

Campus
Realengo

Curso de graduação
em Farmácia

Caio Soares
Queiroz

Avaliação da qualidade de uma amostra comercial de gengibre (*Zingiber officinalis*), através do isolamento e identificação de metabólitos bioativos majoritários.

Rio de Janeiro
2020

CAIO SOARES QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE UMA AMOSTRA COMERCIAL
DE GENGIBRE (*ZINGIBER OFFICINALIS*), ATRAVÉS DO
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS
BIOATIVOS MAJORITÁRIOS.**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à coordenação do Curso
de Farmácia, como cumprimento parcial
das exigências para conclusão do
curso.

Orientador: Prof. O Dr. Murilo Marinho
Carvalho Lima.

Rio de Janeiro
2020

Caio Soares Queiroz

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE UMA AMOSTRA COMERCIAL DE
GENGIBRE (*ZINGIBER OFFICINALIS*), ATRAVÉS DO ISOLAMENTO E
IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS MAJORITÁRIOS.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à coordenação do Curso
de Farmácia, como cumprimento parcial
das exigências para conclusão do curso.

Orientador: Prof^a. O Dr. Murilo Marinho Carvalho Lima

Aprovada em: 23/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Murilo Marinho Carvalho Lima
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
(IFRJ)

Prof. Dra. Aline Damico de Azevedo – (membro interno)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
(IFRJ)

Prof. Dr. Eduardo Costa Pinto – (membro interno)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
(IFRJ)

Rio de Janeiro
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Alane Elias Souza

Bibliotecária - CRB 7 n° 6321

C135

Queiroz, Caio Soares.

Avaliação da qualidade de uma amostra de gengibre (*Zingiber Officinalis*), através do isolamento e identificação de metabólitos bioativos majoritários. / Caio Soares Queiroz, 2020.

28f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

Orientador: Murilo Marinho de Castro Lima.

1. *Zingiber officinalis*. 2. Capesina K. 3. Gengibre. 4. Bioatividade.
I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Lima, Murilo Marinho de Castro. III. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

Queiroz, Caio Soares. Avaliação da qualidade de uma amostra comercial de gengibre (*Zingiber officinalis*), através do isolamento e identificação de metabólitos bioativos majoritários. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia). Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2020.

RESUMO

O presente estudo traz uma análise da qualidade de uma amostra comercial do gengibre (*Zingiber officinalis*) com relação à presença de substâncias bioativas, onde foi usado uma amostra simples de gengibre em pó obtida comercialmente. Esta amostra foi submetida à maceração com *N-Hexano* para extração dos metabólitos majoritários presentes na amostra. O extrato n-hexânico foi submetido a processos sucessivos de purificação através da Cromatografia em Coluna, utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada e aquelas que se apresentaram puras foram submetidas a análises por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e Espectrometria de Massas, sendo possível assim identificar a presença dos metabólitos 8-gingerol, 10-gingerol, zingerona, paradol e a mistura dos fitoesteróis Beta-sitosterol e Estigmasterol. As substâncias isoladas, com exceção dos fitoesteróis, apresentam significantes atividades biológicas, tendo como principal a inibição da enzima Catepsina K, relacionado ao tratamento de doenças como artrite e artrose, algumas dessas substâncias também auxiliam no controle de peso e possuem efeitos antioxidantes, além de tratar de doenças antiinflamatórias e alguns tipos de tumores também, levando a conclusão que a nossa amostra comercial encontrada de forma simples para venda e consumo, possui uma qualidade muito interessante se usada de forma correta para o tratamento de várias doenças relevantes na sociedade.

Palavras Chave: *Zingiber officinalis*, Catepsina K, Gengibre, Tratamentos naturais e Bioatividade.

Queiroz, Caio Soares. Quality evaluation of a commercial sample of ginger (*Zingiber officinalis*), through the isolation and identification of bioactive metabolites majority. Final Course Paper (Bachelor of Pharmacy). Rio de Janeiro: Faculty of Pharmacy of the Federal Institute of Science and Technology of Rio de Janeiro, 2020.

