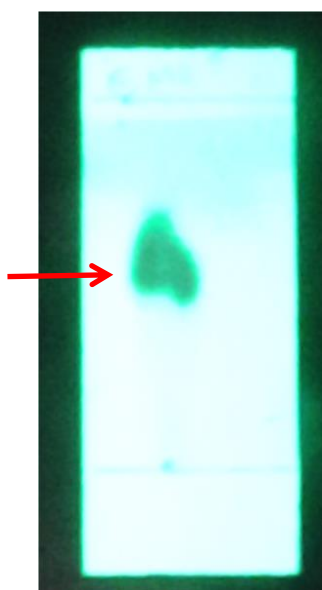


Figura 15– Placa CCD de EHZZ revelada em UV 254nm. Fonte: Daniely Machado, 2013.

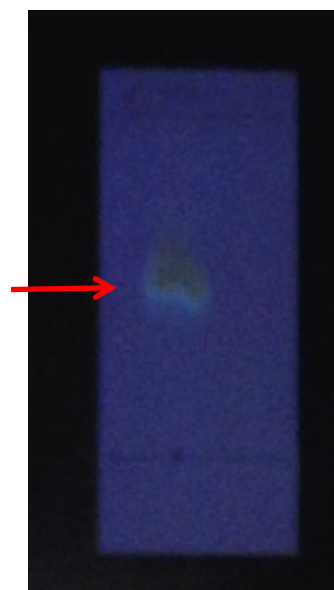


Figura 16– Placa CCD de EHZZ revelada em UV 365nm. Fonte: Daniely Machado, 2013.

Pinheiro (2005) realizou a análise em camada fina de sílica-gel dos extratos Diclorometano (DCM), Metanólico (MeOH) e Zerumbona dos rizomas de *Z. zerumbet*. O revelador utilizado foi o sulfato sérico, que tem altas especificidades para revelar inclusive pequenas quantidades de terpenóides. A revelação da placa cromatográfica com o sulfato sérico, corou o extrato de Diclorometano e Zerumbona, como uma mancha de coloração laranja escuro com $R_f = 0.7$, todas positivas para o reagente utilizado. A revelação da cromatografia em iodo do extrato de DCM e Zerumbona, mostraram manchas com R_f iguais. Enquanto que o extrato Metanólico mostrou várias manchas com R_f diferentes. O extrato DCM e Zerumbona quando revelados em UV mostraram uma coloração na faixa de absorção em 254nm, que pode ser indício característico da presença de Zerumbona pois esta apresenta um grupo cromóforo.

Em outro estudo por Pinheiro (2009), realizando a análise de CCD dos extratos metanólico (MeOH) e Diclorometano (Dcm) obtidos dos rizomas de *Z. zerumbet*, comparando com a Zerumbona padrão também apresentou na placa CCD uma mesma mancha visível e R_f 's próximos possivelmente pode ser a Zerumbona utilizando os reveladores iodo, anisaldeído e sulfato sérico em UV 254nm e 365nm.

5.2 Análise Físico-química

5.2.1 Determinação de minerais

A preparação da amostra dos rizomas de *Zingiber zerumbet* para a realização da análise de teor de minerais, consistiu no procedimento analítico onde a amostra foi convertida em um material homogêneo, isto é, trituração prévia da amostra dos rizomas; pré-secagem em estufa com circulação de ar forçada em 55°C, e moagem e peneiramento da amostra parcialmente seca.

De acordo com a **tabela 7**, verifica-se que na amostra dos rizomas secos existe expressiva quantidade de ferro (231 mg/kg) e potássio (30,58 g/kg). Esses dois elementos minerais são de suma importância para a nutrição, sendo importantes para o bom funcionamento do corpo humano.

Tabela 7 – Análise de Teor de Minerais dos rizomas secos de gengibre amargo *Zingiber zerumbet* L. Smith em Manaus- AM.

Lote	P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn
(INPA/CPN)	g/kg				mg/kg		
Manaus	0,83	30,58	3,90	2,80	231	68	46

O potássio é um elemento de origem mineral. Estudos científicos comprovam que o potássio regula a pressão arterial e previne o acidente vascular cerebral. Exerce um papel essencial em muitas das funções mais importantes de nosso corpo, tais como contração muscular, condução nervosa, frequência cardíaca, produção de energia e síntese de ácidos nucleicos e proteínas (MINHA VIDA, 2015).

O ferro é um mineral essencial. Ele é fundamental para o bom funcionamento das células e para a síntese de DNA e metabolismo energético. Na hemoglobina o ferro tem a função de transportar oxigênio para o músculo em atividade. O ferro desempenha papéis na produção de colágeno e elastina, dois componentes necessários na integridade do tecido conjuntivo, na manutenção do sistema imunológico, na produção e regulação de vários neurotransmissores cerebrais e na proteção contra danos provocados por oxidantes. Os principais benefícios do ferro são: bom para o funcionamento do coração, previne a anemia, fornece energia e é essencial para a oxigenação (MINHAVIDA, 2015).

Em estudos de Tanzima et al. (2011), onde realizou a análise de teor de minerais também nos rizomas de *Zingiber zerumbet* e verificou que a planta também contém a quantidade razoável de minerais (potássio 0,495%, magnésio 0,165%, ferro 180 ppm e manganês 660 ppm). Em nossos estudos foram encontrado maiores quantidades de Potássio, magnésio e ferro nos rizomas secos conforme a **Tabela 7**.

A análise do teor de minerais dos rizomas de *Z. zerumbet* foi primeiramente realizada, pois, são através dos rizomas que são produzidos os extratos bruto e hidroalcoólico.

5.2.2 Composição Centesimal

A Composição química ou composição centesimal de um alimento são conhecidas através de análises químicas de determinação: umidade ou voláteis a 105°C; cinzas; lipídeos; proteínas; fibras; carboidratos, quando determinado por diferença (MORETO, et al., 2002).

Tabela 8- Análise Centesimal dos rizomas secos de *Zingiber zerumbet*.

Composição (g/100g)	Rizomas Secos
Umidade	11,2±0,2 ^b
Cinzas	4,2±0,26 ^b
Proteínas	8,3±0,25 ^a
Lipídeos	4,7±0,21 ^a
Fibras	7,1±0,1 ^b
Carboidratos	64,6±0,4 ^b
Valor Energético*	333,9±0,4

*Kcal= g/100g. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente no teste de Tukey (p<0,05).

A preparação da amostra dos rizomas de *Zingiber zerumbet* para a realização da composição centesimal, consistiu no procedimento analítico onde a trituração prévia da amostra dos rizomas; pré-secagem em estufa com circulação de ar forçada em 55°C, e moagem e peneiramento da amostra parcialmente seca.

Os resultados da análise centesimal dos rizomas encontram-se na **tabela 8**, em destaque o teor de proteínas de 8,3%, o teor de lipídeos 4,7%, o valor de fibras de 7,1% e carboidratos de 64,6%.

Em estudos por Tanzima et al. (2011) de avaliação centesimal do rizomas de *Zingiber zerumbet*, verificou o teor de umidade de 0,90%, o teor de lipídeos de 0,96%, o teor

de proteínas de 1,66%, o valor de fibras de 2% e o valor de carboidratos foi de 1,18%. De acordo com os nossos resultados com os rizomas secos de *Zingiber zerumbet* foram obtidos quantidades superiores de proteínas, lipídeos, fibras e carboidratos conforme a **tabela 8**.

Estes resultados colaboram com os estudos científicos da avaliação nutricional dos rizomas de *Zingiber zerumbet*, visto que existem poucos relatos na literatura.

5.2.3 Atividade Antioxidante

A **tabela 9** apresenta a atividade antioxidante pelo método de DPPH do extrato Bruto de *Zingiber zerumbet*, os resultados comprovam que EBZZ teve bons percentuais de inibição de ZZ em destaque na concentração de 7.8 µg/mL inibindo o DPPH em 11.14%.

Tabela 9 – Percentuais de inibição do DPPH para amostras do Extrato bruto de ZZ

Concentração (µg/mL)	Inibição do DPPH (%)*
125	72,09±2,50
62,5	52,11±0,78
31,25	34,58±2,30
15,62	21,13±0,93
7,81	11,14±1,11

*Média dos ensaios em triplicata± desvio padrão.

Os resultados foram expressos em CI50 (Concentração de extrato em µg/mL capaz de reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH). Portanto, quanto menor o valor de CI50, maior será a atividade antioxidante do extrato analisado. O resultado da CI50 do extrato bruto encontra-se na **figura 17**, a CI50 foi calculada em 11.7 µg/mL, ou seja, com apenas 11.7µg/mL é capaz de reduzir 50% do radical DPPH.

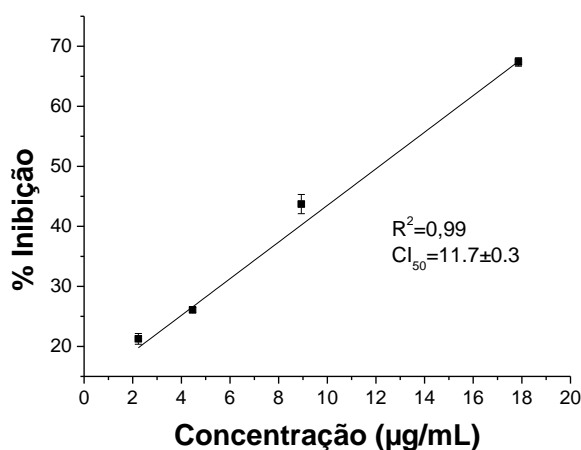


Figura 17- Potencial antioxidante de EBZZ frente ao radical livre DPPH.

Os resultados da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* estão na **tabela 10**, de acordo com as concentrações testadas (7,81 a 62,5), em destaque a concentração de 71,81 $\mu\text{g/mL}$ teve um percentual de inibição do DPPH de 26,92% e a concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ obteve uma inibição de 80,77%.

Tabela 10– Percentuais de inibição do DPPH para amostras do Extrato hidroalcoólico de ZZ

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição do DPPH (%)*
62,5	80,77 \pm 1,91
31,25	52,95 \pm 0,92
15,62	43,39 \pm 2,08
7,81	26,92 \pm 1,40

*Média dos ensaios em triplicata \pm desvio padrão.

O resultado da CI50 da atividade antioxidante de EHZZ encontra-se na **figura 18**, com apenas 4.32 $\mu\text{g/mL}$ é capaz de reduzir 50% do radical DPPH. Comparando-se com EBZZ, o extrato hidroalcoólico (EHZZ) apresenta melhor atividade antioxidante frente ao DPPH.

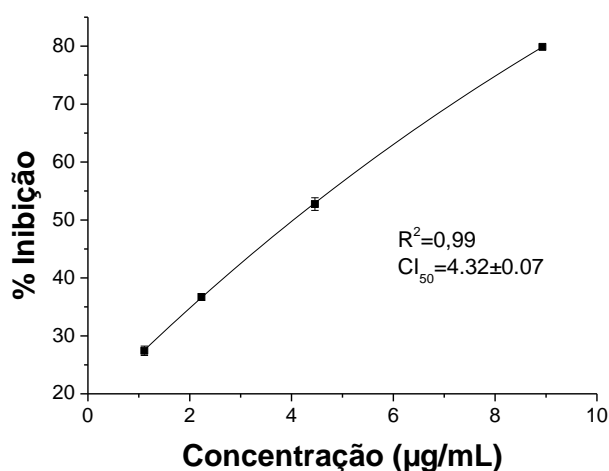


Figura 18- Potencial antioxidante de EHZZ frente ao radical livre DPPH.

Nag e colaboradores (2013), utilizaram o extrato etanólico de *Zingiber zerumbet* para verificar o potencial antioxidante utilizando o método de DPPH, de acordo com as concentrações testadas 0, 30, 60 e 120 $\mu\text{g/mL}$, o extrato mostrou um efeito baixo de inibição de DPPH, o valor foi significativo ($p < 0.05$) para as concentrações testadas, a CI50 foi de 417.14 $\mu\text{g/mL}$. Em nossos resultados com o extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet* obtivemos

uma CI50 bem maior de inibição (4.32 µg/mL) do que a encontrada no extrato etanólico de ZZ por Nag e colaboradores (2013).

Estudos de Stoilova e colaboradores (2007), utilizando outra espécie, o gengibre (*Zingiber officinale*), realizaram a atividade antioxidante do gengibre com o método de DPPH, conseguiram obter a eliminação do radical livre atingindo 90,1% e a concentração CI50 de inibição do DPPH obtiveram de 0,64 µg/ml.

Neste trabalho analisamos a atividade antioxidante dos extratos bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet*, os rizomas desta planta são amplamente utilizado nas ilhas de FIJI (Oceania), a erva é frequentemente ingerido antes das refeições por ser uma fonte rica do flavonóide caenferol (240 mg/100 g) substância antioxidante, a quantidade de caenferol encontrada nos rizomas do *Zingiber zerumbet* é bem maior do que a outra espécie de gengibre *Zingiber officinale* que apenas possui traços de caenferol (LAKO et al., 2007).

Não existem muitos relatos na literatura sobre a atividade antioxidante de extratos etanólico, metanólico e isopropílico de *Zingiber zerumbet* (SREEVANI et al., 2013). Os resultados do potencial antioxidante de EBZZ e EHZZ da presente tese são inéditos para a literatura, visto que existem poucos estudos da atividade antioxidante dos extratos de *Zingiber zerumbet*, verificou-se que os dois extratos atuam como antioxidantes, em destaque EHZZ que teve um excelente resultado de CI50 (4.32 µg/mL).

5.3 Estudo toxicológico e Farmacológico

5.3.1 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de toxicidade com *Artemia salina* são utilizados como método alternativo para a determinação da toxicidade, pois demonstra a sensibilidade da *Artemia salina* a substâncias tóxicas (UTYAMA et al., 2007).

A utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre estes ensaios biológicos encontra-se o ensaio de citotoxicidade com *A. salina*. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais de plantas conhecidos como antitumorais utilizando-se este teste na monitoração de estudos fitoquímicos (SIQUEIRA; BONM; PEREIRA, 1998).

A literatura sugere uma correlação muito positiva entre atividade citotóxica e atividade ant-inflamatória no desenvolvimento de uma possível droga para o tratamento do câncer (MONGELLI et al., 1996).

Os resultados do ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *A. salina* do extrato bruto podem ser observados na **Tabela 11**. O percentual de mortalidade que na concentração de 100 µg/mL taxa de mortalidade das larvas foi de 45%, já na concentração de 25 µg/mL foi de 11,66%, portanto verificou-se que a CL50 (concentração letal media) foi de 117 µg/mL, ou seja nesta concentração consegue-se obter 50% de percentual de mortalidade das larvas.

Tabela 11 – Percentual de mortalidade das larvas de *Artemia salina* utilizando várias concentrações do extrato bruto de *Z.zerumbet* como teste.

Concentração (µg/mL) EBZZ	Percentual de Mortalidade (%)	CL50 (µg/mL)
25	11,66%	-
50	18,33	-
75	28,33%	-
100	45 %	-
-	-	117.4

A **tabela 13** apresenta os resultados do ensaio da toxicidade do extrato hidroalcoólico. Em relação à taxa de mortalidade, a partir da concentração 75 µg/mL consegue-se obter mortalidade das larvas (16,5%), verificou-se que a CL50 é 181.9 µg/mL, com esta concentração é possível obter 50 % de mortalidade das larvas.

Tabela 13 - Percentual de mortalidade das larvas de *Artemia salina* utilizando várias concentrações do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet* como teste.

Concentração (µg/mL) EHZZ	Percentual de Mortalidade (%)	CL50 (µg/mL)
25	0%	-
50	0%	-
75	16,5%	-
100	28,33%	-
-	-	181.9

Pinheiro (2005) utilizando a zerumbona, extrato metanólico e o extrato de Diclorometano no teste de citotoxicidade de *Artemia salina* verificou que a zerumbona

produziu a mortalidade para as larvas com $CL_{50} < 40.50 \mu\text{g/mL}$, extrato metanólico $169,03 \mu\text{g/mL}$ e o extrato diclorometano com $CL_{50} > 68.74 \mu\text{g/mL}$, apresentando efeitos significativos para o teste de citotoxicidade.

Em estudos similares Bucker e colaboradores (2013), verificaram através do teste com *Artemia salina* o efeito tóxico do extrato de Diclorometano e Metanólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet*. Os resultados revelaram que os extratos apresentaram efeito tóxico significativo por 48 horas, o extrato de diclorometano de *Z. zerumbet* apresentou a CL_{50} para a dose de $30.9 \mu\text{g/mL}$ e o extrato metanólico com CL_{50} para a dose de $64.0 \mu\text{g/mL}$.