ABSTRACT

The present study presents an analysis of the quality of a commercial sample of ginger (*Zingiber officinalis*) in relation to the presence of bioactive substances, where a simple powdered ginger sample obtained commercially was used. This sample was submitted to maceration with N-Hexane to extract the major metabolites present in the sample. The n-hexane extract was subjected to successive purification processes through Column Chromatography, using the solvents hexane, ethyl acetate and methanol in increasing order of polarity. The fractions obtained were analyzed by Thin Layer Chromatography and those that were pure were subjected to analysis by ¹H Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry, making it possible to identify the presence of the metabolites 8-gingerol, 10-gingerol, zingerone, paradol and the mixture of phytosterols Beta-sitosterol and Stigmasterol. The isolated substances, with the exception of phytosterols, have significant biological activities, with the main inhibition of the enzyme Cathepsin K, related to the treatment of diseases such as arthritis and arthrosis, some of these substances also help in weight control and have antioxidant effects, in addition to treat anti-inflammatory diseases and some types of tumors as well, leading to the conclusion that our commercial sample found in a simple way for sale and consumption, has a very interesting quality if used correctly for the treatment of various diseases relevant in society.

Keywords: *Zingiber officinalis*, Cathepsin K, Ginger, Natural treatments, Separation, Identification and Bioactivity

LISTA DE SIGLAS

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

AINES Antiinflamatórios não esteroidais

COX-2 Ciclooxygenase-2

FDA Food and Drug Administration

DMARDS Disease-modifying antirheumatic drugs

HFD Dieta rica em gordura

TAS Antioxidantes totais

TNF- α Fatores de Necrose Tumoral Alfa

AcOEt Acetato de etila

CC Cromatografia em Coluna de sílica gel

CCD Cromatografia em Camada Delgada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estruturas majoritárias dos gingeróis e do shogaóis. - 10
- Figura 2: Cromatografia em coluna - 16
- Figura 3: ZOHC 12 a 15 na CCD - 17
- Figura 4: ZOHC 13 a 15, frações 4, 5 e 6 - 18
- Figura 5: ZOHC 13 a 15, frações 7 e 8 - 18
- Figura 6: Estruturas do 8-gingerol e 10-gingerol. - 20
- Figura 7: Espectro de RMN de ^1H de ZOHC-13-15-7 (CDCl_3 , 400 MHz). - 21
- Figura 8: Espectro de Massas de ZOHC-13-15-7 (IE, 70 eV). - 21
- Figura 9: Espectro de RMN de ^1H de ZOHC-13-15-8 (CDCl_3 , 400 MHz). - 21
- Figura 10: Espectro de Massas de ZOHC 13-15-8 (ESI, modo positivo). - 22
- Figura 11: Estrutura da Zingerona. - 22
- Figura 12: Espectro de RMN de ^1H de ZOCH-13-15-6 (CDCl_3 , 400 MHz). - 23
- Figura 13: Espectro de massas da fração ZOCH-13-15-6 (IE, 70 eV). - 23
- Figura 14: Estrutura do 6-paradol. - 24
- Figura 15: Espectro de RMN de ^1H de ZHO12-5 (CDCl_3 , 400 MHz). - 24
- Figura 16: Espectro de massas da fração ZOHC 12-5 (IE, 70 eV). - 25
- Figura 17: Espectro de RMN de ^1H da mistura de fitoesteróides (ZOH-4). - 26

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Taxonomia do *Zingiber Officinális* - 9

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 DESENVOLVIMENTO	
3.1 – METODOLOGIA	15
3.12 - Análise fitoquímica da amostra comercial de gengibre	15
3.13 – Materiais e Métodos	18
3.13.1 Maceração	18
3.13.2 Separações cromatográficas	19
3.14 Análises por cromatografia em camada delgada	19
3.14.1 Métodos de determinação estrutural	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4.1 Identificação dos gingeróis (8-gingerol e 10-gingerol)	19
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ZINGERONA (ZOHC-13-15-6)	22
4.3 Identificação do 6-PARADOL	24
4.4 Identificação dos fitoesteróis	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

O *Zingiber officinale* é uma erva rizomática, originária dos países do sudeste asiático e do arquipélago malaio, é conhecida popularmente como gengibre, sendo de fácil cultivo em países com clima tropical e subtropical. No Brasil é facilmente encontrado na faixa litorânea que vai do Espírito Santo até Santa Catarina, muito pelo clima e solo quente. (DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. C., 2004; NEGRELLE, R.R.B.; ELPO, E.R.S.; RÜCKER, N.G.A., 2005).