Portanto, podemos dizer que tanto EBZZ e EHZZ apresentaram efeitos tóxicos significativos nos ensaios de citotoxicidade com larvas de crustáceo *Artemia salina*. Corroborando com o trabalho e Bucker et al (2013) que utilizou extrato metanólico e Diclorometano da planta de *Zingiber zerumbet*.

Os resultados que EBZZ e EHZZ possuem CL_{50} próximas (117.4 e $181.9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), porém o EHZZ apresentou uma CL_{50} maior, ou seja, é preciso uma dose maior de EHZZ para obter 50% de população de larvas de *Artemia salina*.

Estes dados do teste utilizando *Artemia salina* são importantes para a dose de EBZZ e EHZZ que será formulado as cápsulas funcionais.

5.3.2 Toxicidade aguda - Avaliação comportamental e Sistêmica

Nenhuma mortalidade foi observada durante o estudo de toxicidade aguda realizado com o extrato bruto (EBZZ). Os camundongos utilizados no experimento permaneceram em observação durante 14 dias, e não apresentaram mortalidade, após este tempo foram sacrificados e os órgãos analisados.

Na observação da avaliação comportamental, não foi observado nos animais a defecação aumentada no campo. Durante os 14 dias não houve alteração nas fezes e também não houve diarreia.

Na **Tabela 13**, são apresentados os parâmetros observados durante o teste do bastão e campo aberto. Nos grupos **EBZZ2**, **EBZZ3** e **EBZZ4**, em observação houve uma diminuição da motilidade, apenas no grupo **EBZZ4** que receberam a dose de 1000 mg/kg os animais inicialmente tiveram um aumento da frequência cardíaca, porém com os efeitos foram cessados em alguns minutos, mesmo parâmetros foram observados também nos grupos

EBZZ5, **EBZZ6**, e **EBZZ7**, porém não houve diminuição da motilidade. Não houve parâmetros tóxicos capaz de levar os animais a morte.

Durante 14 dias de observação a urina e as fezes dos animais em observação estavam normais. Em todos os grupos os órgãos macroscopicamente estavam em condições normais comparando com o grupo controle **Basal**, avaliando a cor e aparência.

Tabela 13 – Avaliação comportamental do extrato bruto dos rizomas de ZZ via oral.

Grupo	Dose (mg/mL)	Via	Parâmetros observados
Basal	-	Oral	Não apresentou efeitos gerais e não houve mortalidade durante 14 dias.
EBZZ2	10	Oral	Baixa motilidade, piolereção, lamber as patas, coçar focinho, tremores finos, contorção abdominal leve, não apresentou morte durante 14 dias.
EBZZ3	100	Oral	Baixa motilidade, lamber as patas, coçar focinho, não apresentou morte durante 14 dias.
EBZZ4	1000	Oral	Baixa motilidade, Alta frequência cardíaca, coçar focinho, não apresentou morte durante 14 dias.
EBZZ5	2000	Oral	Alta frequência cardíaca, piolereção, coçar focinho, lamber as patas, não apresentou morte durante 14 dias.
EBZZ6	3500	Oral	Alta frequência cardíaca, piolereção, coçar focinho, não apresentou morte durante 14 dias.
EBZZ7	5000	Oral	Alta frequência cardíaca, piolereção, coçar focinho, não apresentou morte durante 14 dias.

Na **Tabela 14** são apresentados os parâmetros observados do experimento com o extrato hidroalcoólico durante o teste do bastão e campo aberto. Os animais não tiveram o aumento de defecação no campo aberto

Nos grupos de **EHZZ2**, **EHZZ3** e **EHZZ4** não houve diminuição da motilidade, porém houve um aumento da frequência respiratória em exceção o grupo **EHZZ3** que receberam a dose de 100 mg/kg . No grupo de **EHZZ3**, **EHZZ4** e **EHZZ5** produziu efeito de substância depressora do sistema nervoso central (SNC) tais como: dispneia, após aproximadamente 5 minutos esses efeitos foram cessados.

Na observação durante 14 dias não apresentou nenhuma mortalidade, na dissecação em todos os grupos os órgãos apresentavam em condições normais em exceção o grupo **EHZZ5** dose de 2000 mg/kg que apresentava o fígado com fissuras. Não foi possível fazer a

DL50, em ambos os testes com os extratos, pois não houve mortalidade dos animais em nenhuma dose testada.

Tabela 14- Avaliação comportamental do extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ via oral.

Grupo	Doses mg/mL	Via	Parâmetros observados
Basal	-	Oral	Não apresentou efeitos gerais e não houve mortalidade durante 14 dias.
EHZZ2	10	Oral	Piloereção, não apresentou morte durante 14 dias.
EHZZ3	100	Oral	Alta frequência respiratória, Piloereção e catatonia, não apresentou morte durante 14 dias.
EHZZ4	1000	Oral	Alta frequência respiratória, Piloereção, Tremores finos e Dispneia, não apresentou morte durante 14 dias.
EHZZ5	2000	Oral	Baixa motilidade, Alta frequência respiratória, piloereção, não apresentou morte durante 14 dias.
EHZZ6	3500	Oral	Baixa motilidade, Tremores finos não apresentou morte durante 14 dias.
EHZZ7	5000	Oral	Baixa Motilidade, Tremores finos, não apresentou morte durante 14 dias.

Em estudos por Chang et al. (2012) com o extrato etanólico de *Zingiber zerumbet*, não houve nenhuma mortalidade durante a observação realizada em 14 dias em ratos, na necrópsia não tiveram evidências de substância relacionada com a toxicidade. Os resultados indicaram que a dose de 15kg^{-1} do extrato etanólico de *Zingiber zerumbet* não produziu nenhuma toxicidade ou morte. Comparando com os nossos estudos com EBZZ e EHZZ, também não houve nenhuma mortalidade durante os 14 dias, conforme os dados apresentados nas **tabelas 13 e 14**.

5.3.2.1 Teste do Bastão

Conforme a tabela **15** e **16** apresentam os resultados do extrato bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* para o teste do bastão. De acordo com os resultados não houve nenhuma alteração no comportamento motor dos animais no bastão de vidro sendo avaliados antes e depois da administração oral de EBZZ e EHZZ, sendo comparadas com o grupo basal (controle).

Tabela 15 – Teste do Bastão tempo dos animais sobre o bastão antes e após o tratamento com o extrato bruto de ZZ.

Grupo	Doses mg/mL	Tempo no bastão* Inicial (Não tratados)	Tempo no bastão* Final (Tratados)
Basal	-	2±1,2	3±1,6
EBZZ2	10	1±1,15	6±3,5
EBZZ3	100	3±3,2	2±1,15
EBZZ4	1000	2±3,2	5±3,4
EBZZ5	2000	10±2,6	3±0,7
EBZZ6	3500	8±2,8	28±2,1
EBZZ7	5000	6± 4,2	4±1,4

*Dados expressos em Média± Desvio Padrão. Tempo em (s)

Tabela 16 – Teste do Bastão tempo dos animais sobre o bastão antes e após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de ZZ.

Grupo	Doses mg/mL	Tempo -bastão* Inicial (Não tratados)	Tempo -bastão* Final (Tratados)
Basal	-	2±1,2	3±1,6
EHZZ2	10	3±0,5	3±2,5
EHZZ3	100	3±1,6	4±1,8
EHZZ4	1000	3±1,8	2±1,1
EHZZ5	2000	1±0,5	4±1,6
EHZZ6	3500	2±1,5	3±0,5
EHZZ7	5000	3±1,5	3±1,8

*Dados expressos em Média±Desvio Padrão. Tempo em (s)

Em estudos similares por Pinheiro (2009) utilizou a Zerumbona isolada dos óleos essenciais e os extratos Diclorometano (DCM) e Metanólico (MeOH) de *Z. zerumbet*, avaliando o teste de toxicidade aguda em camundongos observação por 14 dias, os animais também realizaram o teste de Tônus muscular (Teste do Bastão) e atividade exploratória, receberam doses administração de via oral de 500, 1000, 2000, 2500 e 5000, produziram progressivamente, quietação, sonolência e diminuição da motilidade em todas as doses, todos esses efeitos foram de intensidade proporcionais as doses mais elevadas, esses efeitos foram cessados em minutos, e não houve mortalidade durante 14 dias.

Já em nossos estudos com EBZZ e EHHZZ os resultados foram similares à Pinheiro (2009), assim como os nossos estudos não produziram nenhuma toxicidade ou mortalidade em camundongos durante 14 dias, tiveram o efeito de dose dependente (100, 1000 e 2000 mg/kg) de EHZZ também inicialmente causaram efeito depressor do SNC, após

aproximadamente 5 minutos foi cessado. Os efeitos de toxicidade em nossos estudos não foram proporcionais às doses mais elevadas.

5.3.3 Toxicidade Subcrônica

Os sinais de intoxicação sistêmica são avaliados a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, na redução no consumo de água e ração. Alterações comportamentais, apatia, e outros que podem sinalizar, por exemplo, injúria hepática (RAUBERT et al., 2006).

Os resultados do efeito da administração oral por gavagem do EBZZ nas concentrações testadas (1000, 2000 e 3000 mg/kg) em ratos machos e fêmeas wistar adultos, mostraram que por 30 dias, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos (**Tabela 17**).

Tabela 17- Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato bruto de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos Wistar fêmeas e machos.

Semana (S) de Tratamento	Fêmeas EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Ganho de Peso em (g)				
S1	25±3,00	39±4,24	35±4,58	32,5±0,70
S2	23±2,51	27±4,58	27±1,41	15±4,24
S3	24±4,24	12,5±0,70	9±5,68	18,5±4,94
S4	15±5,50	33,5±0,70	15±2,64	14,5±4,94
	Machos EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Ganho de Peso em (g)				
S1	40±3,21	37,5±2,12	44±1,41	52,5±3,53
S2	55,5±0,70	55,5±3,53	68±4,35	68,5±4,94
S3	66±4,04	47±3,46	61±3,78	51±4,24
S4	33±2,64	39,5±0,70	30±4,58	47±4,24

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05)

O efeito da administração oral por 30 dias de EHZZ estão na **tabela 18**, de acordo com as doses testadas (1000, 2000, 3000 mg/kg) avaliação pode ser observado que não houve alteração significativa do ganho de massa corporal.

Tabela 18- Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet* *L. Smith* em ratos Wistar fêmeas e machos.

Semana (S) de Tratamento	Fêmeas EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Peso em (g)				
S1	39±4,61	34±4,93	42±4,61	40±4,61
S2	23±2,51	31,5±3,53	29,5±0,70	25±1,41
S3	24±4,24	19±1,41	18±4,04	20±4,72
S4	12,5±3,53	19±5,65	20±4,58	15±4,93
	Machos EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Peso em (g)				
S1	40±3,21	43±4,04	43±4,61	38±3,51
S2	55,5±0,70	63±1,00	61±2,51	66±1,41
S3	69,5±4,94	80,5±3,53	70±2,08	57±4,24
S4	33±2,64	50±3,46	39,5±2,08	28,5±2,12

Ratos Wistar (n=6) administração EHZZ por gavagem (*v.o.*) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $p<0.05$).

De acordo com a **tabela 19 e 20**, pode ser observado o efeito da administração oral de EBZZ e EHZZ nas concentrações de 100, 2000 e 3000 mg/kg em ratos machos e fêmeas em 24 horas na gaiola metabólica, verifica-se que não houve alterações significativas no consumo de água e ração em comparação com o controle. Em relação ao volume da urina e fezes também não houve diferença significativa.

Tabela 19- Efeito da Administração oral do Extrato bruto de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos Wistar fêmeas e machos, consumo de água, ração, volume de urina e fezes em 24 horas na gaiola metabólica.

24 horas	Fêmeas EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Consumo de água (mL)	22,5±1,25	22,2±2,34	26±4,72	41±4,94
Consumo de ração (g)	20,7±4,78	19,4±2,29	25±4,85	16,1±4,02
Fezes (g)	11,1±2,65	7,6±4,90	8,8±3,30	11,3±2,48
Urina (mL)	14,6±1,62	13,2±1,25	18,4±4,96	20,5±2,23
	Machos EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Consumo de água (mL)	21,7±2,37	20,6±1,70	24,9±2,82	15,55±3,04
Consumo de ração (g)	21,1±2,05	23,4±1,35	20,1±1,76	28,5±4,84
Fezes (g)	9,8±0,90	11,2±1,84	7,3±1,87	9,4±3,76
Urina (mL)	13,5±1,30	14,3±0,40	15,8±4,70	19,1±4,94

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) 24 horas em gaiola metabólica. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

Tabela 20- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos Wistar fêmeas e machos, consumo de água, ração, volume de urina e fezes em 24 horas na gaiola metabólica.

24 horas	Fêmeas EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Consumo de água (mL)	22,5±1,25	24,3±3,50	27,2±1,21	23,1±0,95
Consumo de ração (g)	20,7±4,78	21,1±3,80	16,6±1,73	23,9±4,47
Fezes (g)	11,1±2,65	11,1±3,52	8,4±2,96	11,8±3,95
Urina (mL)	14,6±1,62	18,7±5,64	21,4±1,05	14,2±1,82
	Machos EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Consumo de água (mL)	21,7±2,37	31±4,87	37,8±4,35	21±5,65
Consumo de ração (g)	21,1±2,05	21,2±2,64	22,3±1,80	29±4,82
Fezes (g)	9,8±0,90	10±3,46	12±2,35	12,6±1,68
Urina (mL)	13,5±1,30	21,8±2,62	26±4,98	17,6±0,55

Ratos Wistar (n=6) administração EHZZ por gavagem (v.o.) 24 horas em gaiola metabólica. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

5.3.4 Análises hematológicas

O tratamento de EBZZ e EHZZ por 30 dias consecutivos com EBZZ, de forma geral não induziu modificações no perfil hematológico dos ratos fêmeas e machos (**Tabela 21 e 22**, respectivamente), em exceção o hematócrito (%) para a dose de 1000 mg/kg em fêmeas e machos foi estatisticamente significativo $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (veículo).

Tabela 21- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos Wistar fêmeas, parâmetros hematológicos.

Parâmetro	Fêmeas EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,07±0,10	5,11±0,15	1,38±0,54	4,12±0,17
Hemácias totais ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,16±0,22	6,36±0,51	5,23±0,33	6,24±0,33
Hemoglobina (g/dL)	13,35±0,49	14,2±0,35	12,15±0,21	14,25±0,35
Hematócrito (%)	36,4±0,63	* 40,3±0,49	32,3±0,42	37,1±0,21
V.C.M	58,1±0,21	60,2±0,28	59,3±0,42	57,2±0,35
H.C.M	21,3±0,42	21,2±0,35	22,2±0,28	21,3±0,42
C.H.C.M	37,05±0,07	35,3±0,42	37,3±0,49	37,2±0,35
R.D.W	11,4±0,56	11,05±0,07	10,25±0,35	11,05±0,07
Plaquetas totais	543±4,94	972±2,82	588±0,35	1030±0,70
Linfócitos absolutos mm^3	89,2±0,35	75,2±0,35	76,2±0,35	73±4,24

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $p < 0.05$).

Tabela 22- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos Wistar Machos, parâmetros hematológicos.

Parâmetro	Machos EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,08±0,12	8,3±0,5	7,2±0,40	10,1±0,26
Hemácias totais ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,44±0,62	6,4±0,59	6,1±0,16	7,0±0,04
Hemoglobina (g/dL)	14,3±0,42	14,4±0,63	13,4±0,56	14,3±0,49
Hematócritos (%)	40,2±0,35	40,4±0,56	38,3±0,42	41,2±0,35
V.C.M	58,05±0,07	59,3±0,42	61,4±0,56	57,4±0,63
H.C.M	21,1±0,14	21,3±0,49	22,05±0,07	20,3±0,49
C.H.C.M	36,2±0,35	36,2±0,35	35,3±0,49	35,4±0,56
R.D.W	12,0±0,07	12,2±0,28	11,1±0,21	12,4±0,63
Plaquetas totais	1011±2,12	983±4,2	832±3,53	993±4,24
Linfócitos absolutos mm^3	61,2±0,35	71,5±0,70	70,2±0,35	82,2±0,35

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $p<0.05$).

De acordo com a **tabela 23 e 24**, encontram-se os resultados hematológicos da administração oral de EHZZ durante 30 dias em ratos fêmeas e machos adultos wistar, observa-se que EHZZ não induziu nenhuma modificação no perfil hematológico, em exceção no hematócrito de ratos fêmeas e machos na dose de 1000 mg/kg houve uma redução no perfil, sendo estatisticamente diferentes em comparação ao grupo controle (veículo).

Tabela 23- Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet* *L. Smith* em ratos Wistar fêmeas, parâmetros hematológicos.

Parâmetro	Fêmeas EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,07±0,10	2,15±0,21	5,09±0,13	3,02±0,02
Hemácias totais ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,16±0,22	5,07±0,10	5,49±0,69	5,31±0,43
Hemoglobina (g/dL)	13,35±0,49	10,45±0,63	13,05±0,07	11,35±0,49
Hematócritos (%)	36,4±0,63	*29,45±0,63	35,1±0,14	32,3±0,42
V.C.M	58,1±0,21	58,2±0,35	58,4±0,56	58,2±0,35
H.C.M	21,3±0,42	21,05±0,07	21,45±0,63	20,4±0,56
C.H.C.M	37,05±0,07	36,2±0,28	37,1±0,14	35,4±0,56
R.D.W	11,4±0,56	10,45±0,63	11,25±0,35	10,4±0,56
Plaquetas totais	543±4,94	773±4,24	682±3,5	693±4,94
Linfócitos absolutos mm^3	89,2±0,35	86,2±0,35	77,2±0,35	80,2±0,35

Ratos Wistar (n=6) administração EHZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $p<0.05$).

Tabela 24- Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet* L. *Smith* em ratos Wistar machos, parâmetros hematológicos.

Parâmetro	Machos EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Leucócitos ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	7,08±0,12	6,37±0,52	7,28±0,40	10,19±0,26
Hemácias totais ($10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,44±0,62	6,01±0,02	6,12±0,16	7,03±0,04
Hemoglobina (g/dL)	14,3±0,42	13,1±0,14	13,4±0,56	14,35±0,49
Hematócritos (%)	40,2±0,35	*36,35±0,49	38,3±0,42	41,25±0,35
V.C.M	58,05±0,07	60,4±0,56	61,4±0,56	57,45±0,63
H.C.M	21,1±0,14	21,4±0,56	22,05±0,07	20,35±0,49
C.H.C.M	36,2±0,35	35,45±0,63	35,35±0,49	35,4±0,56
R.D.W	12,0±0,07	11,45±0,63	11,15±0,21	12,45±0,63
Plaquetas totais	1011±2,12	801±1,41	832±3,53	993±4,24
Linfócitos absolutos mm^3	61,2±0,35	73,2±0,35	70,2±0,35	82,2±0,35

Ratos Wistar (n=6) administração EHZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, $p<0.05$).

O hematócrito é o percentual do sangue que é ocupado pelas hemácias, indica a porcentagem de glóbulos vermelhos circundantes (MIINHAVIDA, 2015). De acordo com os resultados de EHZZ pode-se constatar que houve uma redução do hematócrito em machos e fêmeas somente na dose de 1000 mg/kg, sendo que essa redução foi bem baixa, o motivo pode ter acontecido algum sangramento ou lesão interna nos animais, pode ter acontecido estresse devido ao ambiente, pois não houve alteração dos índices: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) que são importantes indicadores na determinação do tipo morfológicos de anemias.

5.3.5 Análises Bioquímicas

Os resultados das análises bioquímicas da administração oral de EBZZ em ratos adultos machos e fêmeas encontram-se na **tabela 25 e 26**. Verificou-se que os indicadores bioquímicos não apresentaram modificações, em exceção ao índice de AST, também conhecida como TGO, os resultados das doses de 1000, 2000 e 3000 mg/kg para as fêmeas e dose de 1000 e 2000 mg/kg para machos foram estatisticamente diferentes em comparação ao grupo controle (veículo).

O fígado é um órgão muito susceptível a agressões químicas que podem resultar em processos inflamatórios ou necrosantes. O grau de lesão hepática provocada por injúria (lesão) química ou biológica pode variar, podendo levar a alterações leves das enzimas hepáticas sem o desenvolvimento de sintomas clínicos, até casos mais graves de insuficiência hepática aguda ou crônica (ELY et al., 2006).

Em fase inicial, a lesão hepática pode ser detectada a partir do aumento dos níveis de enzimas hepáticas no sangue. Esse aumento pode ser devido à necrose celular ou pelo aumento da permeabilidade da membrana celular. Algumas enzimas que podem ser utilizadas como indicadores de lesão hepática são elas; ALT- alanina –amino transferase ou TGP- transaminase glutâmico-pirúvica, a AST – aspartato-aminotranferase ou TGO- transaminase glutâmico-oxaloacética; GGT - *gama*-glutamyltransferase ou GGP- *gama*-glutamylpeptidase, ALP- fosfatase alcalina (ELY et al., 2006).

A AST ou TGO é encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado, musculo esqueléticos e cardíacos, rins, pâncreas e eritrócitos (glóbulos vermelhos do sangue), qualquer um desses tecidos são danificados a AST é liberada no sangue. A ALT ou TGP é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma do fígado, o que torna o seu aumento mais específico em lesão hepática.

De acordo com os resultados de EBZZ e EHZZ, somente dois grupos de animais apresentaram alteração no índice de AST ou TGO em relação ao grupo controle veículo, seus níveis podem ter elevado devido a algum dano em algum órgão pode ter acontecido ao estresse ambiental, caso se ocorresse uma lesão hepática os níveis de TGO e TGP em conjunto estariam aumentados.

Tabela 25- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de *Z. zerumbet L. Smith* em ratos wistar fêmeas e machos, parâmetros Bioquímicos.

Parâmetro	Fêmeas EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Glicemia (mg/dL)	203,2±0,35	271,7±0,35	322,2±0,35	228,25±0,35
Colesterol total (mg/dL)	92,2±0,35	65,3±0,42	68,3±0,42	78,3±0,42
Triglicerídeos (mg/dL)	158,3±0,42	160,3±0,49	138,3±0,49	235,3±0,49
Uréia (mg/dL)	53,3±0,49	44,4±0,56	50,4±0,56	53,4±0,56
Creatinina (mg/dL)	0,73±0,04	0,74±0,06	0,94±0,06	0,83±0,04
AST (U/l)	171,4±0,56	*271,25±0,35	*111,2±0,35	*118,2±0,35
ALT (U/l)	79,2±0,35	97,3±0,42	52,3±0,42	64,3±0,42
Ácido úrico (mg/dL)	0,73±0,04	1,23±0,04	1,13±0,04	1,13±0,04
Albumina	4,13±0,04	3,14±0,05	3,64±0,05	3,44±0,05

Parâmetro	Machos EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Glicemia (mg/dL)	256,2±0,35	249,2±0,35	295,2±0,35	198,2±0,35
Colesterol total (mg/dL)	83,2±0,35	80,3±0,42	80,3±0,42	79,3±0,42
Triglicerídeos (mg/dL)	127,3±0,42	94,3±0,49	144,35±0,49	137,35±0,49
Uréia (mg/dL)	46,3±0,49	43,4±0,56	44,4±0,56	43,4±0,56
Creatinina (mg/dL)	0,84±0,05	0,95±0,07	0,94±0,06	0,94±0,06
AST (U/l)	127,2±0,35	*96,4±0,56	*215,2±0,35	132,2±0,35
ALT (U/l)	64,3±0,42	54,45±0,63	94,4±0,56	63,3±0,42
Ácido úrico (mg/dL)	0,83±0,04	0,83±0,04	1,08±0,12	1,73±0,04
Albumina	2,94±0,05	2,93±0,04	2,94±0,06	3,14±0,05

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

Tabela 26- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet* L. Smith em ratos Wistar fêmeas e machos, parâmetros Bioquímicos.

Parâmetro	Fêmeas EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Glicemia (mg/dL)	203,2±0,35	261,2±0,35	204,2±0,35	268,2±0,35
Colesterol total (mg/dL)	92,2±0,35	101,3±0,42	95,3±0,42	102,3±0,42
Triglicerídeos (mg/dL)	158,3±0,42	*230,3±0,49	118,3±0,49	*248,3±0,42
Uréia (mg/dL)	53,3±0,49	41,4±0,56	52,4±0,56	49,3±0,49
Creatinina (mg/dL)	0,73±0,04	0,84±0,06	0,74±0,06	0,74±0,05
AST (U/l)	171,4±0,56	143,2±0,35	169,2±0,35	125,2±0,35
ALT (U/l)	79,2±0,35	72,3±0,42	77,3±0,42	61,3±0,42
Ácido úrico (mg/dL)	0,73±0,04	0,83±0,04	0,83±0,04	0,93±0,04
Albumina	4,13±0,04	3,94±0,05	3,54±0,05	3,84±0,05

Parâmetro	Machos EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Glicemia (mg/dL)	256,2±0,35	283,2±0,35	237,2±0,35	325,2±0,35
Colesterol total (mg/dL)	83,2±0,35	97,3±0,42	91,3±0,42	80,3±0,42
Triglicerídeos (mg/dL)	127,3±0,42	81,35±0,49	111,3±0,49	96,35±0,49
Uréia (mg/dL)	46,3±0,49	42,4±0,56	51,4±0,56	46,4±0,56
Creatinina (mg/dL)	0,84±0,05	0,92±0,03	0,84±0,06	0,94±0,06
AST (U/l)	127,2±0,35	*228,3±0,42	*179,2±0,35	132,3±0,42
ALT (U/l)	64,3±0,42	86,35±0,49	73,3±0,42	49,25±0,35
Ácido úrico (mg/dL)	0,83±0,04	0,84±0,05	1,73±0,04	0,93±0,04
Albumina	2,94±0,05	3,24±0,06	2,84±0,06	2,93±0,04

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

5.3.6 Análises Peso dos órgãos

Em relação ao peso dos órgãos dos animais do tratamento com EBZZ, de acordo com a **tabela 27**, não houve alteração no peso em comparação com o grupo controle em ratos fêmeas e machos, em exceção o grupo dos machos para a dose de 1000 mg/kg que foi estatisticamente diferente do grupo controle (veículo).

Tabela 27- Efeito da Administração oral Sub-crônica do Extrato bruto de *Z. zerumbet* L. Smith em ratos Wistar fêmeas e machos, peso dos órgãos animais.

Órgão	Fêmeas EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Fígado	12,47±0,99	13,40±1,97	13,93±0,34	14,43±0,04
Coração	1,07±0,03	1,25±0,14	0,96±0,07	0,83±0,04
Pulmão	1,52±0,31	2,33±0,62	1,92±0,14	2,28±0,40
Rins	3±0,60	2,72±0,23	2,67±0,18	3,16±0,22
Estômago	1,95±0,37	2,25±0,05	2,27±0,01	2,01±0,01
Órgão	Machos EBZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Fígado	25,89±0,97	* 13,43±0,04	22,25±0,35	21,055±2,76
Coração	1,58±0,14	1,33±0,04	1,45±0,07	1,55±0,07
Pulmão	3,14±0,82	1,35±0,49	2,20±0,28	3,77±0,04
Rins	4,88±0,62	3,06±0,08	4,00±0,00	4,62±0,59
Estômago	2,64±0,53	3,23±0,33	4,22±0,31	2,58±0,50

Ratos Wistar (n=6) administração EAZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão. *Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

Conforme a **tabela 28**, para o extrato hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* também não houve alteração nos pesos dos órgãos dos animais fêmeas e machos em comparação com o grupo controle (veículo).

Tabela 28- Efeito da Administração oral Subcrônica do Extrato Hidroalcoólico de *Z. zerumbet* *L. Smith* em ratos Wistar fêmeas e machos, peso dos órgãos animais.

Órgão	Fêmeas EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Fígado	12,47±0,99	13,94±0,05	11,76±0,19	12,57±0,85
Coração	1,07±0,03	1,01±0,02	1,22±0,24	1,03±0,01
Pulmão	1,52±0,31	3,04±0,05	2,02±0,62	1,99±0,58
Rins	3±0,60	2,32±0,45	2,55±0,13	2,84±0,61
Estômago	1,95±0,37	1,41±0,58	2,24±0,48	1,85±0,66

Órgão	Machos EHZZ			
	Veículo	1000	2000	3000
Fígado	25,89±0,97	23,96±0,10	21,17±1,02	22,43±1,18
Coração	1,58±0,14	1,52±0,24	1,59±0,31	1,46±0,00
Pulmão	3,14±0,82	4,24±0,96	3,41±0,31	3,86±0,78
Rins	4,88±0,62	4,33±0,18	4,24±0,55	3,93±0,08
Estômago	2,64±0,53	3,16±0,57	2,83±0,00	2,46±0,65

Ratos Wistar (n=6) administração EHZZ por gavagem (v.o.) durante 4 semanas. Dados expressos em Média±Desvio Padrão.*Estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0.05).

Os resultados da presente tese corroboraram com Chang et al. (2012) que utilizou o Extrato etanólico de *Zingiber zerumbet* avaliando a toxicidade sub aguada em 28 dias (4 semanas) em ratos wistar adultos fêmeas e machos com doses diárias do extrato 1000, 2000 e 3000 mg/kg, também não houve nenhum sinal tóxico e nenhuma mortalidade.

Pinheiro (2009) avaliou por 30 dias a zerumbona substância obtida dos óleos essencial de *Zingiber zerumbet*, nas doses de 500 e 1000 mg/kg, em seus resultados não houve alteração significativa dos níveis de hematócritos e bioquímicos principalmente das transaminases (TGO e TGP) e os níveis da massa corporal durante o período de tratamento dos animais. Os dados indicam que o composto não possui efeitos tóxicos por via oral em nível de órgãos como coração, fígado e outros em dose até 1000 mg/kg.

Em nossos estudos não houve também nenhum sinal tóxico como pioleração, atividade locomotora e diarreia ou mortes foram apresentadas durante as quatro semanas de tratamento via oral com EBZZ e EHZZ nas doses de 1000, 2000, 3000 mg/kg. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o peso inicial e peso final. Também não houve nenhum efeito tóxico observado em relação ao consumo de água e ração, volume de urina e fezes, indicando que os extratos bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* não são tóxicos.

5.3.7 Análises Macroscópicas dos órgãos

Exame macroscópico dos animais tratados com EBZZ e EHZZ. Demonstraram não haver variação dos órgãos quando comparados ao grupo controle nas variáveis coloração e textura. Nas autópsias dos animais em experimentação não foi observado lesão aparente no fígado, rim, coração, pulmão e estômago.

5.3.8 Análises Histopatológicas

As estruturas histológicas dos órgãos representados através das **Figuras 19 a 26** mostram diferenças imperceptíveis entre os grupos controle e teste. O exame microscópico revelou que, todos os órgãos dos extratos EBZZ ou EHZZ de ratos tratados não mostraram qualquer alteração na estrutura celular ou quaisquer efeitos desfavoráveis quando visto sob o microscópio de luz usando a capacidade de ampliação múltipla. As estruturas de coordenação de células em órgãos tratados com os extratos são mais ou menos semelhantes quando comparados com os órgãos do controle.

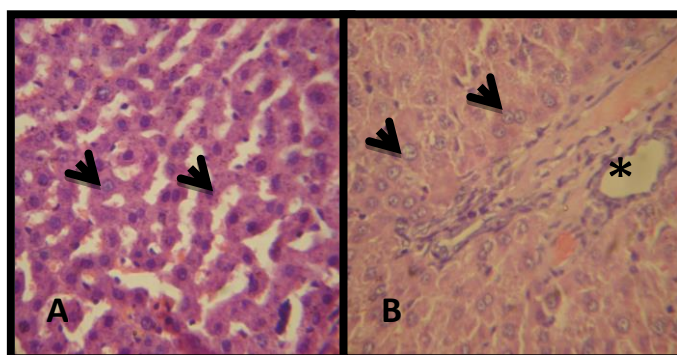


Figura 19- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetidos ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 1000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Cordões de hepatócitos preservados (ponta da seta) HE, 96x. B. Hepatócitos (ponta da seta) e tríade portal (*) HE, 112x.

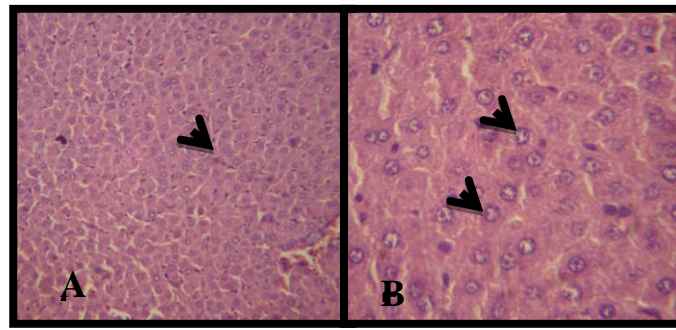


Figura 20- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 2000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Cordões de hepatócitos preservados (ponta da seta) HE, 80x. B. Em detalhe os hepatócitos (ponta da seta) com Núcleo e nucléolos bem evidentes. HE, 160x .