O gênero *Zingiber*, possui cerca de 200 espécies ao redor do mundo, sendo que no Brasil as duas principais encontradas são o *Z. zerumbet* e o *Z. officinale* (a classificação taxonômica encontra-se no quadro 1), sendo que o *Z. officinale* é o maior alvo de pesquisas e consumo no Brasil. O gengibre é consumido na forma fresca, seca ou em conserva e encontrado também como fitoterápico em diferentes formas farmacêuticas como pastilha, xarope ou cápsula. (JEONG *et al.*, 2003)

Quadro 1 - Taxonomia do *Zingiber Officinale*.

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Zingiberales
Família	Zingiberaceae
Gênero	Zingiber

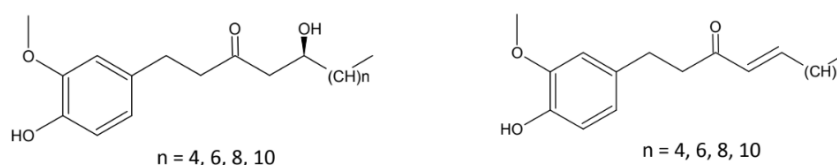
Fonte: www.cria.org.br

A espécie possui um perfil químico amplo, já que diversas substâncias já foram isoladas e identificadas dos rizomas de *Z. officinale*, sendo os compostos majoritários são os monoterpenos e os sesquiterpenos encontrados no óleo

essencial e nos derivados fenólicos encontrados na sua oleoresina. Desses derivados fenólicos estão principalmente os gingeróis e os shogaios, que são responsáveis pelo sabor pungente do gengibre e também de muitas das suas propriedades biológicas, especialmente o gingerol. (PUENGPHEAN ; SIRICHOTE, 2008).

Os gingeróis mais abundantes nesta espécie, são o 6 e o 10-gingerol, que constituem uma série homóloga, diferindo-se apenas no tamanho de sua cadeia hidrocarbônica por dois carbonos (ZHANG *et al.*, 1994; HE *et al.*, 1998). Alguns produtos de degradação dos gingeróis, os shogaios, podem ser encontrados em maior quantidade nos rizomas do gengibre seco, devido ao processamento térmico ao qual os rizomas do gengibre são submetidos. Estes, por sua vez, são mais pungentes que os gingeróis. Dentre os shogaios, o 6-shogaol é o mais abundante, gerado pela desidratação do 6-gingerol, o principal gingerol encontrado no vegetal. As estruturas químicas dos diversos gingeróis e shogaios podem ser observadas respectivamente na figura 1 a seguir (ALI *et al.*, 2008; PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. S., 2008).

Figura 1- Estruturas majoritárias dos gingeróis e do shogaios (respectivamente)



Fonte: (ALI *et al.*, 2008; PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. S., 2008).

Muitas das pesquisas e estudos das substâncias isoladas do gengibre acontecem por causa da utilização desta espécie na medicina tradicional e alternativa. A utilização do gengibre como agente terapêutico é relatada desde milhares de anos, em diversos países asiáticos, revelados por documentos encontrados, escritos em sânscrito, e em chinês, tão bem como pela literatura romana, grega e árabe (ZICK *et al.*, 2008). Existe um grande número de enfermidades que são tratadas utilizando o gengibre, principalmente em países

asiáticos, como: artrite, reumatismo, câimbra, distensões e dores musculares, problemas de garganta, constipação, indigestão, vômito, hipertensão, demência, febre, doenças infecciosas e verminoses (ALI *et al.*, 2008).