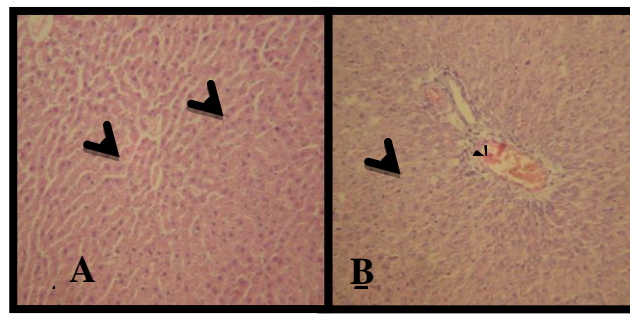


Figura 21- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EBZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Cordões de hepatócitos preservados (ponta da seta) HE, 80x. B. Hepatócitos (ponta da seta) e tríade portal (*) HE, 80x .

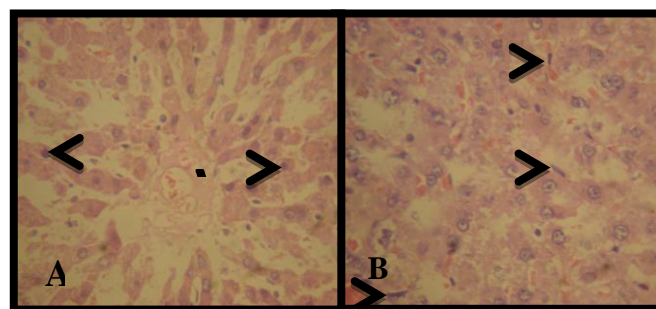


Figura 22- A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 1000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Pequenas alterações na arquitetura dos cordões de hepatócitos e presença de alguns núcleos apoptóticos (ponta da seta). Ao centro veia centro lobular (V). HE, 96x. B. Células de Kuppfer entre os hepatócitos (ponta da seta). HE, 112x .

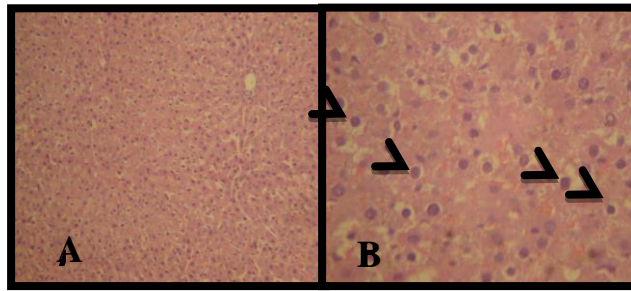


Figura 23 - A e B: Fígado de Rato wistar macho, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 2000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Parênquima hepático com muitas figuras de apoptose mas sem infiltrado inflamatório. HE, 66x. B. Em detalhe, núcleos apoptóticos evidentes (ponta da seta) HE, 112x. * Não foi possível fazer o estudo histopatológico do fígado do Rato wistar fêmea, devido o material não estar em boas condições.

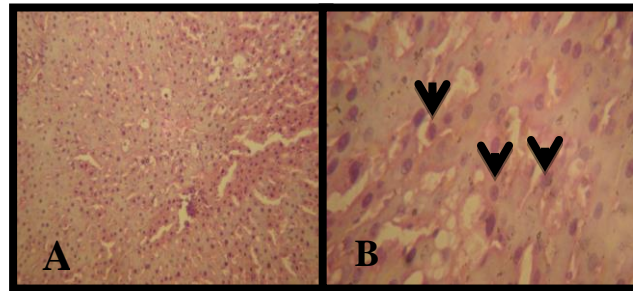


Figura 24- Fígado de Rato wistar macho, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A. Perda da arquitetura do parênquima hepático, necrose. HE, 80x. B. Em evidência, hepatócitos apoptóticos (ponta da seta) HE, 160x .

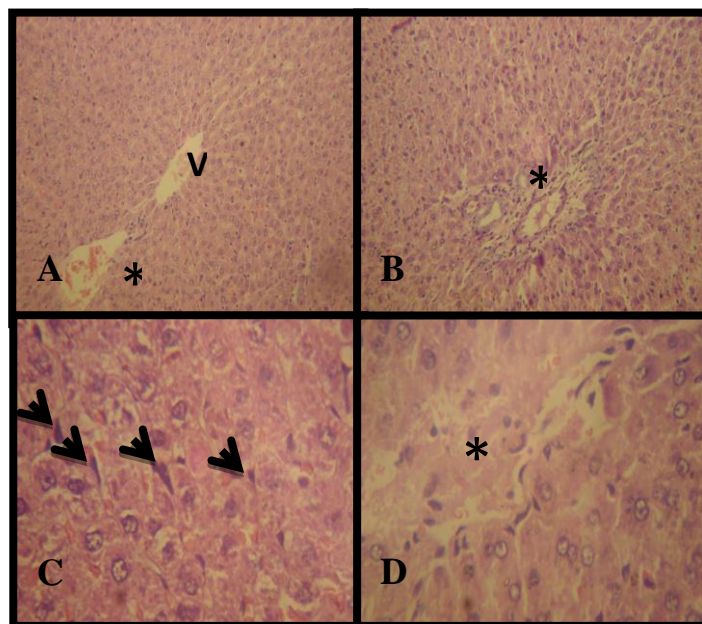


Figura 25- Fígado de Rato wistar fêmea, exposição a que foi submetido ao EHZZ diariamente por 30 dias na dose de 3000 mg/kg. Fotomicrografia evidenciando em A e B. Cordões de

hepatócitos preservados. Tríade Portal (*) e veia centro lobular (V). Em B é possível notar aumento de células kupffer e apoptose. HE, 80x. C e D. Em detalhe, células de Kupffer (ponta da seta) e dano parênquima hepático com (**). HE, 160x.

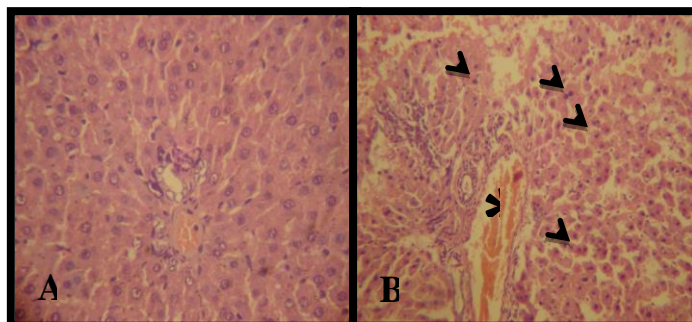


Figura 26- Fígado de A: Fígado de (Rato wistar fêmea) e B: Fígado de (Rato wistar macho), exposição a que foram tratados apenas com veículo (grupo controle). Fotomicrografia evidenciando em A. Cordões de hepatócitos preservados e tríade portal (*) HE, 96x. B. Hepatócitos em degeneração, núcleos apoptóticos (ponta da seta) e tríade portal (*) HE, 112x.

5.4 Atividade Anti-úlceras

De acordo com os resultados apresentados na **tabela 29**, verifica-se o efeito da Ranitidina e do extrato bruto (EBZZ) em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. A Ranitidina apresentou 86.9% de percentual de inibição das lesões, o EBZZ teve destaque no grupo **EBZZU7** (5000 mg/kg) que apresentou um percentual de inibição de 96.5% das lesões ocasionadas pelo etanol, o percentual foi superior ao resultado da Ranitidina (86.9%).

Tabela 29- Efeito do Extrato bruto do gengibre amargo e de Ranitidina em lesões gástricas induzidos por etanol em camundongos.

Tratamento (v.o.)	N	Dose (mg/kg)	Índice de lesão Média ± DP	% de inibição
Basal	5	-	11.5± 2.2	-
Ranitidina	5	50	1.5 ± 2.1	86.9
EBZZU3	5	100	10.5±2,08	8,6
EBZZU4	5	500	2.0± 2.0*	82.6
EBZZU5	5	1000	9.5± 1.41*	77.3
EBZZU6	5	2000	5.0±2,82	17,3
EBZZU7	5	5000	1.0± 0.28*	96.53

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=5. *Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

O grupo **EBZZU4** (500 mg/kg) obteve 82.6% de percentual de inibição, porém, no grupo **EBZZU6** (1000 mg/kg) houve uma redução da porcentagem de inibição (77.3%), como mostrado na **Figura 27**.

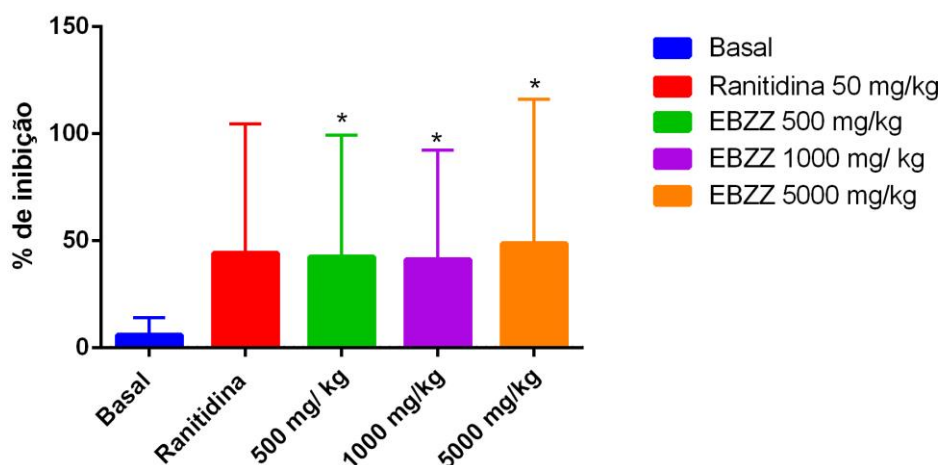


Figura 27 – Atividade antiúlcera, percentagem de inibição utilizando como teste o extrato bruto (EBZZ). * Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$).

Para verificar os efeitos do Extrato bruto de *Z.zerumbet* (EBZZ) em lesões gástricas induzidas por etanol, conforme a metodologia da atividade antiúlcera da presente tese, os grupos **EBZZU3** e **EBZZU5** nas doses de 100 e 1000 mg/kg, respectivamente, foram testados porém os resultados foram descritos nas tabelas e não nos gráficos para melhor análise estatística.

A **tabela 30** mostra os efeitos do extrato hidroalcoólico em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os resultados foram consideravelmente significativos, a Ranitidina e o extrato hidroalcoólico (EHZZ) nas doses de 100, 500, 1000 e 2000 (mg/kg) o percentual de inibição da formação de úlcera foram: 80%, 60%, 60%, 40% e 40%. Observa-se que os grupos tratados com a Ranitidina e EHZZ tiveram menos lesões gástricas na mucosa gástrica em comparação com o controle (**Basal**) que não apresentou nem um percentual de inibição.

Tabela 30. Efeito do Extrato hidroalcoólico do gengibre amargo e de Ranitidina em lesões gástricas induzidos por etanol em camundongos.

Tratamento (v.o.)	N	Dose (mg/kg)	Índice de lesão Média ± DP	% de inibição
Basal	5	-	5.0±0.57	--
Ranitidina	5	50	1.0±0.28	80
EHZZU3	5	100	2.0±0.28*	60
EHZZU4	5	500	5.0± 0.57*	60
EHZZU5	5	1000	3.0± 0.28*	40
EHZZU6	5	2000	3.0± 0.28*	40
EHZZU7	5	5000	4.0±0.28	20

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=5. *Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor $p < 0.05$; ANOVA.

A **Figura 28** apresenta a porcentagem de inibição do EHZZ em lesões gástricas comparando com o controle (basal) e a Ranitidina, verifica-se que o efeito de EHZZ reduz a partir de que se aumenta a dose. Os resultados do grupo **EHZZU7** na dose de 5000 mg/kg não foi descrito no gráfico, apenas na tabela para melhor apresentação dos resultados.

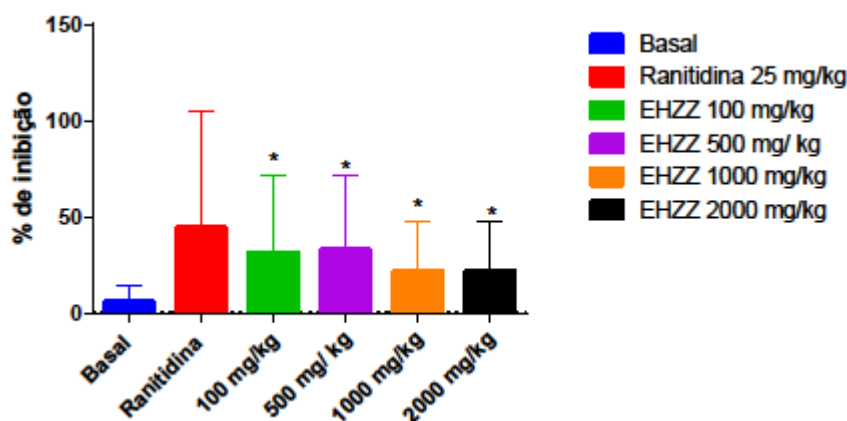


Figura 28 – Atividade anti-úlceras, resultado da porcentagem de inibição utilizando como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ). * Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$).

Em estudos similares por Sidahmed et al. 2015, utilizando o Omeprazol (20 mg/kg) e a zerumbona (5 e 10 mg/kg) isolada dos rizomas de *Z. zerumbet* para verificar o efeito em lesões gástricas induzida por etanol, os resultados foram estatisticamente significativo (p

<0,05), comparado com os grupos não tratados. A zerumbona na dose de 10 mg/kg obteve um percentual de inibição de 88.75% e o Omeprazol (20 mg/kg) com 76.77%.

Os resultados da atividade antiúlcerosa da presente tese podem indicar que o Extrato aquoso (EAZZ) e Hidroalcoólico (EHZZ) de *Z. zerumbet* tiveram um potente efeito inibitório contra lesões gástricas. Estes resultados podem ser comparados com trabalhos científicos relatados com a Zerumbona, substância isolada dos rizomas de *Z. zerumbet*, substância considerada uma droga natural antiúlcerosa que pode estar presente nos extratos (EAZZ e EHZZ) (AL-AMIN; SULTANA; HOSSAIN, 2012; SIDAHMED et al., 2015).

5.5 Atividade Antinociceptiva

5.5.1 Teste de contorção abdominal por ácido acético.

As contorções abdominais em camundongos caracterizam-se por contração e rotação do abdome, seguida pela extensão de um ou ambas as patas traseiras. Esta resposta motora decorre da aplicação de um estímulo nociceptivo por via intraperitoneal. O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários dos eventos neurotransmissores (KOSTER et al., 1959; LAPA et al., 2005) e neuromoduladores que determinam a nocicepção.

Os resultados obtidos no teste de contorção abdominal por ácido acético utilizando como tratamento o padrão (Ketamina®) os extratos bruto (EBZZ) e hidroalcoólico (EHZZ) nas doses de 250 e 500 mg/Kg são apresentados na **Tabela 31** e **Tabela 32**. O extrato bruto e hidroalcoólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* exibiram uma inibição dependente da dose das contorções abdominais induzidos pela injeção do ácido acético (0,01 mL/100g) em camundongos. As doses apresentaram bons percentuais de inibição de **EBZZCA3** e **EBZZCA4** (45,5% e 90,9%); **EHZZCA3** e **EHZZCA4** foram 72,7% e 72,7%.

Os resultados na **Tabela 32** abaixo, mostram o extrato aquoso administrado via oral causando inibição, principalmente, **EBZZCA4** (500 mg/kg), apresentando um percentual de 90,9%, um bom resultado comparado com o padrão Ketamina **EBZZCA2**.

Tabela 31 - Teste de contorção abdominal por ácido acético utilizando como teste o extrato bruto (EBZZ) dos rizomas de ZZ.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de contorções	% de inibição
Basal	-	11 ± 4.7	-
Ketamina	25	3 ± 1.5	72.7
EBZZCA3	250	6 ± 3.7*	45.5
EBZZCA4	500	1 ± 0.5*	90.9
EBZZCA5	1000	5 ± 0.9	54.5

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. *Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

Já com o extrato hidroalcoólico observa-se na **Tabela 33**, a dose que teve maior percentual foi o do grupo **EHZZCA3** de 250 mg/kg (72.4% de inibição) um resultado significativo comparado com o padrão **EHZZCA2** tiveram o mesmo percentual.

Tabela 32- Teste de contorção abdominal por ácido acético utilizando como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ) dos rizomas de ZZ.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de contorções	% de inibição
Basal	-	11 ± 4.7	-
Ketamina	25	3 ± 1.5	72.7
EHZZCA3	250	3 ± 1.5*	72.7
EHZZCA4	500	3 ± 1.5*	72.7
EHZZCA5	1000	5 ± 1.6	54.5

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. *Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

Na **Figura 29** e **Figura 30**, demonstram graficamente a Ketamina, EBZZ e EHZZ apresentando inibição das contorções induzidas por ácido acético durante os 60 minutos de experimento, esses resultados comparado com o controle basal (salina) foram estatisticamente significativos (p<0,05), em destaque o EBZZ na dose de 500 mg/kg que teve maior percentual de inibição (90.9%) das contorções, já o EHZZ na dose de 250 mg/kg apresentou o percentual de 70.2% de inibição mantendo estável com o mesmo percentual na dose de 500 mg/kg.

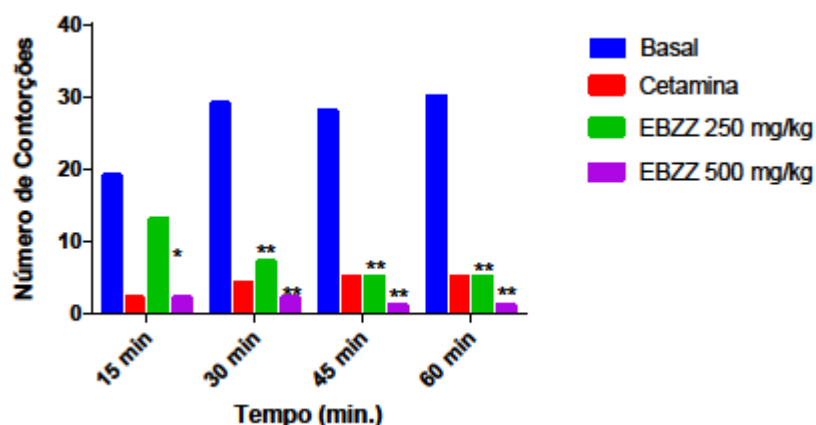


Figura 29 – Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético utilizando como padrão a Ketamina e como teste o extrato bruto (EBZZ). O número de contorções versus o tempo em min. *Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$). **Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina.

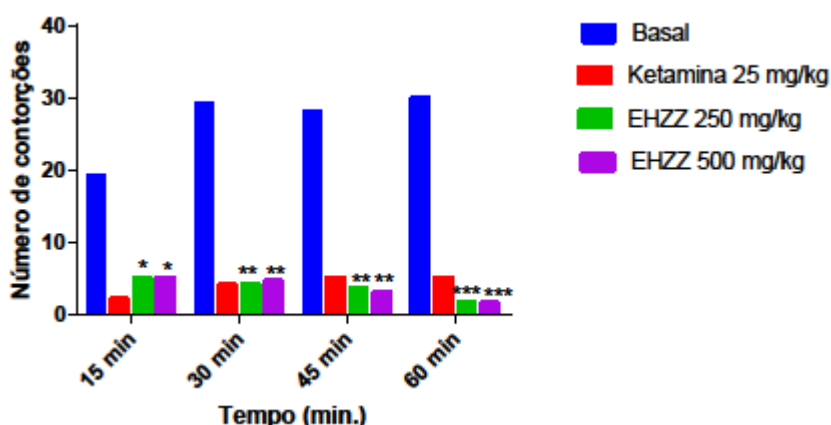


Figura 30 – Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético utilizando como padrão a Ketamina e como teste o extrato hidroalcoólico (EHZZ). O número de contorções versus o tempo em min. *Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$). **Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina.

Para avaliar os efeitos da administração do Extrato bruto e hidroalcoólico de *Z.zerumbet* (EBZZ e EHZZ), conforme a metodologia da atividade antinociceptiva de contorção abdominal induzida por ácido acético da presente tese, o **grupo EBZZCA5 e EHZZCA5** (1000 mg/kg) foram testados porém os resultados foram descritos apenas nas tabelas, e não nos gráficos para melhor descrição estatística.

Em estudos desenvolvidos por Khalid et al. (2011), também utilizou o teste de contorção abdominal induzido por ácido acético utilizando como tratamento via oral a Indometacina como padrão e o óleo essencial de *Zingiber zerumbet* como teste nas doses de 200 e 300 mg/kg. Conseguiram obter um percentual de inibição das contorções de 54.69% e 75.68%, com a DL50% de 118 mg/kg (102.5-137 mg/kg).

Em estudos similares por Somchit et al. (2012) avaliando o perfil antinociceptivo dos extratos aquoso e etanólico de *Zingiber zerumbet* utilizando o mesmo modelo de contorções abdominais por ácido acético 0,6% em ratos utilizando a morfina (2 e 8 mg / kg) como padrão. No entanto, apenas o extrato etanólico de *Z. zerumbet* foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$) na redução do número de contorções em uma dose-dependente. A atividade foi observada com a dose mais baixa (10mg/kg) 20 min após a administração do agente fisiológico em ratos e durou até ao final da experiência (40 min).

Os resultados da avaliação do teste de contorção abdominal induzida por ácido acético da presente tese pode-se constar que EBZZ e EHZZ nas doses de 250 e 500 mg/kg produziram um efeito anti-nociceptivo (analgésico) significativo, causando inibição dependente das doses das contorções abdominais.

O modelo de contorção abdominal por ácido acético foi descrito inicialmente por Dubuissun e Dennis (1977) em gatos e ratos, vêm desde então sendo sistematicamente empregado para o estudo de drogas analgésicas. É um modelo relativamente simples e com pouca especificidade, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias drogas analgésicas e anti-inflamatórias não esteroidais (BLUMBERG et al., 1965).

O ácido acético atua diretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação de dor, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas, causando algia pela liberação dessas substâncias endógenas na excitação dos nociceptores periféricos (WHITTLE, 1963; COLLIER et al., 1968).

5.5.2 Teste da Placa Quente.

A **Tabela 33** mostra a inibição de EBZZ, nos efeitos das respostas ao estímulo termoceptivo no modelo teste de placa quente (PQ) por via oral (v.o), utilizado para medir a resposta à latência que de acordo com o método descrito por (EDDY e LEIMBACK, 1953). Os camundongos (n=5) foram tratados com salina, Ketamina® (25 mg/kg) e os extratos EBZZ e EHZZ nas doses de 30, 100 e 250 mg/kg. A medição do tempo foi interrompida quando o animal apresentou o comportamento instintivo de saltar sobre a placa, e logo em

seguida lamber as patas ou com 55 segundos para evitar injúria tecidual. Foi realizado uma observação basal após 15, 60, 90 e 180 minutos de tratamento.

Nos resultados obtidos no teste da placa quente da substância, os grupos **EBZZPQ3**, **EBZZPQ4** e **EBZZPQ5**, verificou-se o aumento significativamente o tempo de latência dos camundongos em relação ao **basal** e padrão **Ketamina**. O EBZZ propiciou um efeito significativo do tempo de latência, ou seja, permanência na placa.

Tabela 33- Teste da placa quente utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose mg/kg	Tempo de reação (s)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Basal	-	3.2 ± 1.2	6.8 ± 0.4	8.7 ± 1.7	8.2 ± 2.1
Ketamina	25	11.6 ± 0.7	14.7 ± 1.4	16.5 ± 0.14	16.8 ± 2.9
EBZZPQ3	30	13.6 ± 4.5	13.4 ± 0.4	14.4 ± 1.3	16.5 ± 1.2
EBZZPQ4	100	15.0 ± 1.3	21.2 ± 3.3	21.5 ± 0.9	21.7 ± 3.5
EBZZPQ5	250	18.7 ± 4.1	21.5 ± 4.8	38.9 ± 1.8	45.9 ± 1.4
EBZZPQ6	500	13.6 ± 4.3	13.0 ± 3.1	10.9 ± 3.7	18.8 ± 4.1
EBZZPQ7	1500	12.4 ± 2.5	18.9 ± 3.9	19.3 ± 3.6	22.8 ± 1.7

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. *Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

A **figura 31** destaca a dose de 250 mg/kg (**EBZZPQ5**) que teve um aumento estatisticamente significativo no tempo de 45 e 60 min comparado com o controle **basal** e **Ketamina**.

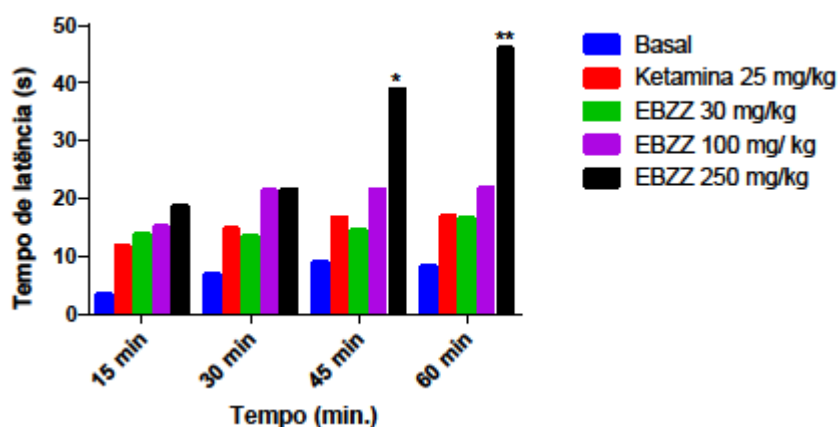


Figura 31 – Teste da placa quente utilizando como padrão a Ketamina e o extrato bruto (EBZZ) como teste. O tempo de permanência do animal na placa versus o tempo em min.

*Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$). **Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina.

Na **tabela 34**, apresenta os resultados no teste da placa quente de EHZZ por via oral nas doses de 30, 100 e 250 mg/kg (**EHZZPQ4**, **EHZZPQ5** e **EHZZPQ6**, respectivamente). Em todas as doses apresentadas verificou-se um aumento significativo do tempo de latência dos grupos em comparação ao controle basal (**EHZZPQ1**) e Ketamina (**EHZZPQ2**).

Tabela 34- Teste da placa quente utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose mg/kg	Tempo de reação (s)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Basal	-	3.2 ± 1.2	6.8 ± 0.4	8.7 ± 1.7	8.2 ± 2.1
Ketamina	25	11.6 ± 0.7	14.7 ± 1.4	16.5 ± 0.14	16.8 ± 2.9
EHZZPQ3	30	12.5 ± 2.0	15.8 ± 3.4	17.7 ± 3.6	31.3 ± 4.5
EHZZPQ4	100	12.3 ± 3.3	23.5 ± 3.8	24.8 ± 4.5	43.3 ± 1.0
EHZZPQ5	250	12.9 ± 3.2	42.8 ± 4.0	44.8 ± 3,7	60.4 ± 2.6
EHZZPQ6	500	15.5 ± 1.9	14.1 ± 2.1	16.2 ± 2.4	20.1 ± 0.6
EHZZPQ7	1500	12.7 ± 2.8	13.8 ± 2.3	18.1 ± 0.3	23.3 ± 2.8

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. ¹ Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor $p < 0,05$; ANOVA.

De acordo com a **Figura 32**, verifica-se que a dose de 250 mg/kg (**EHZZPQ5**), teve um aumento estatisticamente significativo em comparação com o basal (**EHZZPQ1**) e a Ketamina (**EHZZPQ2**) nos tempos de 30, 45 e 60 minutos.

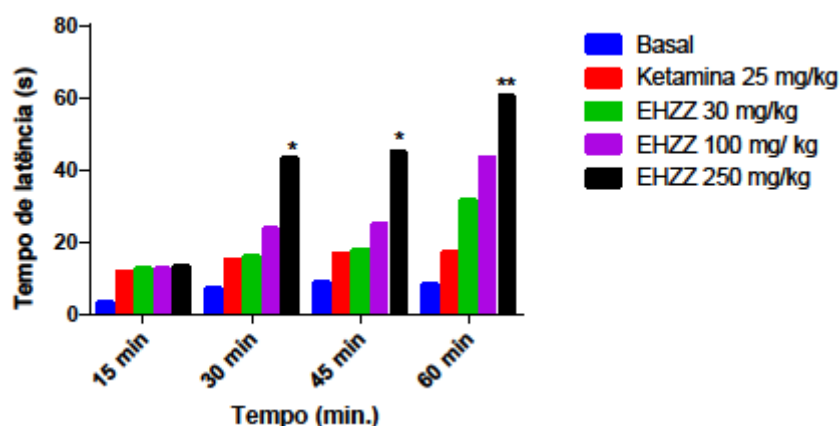


Figura 32 – Teste da placa quente utilizando como padrão a Ketamina e o extrato hidroalcoólico (EHZZ) como teste. O tempo de permanência do animal na placa versus o

tempo em min. *Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$). **Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina.

Através dos resultados obtidos, podemos dizer que tanto EBZZ e EHZZ propiciaram um efeito analgésico pelo aumento significativo do tempo de reação do animal sobre a placa quente, em destaque os grupos **EBZZPQ5** e **EHZZPQ5** com a dose de 250mg/kg. As doses de 500 e 1500 mg/kg de EBZZ e EHZZ tiveram efeito analgésicos porém os resultados foram descritos apenas em tabela e não em gráficos para obter melhor descrição estatística.

Portanto, o teste de placa quente com os extratos bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet*, demonstram que possuem atividade antinociceptiva atuando como Opióides no teste, esses dados contribuem para os estudos do potencial analgésico da planta *Zingiber zerumbet*.

Neste estudo o extrato metanólico de *Z.zerumbet* indicou uma potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva que pode está envolvendo a inibição de bradicininas, prostaglandinas e histaminas.

Em estudos de Hosseinzadeh e Younesi (2002) também afirmaram que qualquer extrato da planta do *Zingiber zerumbet* é considerado mediador central da atividade analgésica, fator comprovado nos testes de contorção abdominal e placa quente.

Em Zakaria et al. (2011), o perfil antinociceptivo do extrato metanólico de *Zingiber zerumbet* utilizando o teste da placa quente em camundongos, exibiu uma atividade significativa ($p < 0,05$) com dose dependente, os efeitos observados foram significativos apenas em doses de 6 a 50 mg / kg, a atividade antinociceptiva do extrato metanólico de *Z. zingiber* foi observada durante 30 min e de 180 min de intervalo na sequência após a sua administração. Em estudos por Pinheiro (2009) mostram claramente que o composto sesquiterpeno Zerumbona (ZER) obtida dos óleos essenciais dos rizomas de ZZ apresentam uma importante ação analgésica por via oral e *i.p* em camundongos e ratos. Os mecanismos envolvidos nas ações do composto não estão esclarecidos totalmente, contudo a ação antinociceptiva de ZER é particularmente interessante.

A Zerumbona (ZER) isolada do extrato metanólico de ZZ exibiu uma atividade antinociceptiva significativa utilizando os testes de contorção abdominal e placa quente. A ZER exibiu atividade antinociceptiva em ambos os testes. O pré-tratamento foi com Naloxona (5 mg/kg), um opióide antagonista não seletivo, os resultados indicaram o envolvimento dos receptores opióides na mediação da atividade do extrato metanólico nos testes antinociceptivo (SULAMAIN, 2009).

5.5.3 Analgesímetro

Os resultados da avaliação do efeito da indometacina e do extrato bruto de *Z. zerumbet* na hiperalgesia causada por estímulo mecânico em ratos estão na **tabela 35**, observa-se o tempo de reatividade ao estímulo mecânico da dor dos animais tratado com salina permaneceu estável, durante 60 minutos de observação. O tratamento dos animais nos grupos **EBZZHIP3** e **EBZZHIP4** (100 a 500 mg/kg) alterou a resposta ao estímulo até 60 minutos após a administração (52.0 ± 1.4 e 159.0 ± 0.1 , respectivamente), o extrato bruto e a **Ketamina** ambos aumentaram o tempo de reatividade a aplicação do estímulo (força).

Tabela 35- Teste de Analgesímetro utilizando o extrato bruto dos rizomas de *Z. zerumbet*

Tratamento	Dose mg/kg	Tempo de reação (s)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Basal	-	10.3 ± 0.4	12.0 ± 0.7	12.4 ± 0.07	12.4 ± 0.07
Ketamina	25	44.5 ± 0.7	68.0 ± 0.7	77.5 ± 0.7	81.0 ± 0,7
EBZZHIP3	100	31.0 ± 1.8	42.0 ± 1.5	48.0 ± 1,9	52.0 ± 1.4
EBZZHIP4	500	67.0 ± 1.8	83.0 ± 1.6	85.0 ± 1.5	159.0 ± 0.1
EBZZHIP5	1500	15.0 ± 1.4	34.0 ± 1.7	28.0 ± 1.4	38.0 ± 1.4

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. ¹ Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA

A **Figura 33** apresenta os efeitos da administração de EBZZ nas doses de 100 e 500 mg/kg comparado com o controle basal (salina) verifica-se que foram estatisticamente significativos (p<0,05), em destaque a dose de 500 mg/kg que teve maior aumento do tempo de reatividade (s) do estímulo mecânico.