Dentre as principais ações farmacológicas comprovadas cientificamente, está a anti-inflamatória, que é muito importante no tratamento de doenças osteoarticulares (FUNK *et al.*, 2009; HENROTIN *et al.*, 2010; DUGASANI *et al.*, 2010), e essa ação é proveniente dos inibidores de captesina K. A catepsina K é a protease com maior atividade colagenolítica, pois hidrolisa de forma eficiente o maior componente orgânico da matriz óssea e do tecido cartilaginoso articular, o colágeno tipo I e o colágeno tipo II, respectivamente (ADKISON *et al.*, 2006). Esse conhecimento foi possível através de um estudo com a catepsina K que foi iniciado após a descoberta de que sua forma inativa está associada com uma desordem genética óssea, denominada picnodisostose. Esta evidência validou a catepsina K como um alvo terapêutico em doenças caracterizadas por reabsorção óssea (MCGRATH, 1999).

Recentemente também foi comprovado a partir de um estudo de pesquisadores da UFSCar, que o 10-gingerol, além de conseguir inibir o crescimento do tumor primário de mama, também mostrou-se efetivo inibindo metástases pulmonares, ósseas e cerebrais. (MARTIN, 2015).

Este estudo tem uma relevância importante já que o gengibre tem um uso terapêutico bastante vasto, sendo usado para o tratamento de várias doenças que ainda não tem uma cura concreta ou que atualmente possuem tratamentos agressivos, como as doenças osteoarticulares (artrite e artrose). Uma vez que têm publicações na literatura apontando a potencial atividade do 10-gingerol a inibição da captesina K, é importante verificar a presença de 10-gingerol em amostras comerciais de gengibre, a fim de se buscar alternativas naturais e de fácil acesso para o tratamento de doenças osteoarticulares.

Há que se considerar ainda que os medicamentos mais utilizados hoje são os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), porém eles apresentam grandes reações adversas tais como a propensão a causar úlcera gástrica, perfurações e hemorragias gastrointestinais. (AHMED *et al.*, 2005).

Ainda sobre os AINES, inibidores específicos da COX-2, foram desenvolvidos medicamentos com eficácias similares e com maior segurança em relação à toxicidade gastrointestinal, porém alguns desses inibidores foram retirados do mercado nos Estados Unidos, pela “Food and Drug Administration” (FDA), por apresentarem risco de derrame e ataque cardíaco com o uso prolongado. Recentemente, tem sido sugerido o uso de fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARDS: “disease-modifying antirheumatic drugs”), porém eles também apresentam limitações devido às suas reações adversas e pelo elevado custo em comparação aos AINES (AHMED *et al.*, 2005).

Além do mais, existem também pesquisas promissoras em relação ao tratamento do câncer a partir do gengibre e de metabólitos do gengibre, principalmente em relação às metástases, sendo que o câncer possui hoje em dia tratamentos bem agressivos como a quimioterapia e a radioterapia, por isso é importante buscar tratamentos alternativos menos agressivos. E como existe um grande consumo de gengibre no Brasil e no mundo, por ser de fácil cultivo e acesso a população, é conveniente saber se amostras de gengibre comercial contém realmente esses compostos bioativos. (MARTIN, 2015).

Recentemente, tem ocorrido um interesse crescente na exploração do potencial de fitoquímicos, alimentos e bebidas derivados de plantas para restaurar o equilíbrio metabólico. O uso de materiais naturais como o gengibre tem sido considerado uma ferramenta eficaz para o controle da obesidade. O gengibre demonstrou os efeitos anti-obesidade mais significativos em estudos *in vivo* e *in vitro* (WANG *et al.*, 2017). Isso foi atribuído ao fato de que o gengibre parece afetar o peso corporal e o arranjo de gordura por meio de três instrumentos dignos de nota: produção de calor, aumento da degradação da gordura no tecido adiposo e redução da absorção de gordura alimentar no intestino (EBRAHIMZADEH ATTARI *et al.*, 2016).

Foi observado em alguns estudos que a administração oral de extrato de gengibre reduz significativamente o peso corporal e os níveis de lipídios séricos em ratos alimentados com dieta rica em gordura. Além disso, foi descoberto que o extrato de gengibre atenuou a obesidade induzida por dieta

rica em gordura (HFD), aumentando o catabolismo da gordura do músculo esquelético e o gasto de energia (MISAWA *et al.*, 2015).

Dois estudos recentes que foram feitos em ratos, trazem embasamento para o fato que o gengibre pode sim também ser usado para diminuir os danos de uma dieta rica em gorduras, evitando problemas hepáticos, renais e de ganho de peso.