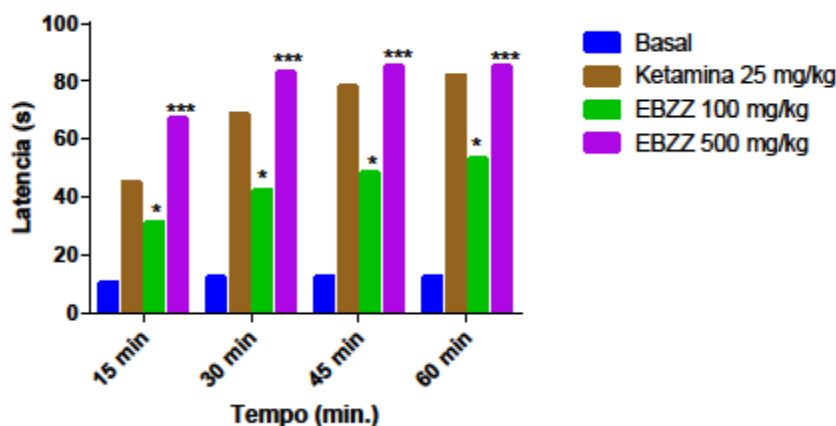


Figura 33 – Efeitos da administração do extrato bruto (100 e 500 mg/kg), Ketamina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos utilizando o analgesímetro. *Indica diferença significativa

em relação ao basal ($p < 0,05$). ** Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina. *** Indica diferença significativa em relação ao basal, Ketamina e dose de 100 mg/kg.

A **tabela 36** mostra os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Z. zerumbet* na analgesia induzida por estímulo mecânico, observa-se também o tempo de reatividade ao estímulo mecânico da dor dos animais tratado com salina permaneceu estável, durante 60 minutos de observação (12.4 ± 0.07). O tratamento dos animais dos grupos com **EHZZHIP3** e **EHZZHIP4** (100 a 500 mg/kg) alterou a resposta ao estímulo até 60 minutos após a administração (62.0 ± 0.03 e 63.0 ± 0.03 , respectivamente), o extrato hidroalcoólico e a Ketamina ambos aumentaram o tempo de reatividade a aplicação do estímulo (força).

Tabela 36- Teste de Analgesímetro utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ.

Tratamento	Dose mg/kg	Tempo de reação (s)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Basal	-	10.3 ± 0.4	12.0 ± 0.7	12.4 ± 0.07	12.4 ± 0.07
Ketamina	25	44.5 ± 0.7	68.0 ± 0.7	77.5 ± 0.7	81.0 ± 0.7
EHZZHIP3	100	45.0 ± 1.1	61.0 ± 0.03	61.0 ± 0.03	62.0 ± 0.03
EHZZHIP4	500	45.0 ± 1.1	62.0 ± 0.03	62.0 ± 0.03	63.0 ± 0.03
EHZZHIP5	1500	20.0 ± 0.7	23.3 ± 1.3	26.3 ± 0.8	55.6 ± 1.9

Valores dados em média \pm EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo $n=6$. ¹ Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor $p < 0.05$; ANOVA.

A **Figura 34**, apresenta os efeitos da administração de EHZZ nas doses de 100 e 500 mg/kg, os resultados comprovaram que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle basal (salina).

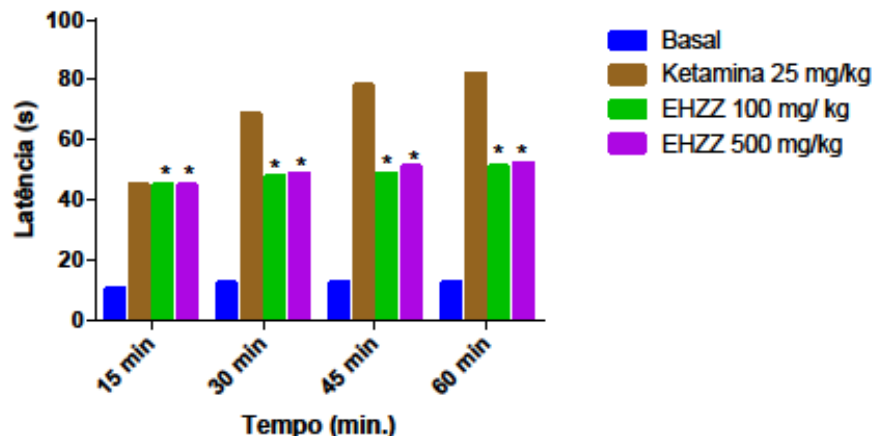


Figura 34– Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico (100 e 500 mg/kg), Ketamina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos utilizando o analgesímetro. * Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$).

A fim de verificar os efeitos da administração do Extrato bruto e hidroalcoólico de *Z.zerumbet* (EBZZ e EHZZ), conforme a metodologia da atividade de analgesia da presente tese, a dose de 1500 mg/kg do grupo **EBZZHIP5** e **EHZZHIP5** foram testados porém os resultados foram descritos apenas nas tabelas e não em gráficos para melhor descrição estatística, devido a apresentarem níveis baixos de tempo de reatividade.

Em estudo similar por Pinheiro (2009) avaliou o efeito anti-inflamatório da Zerumbona isolada de *Z.zerumbet*. Os resultados também foram significativos, o tratamento dos animais com Zerumbona (150-1500 mg/kg, v.o) alterou a resposta ao estímulo até 3 horas após a administração. A aplicação de fentanest (20µg/mL) e Zerumbona aumentou o tempo de reatividade à aplicação do estímulo (força). Tais resultados podem indicar que a Zerumbona possui atividade anti-inflamatória.

Em outros estudos, utilizaram o sulfato dextrano de sódio em ratos criando modelos de inflamação intestinal para induzir úlceras colitis, tendo como tratamento a Zerumbona isolada dos rizomas de *Z. zerumbet*, também foi observado a Zerumbona inibindo a formação de PGE2 e inibindo a síntese de COX-2 (MURAKAMI, et al. 2003).

Os resultados obtidos na presente tese pela atividade analgésica de EBZZ e EHZZ são indicativos a apresentar atividade analgésica em modelos de dor causada por estímulo mecânico.

5.6 Atividade Anti-inflamatória

5.6.1 Edema de Pata induzida por Carragenina (Dor inflamatória causada por estímulo químico)

A **tabela 37** mostra os efeitos anti-inflamatório do EBZZ, no grupo **EBZZEP3** (100 mg/kg), o extrato nesta dose reduziu o edema em 30, 45, 60 e até 90 minutos. Já o EBZZ no grupo **EBZZEP4** (500 mg/kg) não teve o mesmo resultado, o edema manteve-se constante até 90 minutos de experimento.

Tabela 37- Edema de Pata utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose (mg/kg)	Volume de Edema (Média±DP)				
		15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Basal	-	6.7±0.11	6.9±0.11	7.0±0.76	7.2±0.77	7.0±0.60
Indometacina	25	6.1±0.25	6.8±0.26	6.4±0.32	6.1±0.23	6.2±0.35
EBZZEP3	100	6.5±0.77	6.3±0.49	6.2±0.33	6.0±0.35	6.3±0.63
EBZZEP4	500	6.6±0.12	6.6±0.25	6.5±0.41	6.6±0.29	6.6±0.32
EBZZEP5	1500	6.8±0.28	6.4±0.17	6.5±0.15	6.8±0.28	7.1±0.23

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. ¹ Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

Estes resultados são indicativos que EBZZ na dose de 100 mg/kg teve o efeito comparável ao da indometacina, sendo que o extrato conseguiu suprimiu a resposta edematosa em 30 minutos de experimento (**Figura 35**).

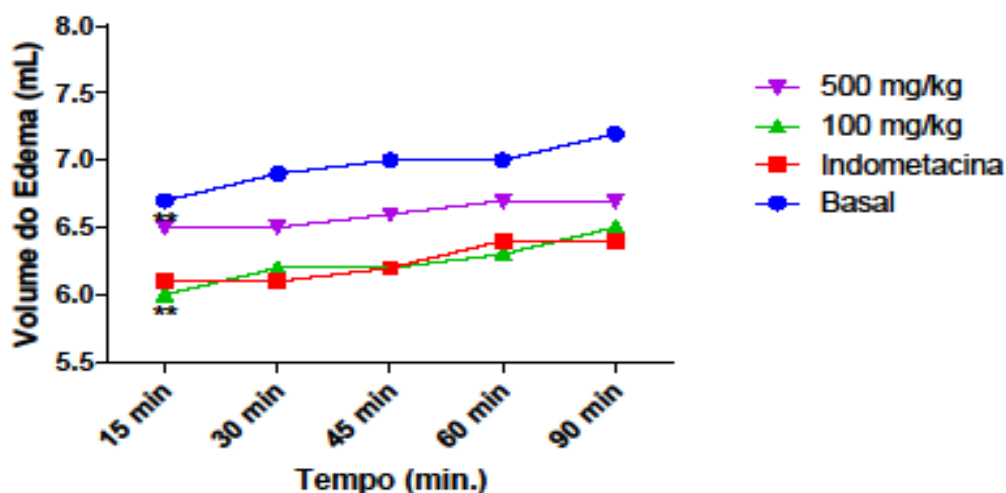


Figura 35– Efeitos da administração do extrato bruto (100 a 500 mg/kg), Indometacina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c) na pata traseira esquerda. * Indica diferença significativa em relação ao basal (p <0,05). ** Indica diferença significativa em relação ao basal e Ketamina.

A **tabela 38** apresenta os efeitos anti-inflamatórios do EHZZ (100 e 500 mg/kg). A **Indometacina** reduziu o edema em ratos a partir de 45, 60 e 90 minutos em relação aos animais não tratados (**EHZZEP1**). O grupo **EHZZEP3** não obteve o mesmo resultado, o extrato nesta dose (100 mg/kg) não produziu uma redução do inchaço do edema mantendo-se

até 90 minutos. Entretanto, o **EHZZEP4** (500 mg/kg) produziu uma redução significativa do edema, suprimiu a resposta edematosa em 45, 60 e até 90 minutos.

Tabela 38- Edema de Pata utilizando o extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose (mg/kg)	Volume de Edema (Média±DP)				
		15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
Basal	-	6.7±0.11	6.9±0.11	7.0±0.76	7.2±0.77	7.0±0.60
Indometacina	25	6.1±0.25	6.8±0.26	6.4±0.32	6.1±0.23	6.2±0.35
EHZZEP3	100	6.3±0.33	6,6±0,49	6.4±0.18	6.8±0.24	7.1±0.43
EHZZEP4	500	6.2±0.32	6.3±0.54	5.7±0.43	6.0±0.23	5.8±0.36
EHZZEP5	1500	6.1±0.33	6.6±0.61	7.1±0.38	7.5±0.48	7.6±0.33

Valores dados em média ± EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6. ¹ Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor p <0.05; ANOVA.

Estes resultados indicam que a dose de 500 mg/kg obteve um efeito comparável ao da indometacina (anti-inflamatório comercial), indicando de que nesta dose esteja inibindo a liberação de mediadores químicos da inflamação via prostaglandinas (**Figura 36**).

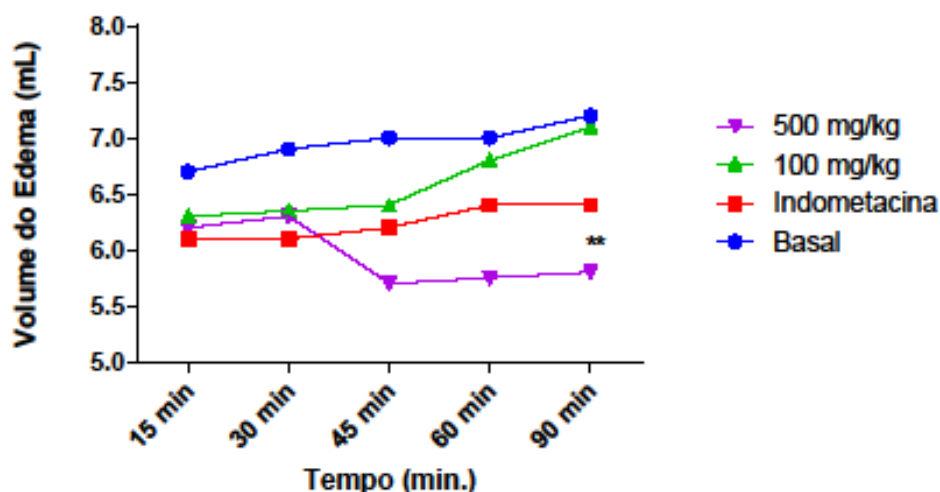


Figura 36 – Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico (100 a 500 mg/kg), indometacina (25 mg/kg) ou basal (salina) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c) na pata traseira esquerda. *Indica diferença significativa em relação ao basal (p<0,05).

Através da atividade anti-inflamatória de edema de pata em ratos induzido por carragenina (1%), utilizando os extratos EHZZ e EBZZ, podemos constatar os efeitos dos extratos em determinadas doses 100 e 500 mg/kg, respectivamente, produzindo respostas anti-inflamatórias, comparada ao padrão Indometacina e aos animais que não foram tratados.

Para avaliar os efeitos da administração do Extrato bruto e hidroalcoólico de *Z.zerumbet* (EBZZ e EHZZ), conforme a metodologia da atividade anti-inflamatória do teste edema de pata da presente tese, o **grupo EBZZEP5 e EHZZEP5** (1500 mg/kg) foram testados porém os resultados foram descritos apenas em tabelas e não em gráficos para melhor descrição estatística, devido a apresentarem níveis altos do volume do edema.

Os resultados obtidos na presente tese pela atividade anti-inflamatória de EBZZ e EHZZ são indicativos a apresentar atividade anti-inflamatória em modelos de dor inflamatória causada por estímulo químico.

De acordo com os dois modelos de inflamação (estímulo mecânico e químico), pode-se afirmar que tanto o EBZZ e EHZZ possam estar inibindo mediadores inflamatórios, sendo que os principais mediadores da inflamação são: Substância P, Prostaglandinas (PG1 e PG2), NO, Bradicinina, NGF (fator de crescimento neural) e Citocinas pró-inflamatórias (Interleucinas-IL) 1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α).

A inflamação aguda pode ser caracterizada por sinais cardinais clássicos, rubor e tumor com calor e dor, podendo ainda apresentar um quinto sinal, a perda da função. Esses sinais cardinais surgem como consequência das alterações do microambiente da área lesada, devido à liberação de vários mediadores químicos nesta área. Estas substâncias estimulam nociceptores quimiossensíveis, levando ao desenvolvimento da dor inflamatória. A dor inflamatória é, pois, resultado de uma complexa inter-relação de sistemas que estão envolvidos na inflamação (COUTAUX et al., 2005).

Em estudos de Chien e colaboradores (2008) utilizaram quatro componentes isolados do extrato metanólico dos rizomas de *Z. zerumbet* (um sesquiterpeno, uma flavona, e 2 flavonóides glicosídeos) para avaliar a atividade anti-inflamatória através do teste de edema de pata. Quando a carragenina foi injetada na região intraplantar na pata traseira, o inchaço foi observado em 1 h em até 2,5 vezes do que os camundongos que não tratados. A administração oral de zerumbona (10 mg/kg) ou indometacina (100 mg/kg) produziu uma redução significativa no edema de pata em comparação com os controles não tratados. O pré-tratamento com a zerumbona suprimiu a resposta edematosa em 1 h após a injeção de

carragenina e este efeito manteve-se até 6 h. A potência da zerumbona na atenuação do edema da pata é comparável ao da indometacina e o efeito inibidor durou mais tempo.

Zakaria e col. (2010) avaliaram o perfil anti-inflamatório do extrato metanólico de *Zingiber zerumbet* (MEZZ) utilizando o teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. O trabalho demonstrou que em todas as dosagens do MEZZ exibiu um efeito significativo ($p < 0,05$), as doses de 50 e 100 mg/kg após a sua administração em 90 minutos exibiu atividade antiedema. No entanto, a dose de 25 mg/kg de MEZZ demonstrou atividade de 150 minutos após a sua administração. Para todas as dosagens utilizadas, a atividade antiedema durou até o final do experimento, porém foi mais baixa do que produzida pela dose do padrão Ácido acetil salicílico (100 mg/kg).

Em um trabalho publicado por Somchit et al. (2012), utilizando a zerumbona isolada dos rizomas de *Z. zerumbet* verificou que os resultados obtidos a partir do edema de pata induzido por carragenina exibiu um efeito significativo ($p < 0,05$) utilizando a zerumbona (10 e 20 mg/kg) de atividade anti-inflamatória com inibição máxima de 45,67 e 70,37% respectivamente. A atividade anti-inflamatória de zerumbona estatisticamente foi similar ao piroxican. A zerumbona inibiu o edema de pata de rato por 87,8%. Contudo o piroxican foi o mais potente que inibiu a inflamação por 92,68%.

5.6.2 Edema de Orelha

O edema de orelha de camundongos, induzido pela ação irritativa do formol, foi diminuído de forma expressiva pela aplicação tópica do EBZZ nas doses de 100 e 300 mg/orelha, em relação ao controle negativo. A redução do edema foi de 54,7% e 33,7% respectivamente. A administração local da indometacina (50 mg/orelha) diminuiu o edema em 44% (Tabela 39).

Tabela 39- Edema de Orelha utilizando o extrato bruto dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose (mg/kg)	% de inibição do Edema
Basal	-	-
Indometacina	50	44
EBZZEO1	100	54,7
EBZZEO2	300	33,7

Valores dados em média \pm EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6.

*Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor $p < 0,05$; ANOVA.

O efeito anti-inflamatório do extrato bruto de *Zingiber zerumbet* nas concentrações de 100 e 300 mg/kg e da indometacina estão representados na **figura 37**.

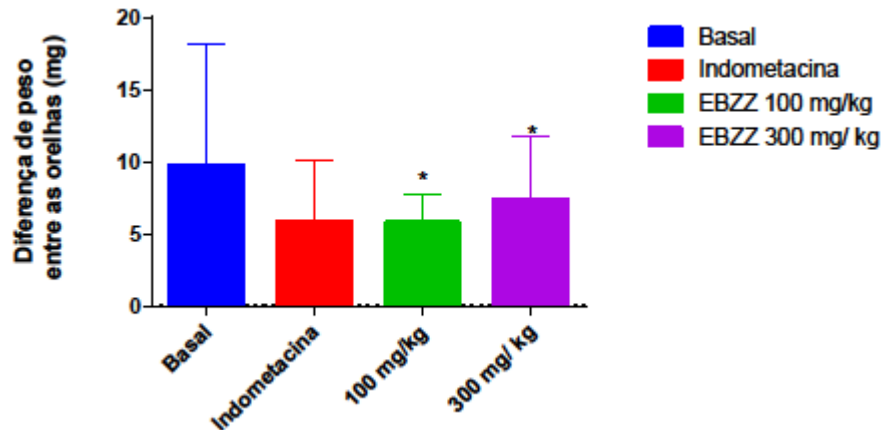


Figura 37– Efeito do extrato bruto (100 e 300 mg/kg) e indometacina (50 mg/kg) via oral sobre o estímulo inflamatório pelo formol em camundongos (n=6). Os valores em cada coluna representam a média \pm DP da diferença entre as orelhas (mg) *Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$).

Os percentuais de inibição do extrato hidroalcoólico dos rizomas de ZZ encontram-se na **tabela 40**. Verifica-se que EHZZ provocou inibição do edema em 72% na dose de 300mg/orelha, de forma significativa comparada com o controle basal e indometacina.

Tabela 40- Edema de Orelha utilizando o extrato Hidroalcoólico dos rizomas de ZZ

Tratamento	Dose (mg/orelha)	% de inibição do Edema
Basal	-	-
Indometacina	50	44
EHZZEO1	100	50
EHZZEO2	300	72

Valores dados em média \pm EPM erro padrão da média. Número de animais N de animais por cada grupo n=6.

*Valores que são diferentes estatisticamente do controle valor $p < 0,05$; ANOVA.

A **figura 38** apresenta os efeitos anti-inflamatório de EHZZ nas concentrações de 100 e 300 mg/orelha, foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) o edema causado por formol. Quanto menor a diferença de peso entre as orelhas maior o potencial de inibição (ROCHA et al, 2008).

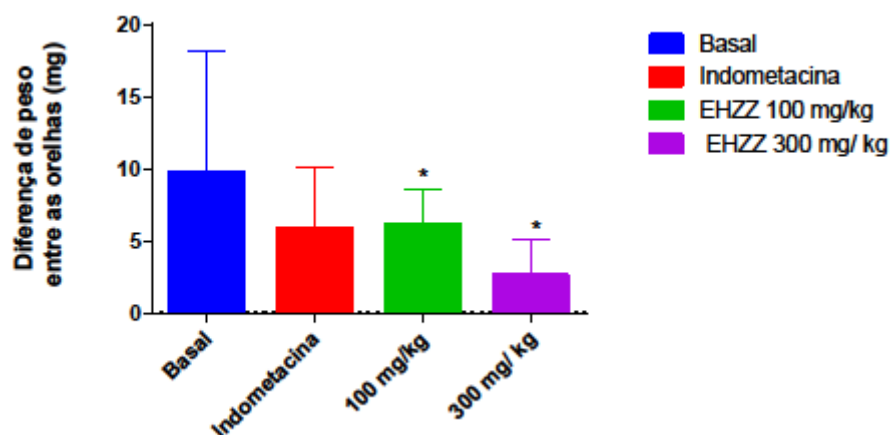


Figura 38– Efeito do extrato hidroalcoólico (100 e 300 mg/kg) e indometacina (50 mg/kg) via oral sobre o estímulo inflamatório pelo formol em camundongos (n=6). Os valores em cada coluna representam a média \pm DP da diferença entre as orelhas (mg) * Indica diferença significativa em relação ao basal ($p < 0,05$).

Em estudos de Pinheiro (2009), utilizando a zerumbona em aplicações tópicas de 1% a 3% para o teste de edema de orelha induzido por ácido araquidônico, a substância também provocou redução do edema de orelha em 50,5% de forma significativa comparada ao controle basal (veículo) e o controle positivo (placebo alfa humuleno), esse efeito foi observado tanto pelo método de medição utilizando o paquímetro digital, como por punção auricular.

De acordo com os dados analisados da presente tese observa-se que EBZZ e EHZZ possuem atividade anti-inflamatória. No teste de edema de orelha tanto o extrato bruto quanto EHZZ nas doses de 100 e 300 mg/orelha demonstram inibidores do edema comparados com o controle basal (veículo) e a indometacina (anti-inflamatório comercial). Esses dados são inéditos para a literatura, visto que não existem relatos na literatura estudos com EBZZ e EHZZ.

5.7 Análise Microbiológica

5.7.1 Atividade Anti- *Helicobacter pylori* (Gastroprotetora)

Para a classificação da atividade antimicrobiana, de extrato e frações podem ser empregados alguns critérios. O CIM, índice de concentração inibitória mínima, é definida como a menor concentração de um determinado antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de 50% (CIM 50) ou (CIM 90) das unidades formadoras de colônias de um inóculo padrão de

uma determinada espécie bacteriana *in vitro*. O CIM entre 10 e 100 µg/mL podem ser considerados ativos; entre 100 e 500 µg/mL a atividade é moderada e quando a CIM for maior que 1000 µg/mL são classificados como inativos (HOLETZ et al., 2002).

A **tabela 41**, mostra os resultados obtidos, verifica-se que as amostras de EBZZ, EHZZ e EOZZ mostraram-se inativas frente a *H. pylori*, resultado diferente ao controle amoxicilina que mostrou-se ativa contra a cepa bacteriana.

Tabela 41- Atividade Antibacteriana frente a *H. pylori* utilizando o extrato bruto e Extrato Hidroalcoólico dos rizomas de ZZ.

Amostra	CIM (µg/mL)
Amoxicilina	31,25
EBZZ	> 1000
EHZZ	>1000
EOZZ	250

A bactéria *Helicobacter pylori* por se tratar de uma bactéria gram-negativa, a composição do envelope celular dificulta a ação de agentes antimicrobianos. O pH ácido, a dificuldade de adesão da bactéria à mucosa gástrica, o aumento de resistência aos antibióticos e o processo inflamatório crônico são outros fatores limitantes da terapêutica antimicrobiana (LYTTON et al., 2005).

A atividade da Zerumbona isolada dos rizomas de *Z.zerumbet* frente a *Helicobacter pylori* foi avaliada por Sidahmed e colaboradores (2015). Para esta atividade eles utilizaram o método de microdiluição e utilizaram duas cepas de *H. pylori* (NCTC 11637 e J99) e os resultados foram expressos em CIM. A Zerumbona teve um CIM de 250 µg/mL, ou seja, apresentando-se ativa contra duas cepas do *H. pylori*, estes resultados indicam que a Zerumbona mostrou eficácia significativa anti-*H.pylori*.

De acordo com os nossos resultados verificou-se que apenas a amostra do óleo essencial de *Z. zerumbet* mostrou-se ativa para a cepa *H. pylori*, tendo um bom índice de CIM (250 µg/mL) comprovando que o óleo essencial possui atividade anti-bacteriana e corroborando com os estudos de Sidahmed et al. (2015) utilizando a zerumbona frente a esta bactéria (CIM: 250 µg/mL).

Para os resultados dos Extratos bruto e Hidroalcoólico de *Z.zerumbet* foram inativos para *H.pylori*, porém esses dados contribuem para os estudos científicos dos extratos da

planta *Zingiber zerumbet* frente à *Helicobacter pylori*, visto que a atividade anti-*H.pylori* com os extratos de *Z.zerumbet* tem sido pouco avaliada.

6. Conclusões

De acordo com os resultados podemos concluir que:

- ✓ Os resultados com os extratos de EBZZ e EHZZ foram inéditos e expressivos para a literatura.
- ✓ Obteve-se um teor extrativo de 60g do extrato bruto e 10g do extrato hidroalcoólico, em um percentual de 1% e 0,16%, respectivamente. O odor dos extratos é de característica amargo.
- ✓ Em relação à determinação de minerais da amostra dos rizomas secos existe maior quantidade de ferro (231 mg/kg).
- ✓ Na composição centesimal, em destaque o teor de proteínas 8.3%, um valor inéditos para a literatura.
- ✓ O extrato bruto e o extrato hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet* revelaram ser potentes antioxidantes dados inéditos para a literatura, em destaque o EHZZ que apresentou uma excelente CI50 de 4.32 µg/mL.
- ✓ O *screening* fitoquímico dos extratos bruto e hidroalcoólico do *Zingiber zerumbet* L. Simth revelou a presença de xantonas, flavonóides, fenóis, taninos e alcalóides.
- ✓ Na cromatografia de camada delgada do EBZZ indicando uma mancha revelada no iodo com o fator de retenção (Rf) de aproximadamente 0,7 cm, apresentando semelhanças nos Rfs com o padrão Zerumbona (ZER). No extrato hidroalcoólico (EHZZ) apresentaram três manchas reveladas no iodo a 254nm.
- ✓ Dos resultados da toxicidade aguda e subcrônica, pode-se afirmar que os extratos EBZZ e EHZZ não possuem efeitos tóxicos ou mortalidade em camundongos durante 14 e 30 dias, respectivamente.

-
- ✓ Na avaliação macroscópica dos grupos de EBZZ e EHZZ, os órgãos estavam em boas condições e nas análises histopatológicas verificou-se que os fígados não houve nenhuma alteração histológica nos animais.
 - ✓ Os extratos bruto (EBZZ) e Hidroalcoólico (EHZZ) de *Z. zerumbet* mostraram efeitos inibitório contra lesões gástricas atuou como gastroprotetor.
 - ✓ Na avaliação do teste de contorção abdominal induzida por ácido acético da presente tese pode-se constar que EBZZ e EHZZ nas doses de 250 e 500 mg/kg produziram um efeito analgésico significativo, causando inibição dependente das doses das contorções abdominais.
 - ✓ O teste de placa quente e hiperalgesia com o extrato bruto e hidroalcoólico de *Zingiber zerumbet*, demonstraram que são analgésicos.
 - ✓ A avaliação da atividade anti-inflamatória de EBZZ e EHZZ foi significativa na ação fisiológica em determinadas doses em modelos de dor inflamatória causada por estímulo mecânico ou químico.
 - ✓ O resultado do óleo essencial EOZZ mostrou se ativo frente a bactéria *Helicobacter pylori*, comprovando ter atividade anti-*H.pylori*. Os resultados da atividade do Extrato bruto e Hidroalcoólico de *Z.zerumbet* foram inativos para a *H.pylori*.
 - ✓ De acordo com os resultados avaliados testes de toxicidade e com as atividades farmacológicas de EBZZ e EHZZ, verificou-se que a dose ideal para ser formulada a cápsula alimentar funcional será a dose de 250 mg/kg.
 - ✓ Em relação à potencialidade de EBZZ e EHZZ, ambos os extratos tiveram bons resultados nas atividades farmacológicas testadas.

7. Perspectivas

Os estudos da presente tese contribuíram para a elaboração da cápsula alimentar medicinal de EBZZ, EHZZ e EOZZ, será realizado um estudo clínico futuramente em humanos após ser aprovado pelo Comitê de Ética em seres humanos- CEP, a capsula alimentar será um produto fantástico, pois além de ser terapêutica irá prevenir doenças. Esta será composta de extrato do *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (gengibre amargo), no qual possui uma substância chamada zerumbona que apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antisséptica, antiespasmódica. Seu uso dispensará quaisquer prescrições médicas e seus benefícios poderão ser: potente atividade hepatoprotetora (antiúlcera e bacteriostático) e estimulante digestivo, responsável pelo aumento produção da secreção gástrica, facilitando a digestão e estimulando o apetite. Este será considerado como alimento terapêutico atuando como gastroprotetor, analgésico e anti-inflamatório.

8. Referências Bibliográficas

ABDUL, A.B., AL-ZUBAIRI, A.S., DEVI, N.D., WAHAB, S.I., ZAIN, Z.N., RUSLAY, S., SYAM, M.M. Anticancer activity of natural compound (ZER) extracted from *Zingiber zerumbet* in human Hela cervical cancer cells. **International Journal of Pharmacology**. v.4, p.160–168, 2008.

ADITIVOS & INGREDIENTS. **Ervas em alimentos funcionais**. Disponível em: < <http://www.insumos.com.br>. Acesso em: 15 de janeiro. 2015.

AL-AMIN, M.; SULTANA, G. N. N.; HOSSAIN, C. F. Antiulcer principle from *Zingiber montanum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 57- 60, 2012.

AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, *Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Ed. Washington, D.C., 1995.

ASLAN. **Cromatografia líquida e gasosa: conceitos**. Disponível em: <http://alsanlab.com.br/home/?page_id=158>. Acesso em: 13 de Maio. 2014.

ASYA SHOPPING, **Gengibre *Zingiber officinale* alívio da artrite e reumatismo 100 capsules**. Disponível em<:<http://asia-shopping.net/index.php?item=-100-capsules&action=article&aid=1081&lang=PT>>. Acesso em: 18 de maio. 2015, 13:30:40.

BASAK, T. S.; SARMA, G. C.; RAGAN, L. Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 286-296, 2010.

BENKOUIDER, C. Functional foods: A global overview. **International Food Ingredients**, v.5, p.66–68, 2004.

BENETTI, V.M. **Comparação entre dois métodos manuais de obtenção de cápsulas rígidas de gelatina**. 2010. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2010.

BHUIYAN N. I.; CHOWDHURY, J. U.; BEGUM, J. Chemical investigation of the leaf and rhizome essential oils of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 9–12, 2009.

BLUMBERG, H.; WOLF, P.S; DAYRON, H. B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonist. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 118, p. 163-166, 1965.

BRASIL, Resolução nº 16 de 30 de março de 2009. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes, republicada em 03 de dezembro de 1999.

BRASIL, E. C. de L.; GOMES, A. de L.; BEZERRA, M. L. da S.; FÉRRER, J. A. da C.; BATISTA, M. da C.; OLIVEIRA, R. R. C.; FIGUEREDO C. A.; KLUPPEL, B. L. P.

Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p.109-122, 2006.

BRASIL FOOD TRENDS. **Brasil Food Trends 2020**. Disponível em: <<http://www.brazilfoodtrends.com.br>> Acesso em: 13 de Novembro. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm>. Acesso em: 06 de abr. 2015a. 16:39:30.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira, volume 1. Brasília: Anvisa, 2010, 524 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acesso em: 31 maio 2015b.

BRITISH HERBAL PHARMACOPEIA. *British Herbal Medicine Association*, London, p. 239,1983.

BÜCKER, A.; BÜCKER, N. C. F.; NUNEZ, C. V.; PINHEIRO, C.C.S.P.; TADEI, W. P. Evaluation of larvicidal activity and brine shrimp toxicity of rhizome extracts of *Zingiber zerumbet*(L.) Smith. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, p.377-380, 2013.

CÂNDIDO, L. M. B. **O Estado da Arte Alimentos Funcionais e Nutracêuticos no Brasil: Encontro Franco Brasileiro de biociência e biotecnologia - Alimentos funcionais e nutracêuticos Resumos das palestras. Documentos 85, Brasília, 2002**. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/doc085.pdf>> Acesso em: 15 fev 2015.

CHHABRA, N. P.; DHILLON, R. S. WADIA, M. S.; KALSI, P. S. Structure of zerumbone oxide: a new sesquiterpene epoxy ketone from *Zingiber zerumbet* (wild ginger oil). **India Journal of Chemistry**, v. 13, p. 222- 224, 1975.

CHIEN, T. et al. Anti-inflammatory constituents of *Zingiber zerumbet*. **Food Chemistry**, v.110, p. 584-589, 2008.

CHAUNG, H. C.; HO, C. T.; HUANG, T. C. Anti-hypersensitive and anti-inflammatory activities of water extract of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **Food and Agricultural Immunology**, v. 19, p. 117–129, 2008.

CHANG, C. J.; TZENG, T. F.; LIOU, S. S.; CHANG, Y.S.; LIU, I. M. Acute and 28-Day Subchronic Oral Toxicity of an Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith in Rodents. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.11, 2012.

COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p.295–310, 1968.

CORRÊA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Brasília, IBDF, 1968.

COSTA SILVA, H. S. R.; COSTA SILVA, K. S. C. R.; DOS SANTOS, E. I. F. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, Paris, v.72, p.359-371, 2005.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA., 2006.

DAI, J. et al. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of *Zingiber aromaticum* and *Z. zerumbet*. **Natural products Letters**, v. 10, p. 115-118, 1997.

DEEOUN, S.; PHUNEERUB, P.; PALANUVEJ, C.; RUANGRUNGSI, N.; TOWIWAT P. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Tree- Phon- Thad remedy. **TJPS**, v. 38, p. 156-209, 2014.

DE LUCCA, J.M. et al. Cápsulas duras com enchimento líquido ou semi-sólido: uma revisão sobre sua produção e aplicação na liberação de fármacos. **Farmacia Bonaerense**, v. 24, p. 458-467, 2005.

DICKENSON, A.; BESSON, J.M. *The Pharmacology of Pain*. Ed. Berlin: Springer, p.21-41, 1997

DISCOVERY LIFE. Informação Global de Herbários que armazenam a planta *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/20/q?search=Zingiber+zerumbet>> Acesso em: 16 de fevereiro 2015.

DRENNOWSKI A; GOMEZ-CARNEIROS C. Bitter taste. Phytonutrients and consumer. A review. **American Journal Clinical Nutrition**, v.72, p. 1424-35, 2000.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and ca. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

EDDY, N. B.E LEIMBACK, D. Synthec analgesics II. Diheenylbutenyl and dithienylbutylammnes. **Journal American Pharmacology Therapy**, v. 107, p. 385-393, 1953.

ELY, J.F; ELY, P.B; WEBSTER, R. S.; PAVELECINI, M.; LUCAS, M. Enzimatic alterations due to skeletal muscle ischemi in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 15, 2000.

- FAGUNDES, R.L. M.; COSTA Y.R. Uso de alimentos funcionais na alimentação. *Higiene Alimentar*, p. 17-47, 2003.
- FERREIRA, A. O., *Guia Prático de Farmácia Magistral*. 3ª Ed, São Paulo: Pharmabooks – vol.1, 2008.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Extratos vegetais**. Disponível em: <<http://www.revist-fi.com>> Acesso em: 10 de janeiro. 2015.
- FURLAN, M. R. *Cultivo de Plantas Mediciniais*. Coleção Agroindústria, 13 Edição SEBRAE-Cuiabá. Mato Grosso. p.137, 1998.
- GAMARANO, L.; FRAIGE FILHO, F. **Alimentos Funcionais no tratamento do Diabetes Mellitus**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2003 Disponível em<: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2002aquisicao/tab26.pdf> f >. Acesso em: 2 de fevereiro. 2015.
- GARCIA, A. P. M. Alimentos funcionais: contribuindo para a saúde e prevenindo doenças. **Qualidade em Alimentação: Nutrição**. São Paulo:Ponto Crítico, n. 19, jun./set. 2004.
- GLAVIN, G.B.; SZABO S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 825-831,
- GUYTON, A. C. e HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro:Guanabara, Koogan, 2002.
- HAMID, Z. A. et al. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Journal of Zhejiang University**, v. 13, p. 176-185, 2012.
- HASHEMI, S. et al. Acute toxicity study and phytochemical screening of selected herbal aqueous extract in broiler chickens. **International Journal Pharmacological**, v. 4, p. 352-360, 2008.
- HASNAH, M. Chemical constituents of some medicinal plants of Zingiberaceae: Medicinal products from tropical rain forest. **Proceedings of the conference. Forest Research Institute Malasya**, v. 2, p. 299-304, 1991.
- HAYES, S. C., WILSON, K. G. Acceptance and Commitment Therapy: Altering the verbal support for experiential avoidance. **The Behavior Analyst**, v. 17, p.289-303, 1994.
- HILLIAM, M. Fortified juice trends. **The World of Food Ingredients**, v. 12, p. 17–19, 2000.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. *Screening* of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infection diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.
- HOSSEINZADEH, H. YOUNESI, H. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L.stigma and petal extracts in mice. **BMC Pharmacology**, v. 2, p. 7, 2002.

HUANG, G. C.; CHIEN, T. Y.; CHEN, L. G.; WANG, C. C. "Antitumor effects of zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D cells in vitro and in vivo." **Planta Medica**, v. 71, p. 219-224, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo, p. 1020, 2008.

JANG, D. et al. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. **Arch Pharmacological Research**, v.27, p. 386-389, 2004.

JANTAN, I.; RAFI, I.; JALIL, J. Platelet-activating factor (PAF) receptor-binding antagonist activity of Malaysian medicinal plants. **Phytomedicine**, v.12, p.88-92, 2005.

JULIUS D.; BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p.203-210, 2001.

KADER, M. G.; HABIB, M. R.; NIKKON, F.; YEASMIN, T.; RASHID, M. A.; RAHMAN, M.; GIBBONS, S. Zederone from the rhizomes of *Zingiber zerumbet* and its anti-staphylococcal activity. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, p. 63-68, 2010.

KHALID, M. H.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; PERIMALS, E. K.; AKIRA, A. ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAMAIN, M. R. Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: Possible mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p. 345-351, 2011.

KADER, G.; NIKKON, F.; RASHID, M. A.; YEASMIN, T. Antimicrobial activities of the rhizome extract of *Zingiber zerumbet* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.12, p. 409- 412, 2011.

LANDSTROM, E. et al. Use of functional foods among Swedish consumers is related to health- consciousness and perceived effect. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 1058-1069, 2007.

LAKO, J.; TRENNERY, V. C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1727–1741, 2007.

LAPA, A. J. et al. *Métodos de avaliação da Atividade Farmacológica de plantas medicinais*. Ed. Lagoa Ltda., São Paulo. 2005

LAMOLHA, M.A. et al. Vantagens da utilização de excipiente semi-sólido na manipulação de fármacos de classe IV do sistema de classificação biofarmacêutica. **Encarte Técnico Anfarmag**, São Paulo, n. 75, nov.-dez., 2008. Disponível em:<<http://www.anfarmag.org.br/documentos/encartetecnico74022009.pdf>>. Acesso em: 31 maio 2012.

LE COINTE, P. *Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e aclimata) da Amazônia Brasileira*. São Paulo: Brasiliense, 506 p.,1947.

- LITCFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, v.95, p. 99-113, 1949.
- LYTTON, S. D.; FISCHER, W.; NAGEL, W.; HAAS, R.; BECK, F. X. Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology*, v. 151, p. 3267–3276, 2005.
- MAHMOUDI, M.; EBRAHIMZADEH, M. A.; ANSAROUDI, F.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. **African Journal of Biotechnology** v.8, n.24, p. 7170-7175, 2009
- MATOS, F.J.A. *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC, p. 45-64, 1997.
- MARTINS, F.; PINHO, O.; FERREIRA, I. Alimentos Funcionais: Conceitos, Definições Aplicações e Legislação. **Revista SPCNA**, v. 10, p.69-78, 2004.
- MEYER, B.N. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p. 31- 34, 1982.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CAN, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. 4º Ed. CRC PRESS Taylor & Francis Group, p. 26-27. 2006.
- MINHA VIDA. A importância do Ferro. Disponível em: <<http://www.minhavidacom.br/alimentacao/tudo-sobre/18346-potassio-controla-a-pressao-arterial-e-previne-avc>>. 10 de agosto. 2015. >. Acesso em: 02 de Agosto de 2015.
- MONTELLANO, O. B. **Empirical Aztec d. Science**, v. 188, p. 215-220, 1975.
- MORETTO, E. FETT R.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M. *Introdução à ciência de alimentos*. Editora da UFSC, 255p., 2002.
- MONGELLI, E.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. *Screening* of argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. **International Journal Pharmacology**, v.34, p. 249-254, 1996.
- MORRISON, J. K.; QUINTON, R. M.; REINTER, M. The purpose and value of LD 50 determination In: BOYLAND, E.; GOUNDIND, R. (Ed.) **Modern Trends in toxicology**. London: Butterworth, 1998.
- MURAKAMI, A., TAKAHASHI, M. “Identification of zerumbone in *Zingiber zerumbet* Smith as a potent inhibitor of 12 O, tetradecanoylphorbol 1- 13 -acetate – induced Epstein -Barr virus activation”. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, p.1811-1812, 1999.
- MURAKAMI A. D. et al. Zerumbone, a Southeast Asian ginger sesquiterpene, markedly suppresses free radical generation, proinflammatory protein production, and cancer cell proliferation accompanied by apoptosis: the alpha,beta-unsaturated carbonyl group is a prerequisite, **Carcinogenesis**, v. 23, p. 795–802, 2002.
- NAG, A. BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith Rhizome. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v. 2 p. 102-108, 2013.

NATUERVAS. Alimentos funcionais, Disponível em <<http://www.natuervas.com/index.php>>. Acesso em: 15 de maio. 2015.

NOTÍCIAS INPA. **Gengibre amargo**. Disponível em: <<http://www.as.com.com.br>> Acesso em: 15 de janeiro. 2015.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M. STAPPEN, G. V. Use the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, 453-462, 2006.

PETARD P. *Quelques plantes utiles de la Polynesie et Ra'au Tahiti*. Papeete, Haere Po no Tahiti 1876, 1986.

PHONGPAICHIT, S. et al. Evaluation of the antibacterial activities of medicinal plants widely used among AIDS patients in Thailand. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 325-334, 2006.

PINHEIRO, C.C.S. **Processo de obtenção de zerumbona isolada dos óleos essenciais das raízes de *Zingiber zerumbet* L. Smith (Zingiberaceae)**. Pedido de depósito nacional de patente PI0505343-9. Data de depósito 28/11/2005.

PINHEIRO, G.M. **Determinação e avaliação de indicadores da qualidade em farmácia magistral: preparação de cápsulas gelatinosas duras**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2008.

PINHEIRO, C.C.S. **Processo de obtenção e potencial analgésico, antiinflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtida dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae)**. 2009, 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade federal do Amazonas, Manaus- Amazonas, 2009.

RASHID, R. e PIHIE, A. The antiproliferative effects of *Zingiber zerumbet* extracts and fractions on the growth of human breast carcinoma cell lines. **Malaysian Journal of Ethnopharmacology**, v. 3, p. 45-52, 2005.

RAI, M.; CARPINELLA, C. Naturally occurring bioactive compounds. [S.I]: **Elsevier**, p. 251-268, 2006.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S. Screening of tropical medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research.*, v.9, p.571-574, 1995.

RIQUEZA NATURAL. **Benefícios do Óleo de alho em cápsulas e cru**. Disponível em: <<https://riquezanatural.com.br/blog/beneficios-do-oleo-de-alho-em-capsulas-e-cru/>>. Acesso em 20 de maio. 2015.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. 105-110, 2002.

RAUBER, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luchea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú composto®) in Wistar rats. **Scientia Veterinariae**. v. 34, p.15-21, 2006.

- ROMAY, C., ARMESTO, J., REMIREZ, D., GONZÁLEZ, R., LEDÓN, N. AND GARCÍA, I. Inflammatory. Research., v.47, p. 36-41, 1998.
- ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 344-49, 2008.
- SABU, M. Revision of the genus Zingiber in South India. **Folia Malesiana**. v. 4, p. 25-52, 2003.
- SARIS, W. H. M.; VERSCHUREN, P. M., HARRIS. **Functional Foods: scientific and Global Perspectives**. British. Journal. Nutritional, Proceedings of International Syrriposium, 17- 19, October 2001, Paris, France, v. 88, suppl. 2, 2002.
- SAUDE PURA. **Alimentos Funcionais**. Disponível em: <<http://saudepura.com.br/alimentos-funcionais.html?dir=desc&limit=33&mode=list&order=name&p=2>. > Acesso em 19 de maio. 2015.
- SELEÇÕES READER'S DIGEST. *Ervas que curam*. Ed. Reader's Digest Brasil Ltda. 127 p., 2014.
- SIDAHMED, H.M.A;HASHIM, N. M.; ABDULIA, M.A.; ALI, H.M.; MOHAN, S.; ABDELWAHAB, S. L. Antisecretory, Gastroprotective, Antioxidant and Anti Helicobacter pylori Activity of Zerumbone from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. **Plos One**, v. 10, p. 1- 21, 2015.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and nutrition**, v. 33, p. 501-547,1993.
- SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M; F. CAMARA, C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 35-38, 2007.
- SIMÕES, C.M; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. MELLO, J.C.; MENTZ , L.A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora UFRG, p. 657-683, 2004.
- SIQUEIRA, M. J.; BOMM, D.M.; PEREIRA, G. F. N.; GARCEZ, S. W.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unopsis lindmanii*-Amonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**. V. 21, p. 557-559, 1998.
- SREEVANI KH, PURANAİK GSJ, NAIDU MM. Studies on antioxidant activity of *Zingiber zerumbet* spent and its constituents through *in vitro* models. **WJFT**. v.1, p.48-55, 2013.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, p. 127-135, 2003.

SOMCHIT, M. N.; SHUKRYAH, M. H. N.; BUSTAMAM, A. A.; ZURAINI, A. Anti-pyretic and analgesic activity of *Zingiber zerumbet*. **International Journal of Pharmacology**. V. 1, p. 277-280, 2005.

SOMCHIT, M. et al. Zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet* inhibits inflammation and pain in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, p. 177-180, 2012.

STRINGHETA, P.C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 43, n. 2, abr./jun.: 181-194, 2007.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; DENEV, P.; GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 764-770, 2007.

SULAMAIN, M. R. et al. Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. **Fitoterapia**, v.80, p.230-232, 2009.

SULAMAIN, M. R.; TENGKU MOHAMAD, T.T.A. S.; SHAIK MOSSADEQ S.W. M. Antinociceptive activity of the essential oil of *Zingiber zerumbet*. **Planta Medica**, v.76, p. 107-112, 2010.

TAN S. et al. Screening of selected Zingiberaceae extracts for dengue-2 virus protease inhibitory activities. **Sunway Academy Journal**, v.3, p. 1-7, 2006.

TANSIMA, Y.; GOLAM, K.; SHAKAWAT, H.; RASIDA, P.; FARJANA, N. Nikkon. Nutritional values of lesser utilized aromatic medicinal plants. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 76-79, 2011.

USTUN, O. OZÇELIK, B.; AKYON, Y.; ABBASOGLU, U.; YESILADA, E. Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 457-461, 2006.

UTYAMA, I.K.A et al. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia IV**, p. 202-207, 2007.

VARIER, N. S. "Chemical examination of the rhizomes of *Zingiber zerumbet*, Smith," **Proceedings of the Indian Academy of Sciences A**. v. 20, p. 257-260, 1944.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VORAVUTHIKUNCHAI, S. P.; PHONGPAICHIT S.; SUBHADHIRASAKUL S., Evaluation of antibacterial activities of medicinal plants widely used among AIDS patients in Thailand. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 8, p. 701-706, 2005.

WHITTLE, B.A. A kinin as mediator of chemically induced pain. **Biochemistry Pharmaceutical**, v.12, p.17, 1963.

YOB, N. et al. *Zingiber zerumbet* (L.) Smith: a review of its ethnomedicinal, chemical, and pharmacological uses. **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**. v. 2011, p. 12, 2011.

YU, F.; HARADA, K.; YAMASAKI. Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. **FEBS Letters**, v. 582, p. 565-572, 2008.

ZAKARIA, A. A.; MOHAMAD, A. S.; CHEAR, C. T.; WONG, Y. Y.; WONG, D. A.; SULAMAIN, M. R. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Zingiber zerumbet* methanol extract in experimental model system. **Medical Principles and Practice**, v, 19, p. 287- 294, 2010.

ZAKARIA, Z.A. et al. Preliminary analysis of the anti-inflammatory activity of essential oils of *Zingiber zerumbet*. **Biological Research for Nursing**, v.13, p.425-32, 2011.