Um dos estudos feito em conjunto pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e o Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa com a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Este estudo investigou a capacidade de formulação contendo *Zingiber officinale* (gengibre) para reverter as alterações na saúde promovidas por dieta não saudável em ratos Wistar. Cinco compostos da família do gingerol e três da família do shogaol foram identificados nas análises cromatográficas do extrato. Os animais foram alimentados com uma combinação de alimentos não saudáveis, a dieta de cafeteria, que promoveu aumento do peso corporal, área do núcleo do hepatócito, área total do hepatócito e acúmulo de gordura no fígado, além de redução da concentração de glutathione S-transferase hepática, em comparação ao grupo controle, que recebeu ração comercial. (LEAL *et al.*, 2019)

O tratamento com gengibre melhorou todos esses resultados, destacando a redução de 10% do peso corporal e de 66% da área total de gotículas lipídicas depositadas, em comparação ao grupo que recebeu dieta cafeteria. Os tratamentos de gengibre também atenuaram a peroxidação lipídica, com uma redução média de 41% nos níveis de malondialdeído e um aumento médio de 222% na atividade da glutathione S-transferase no fígado. (LEAL *et al.*, 2019)

A dieta da cafeteria e o extrato de gengibre não promoveram mudanças significativas no perfil glicêmico e lipídico, no peso do fígado e nas enzimas hepáticas em comparação ao grupo controle. Sugerimos que o gengibre pode ter efeitos benéficos nas complicações de saúde associadas à dieta pouco saudável, como adiposidade excessiva, estresse oxidativo e lesão hepática. (LEAL *et al.*, 2019)

O outro estudo que embasa essa questão foi realizado em conjunto pelo Departamento de Biologia da Universidade Princess Nourah bint Abdulrahman, Riade, Arábia Saudita; Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, Universidade King Khalid, Arábia Saudita; Departamento de Zoologia, Faculdade de Ciências, Damanhour University, Egito; Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade King Khalid, Abha, Arábia Saudita.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do *Zingiber officinale* contra as complicações da obesidade induzidas por uma dieta hiperlipídica e causadora de disfunções renais. O período de estudo foi de dois meses, e os grupos de animais experimentais foram quatro, 80 ratos Wistar foram apropriados da mesma forma 20 animais por grupo: grupo controle; grupo extrato de gengibre (GE); dieta rica em gordura (HFD); e grupo GE + HFD. Foram investigados peso corporal e de gordura, creatinina, leptina, TNF- α , antioxidantes totais, histopatológico renal e ultraestrutura. Os ratos do grupo de HFD mostraram um aumento significativo ($P < 0.05$) nos pesos corporais e gordurosos, creatinina, leptina e TNF- α , e diminuição significativa ($P < 0,05$) nos antioxidantes totais (TAS).

A administração de gengibre mostrou significativamente a proteção restaurando os parâmetros alterados. Além disso, ratos co-tratados com extrato de gengibre melhoraram a lesão renal histopatológica e ultraestrutural induzida pela obesidade. O estudo concluiu que o extrato de gengibre usado pode suprimir e diminuir o dano renal induzido pela dieta rica em gordura, pois possui valores medicinais potenciais. (BIN-MEFERIJ *et al.*, 2019)

Com todos esses estudos sobre as propriedades do gengibre, podemos concluir que é muito importante que se pesquise cada vez mais sobre esse rizoma, que é muito versátil e útil para a medicina e pesquisas biológicas em geral, podendo ajudar no tratamento de diversas doenças de forma menos nociva e benéfica para a saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a qualidade de uma amostra comercial de gengibre (*Zingiber officinalis*) a partir de isolamento e identificação estrutural de metabólitos secundários bioativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato rico em metabólitos secundários bioativos de uma amostra comercial de gengibre (*Zingiber officinalis*);
- Isolar metabólitos secundários bioativos majoritários do extrato obtido, utilizando técnicas cromatográficas usuais de purificação;
- Identificar as estruturas metabólitos secundários isolados através da análise e interpretação dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , e também com o uso da espectrometria de massas.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 – METODOLOGIA

3.1.2 - Análise fitoquímica da amostra comercial de gengibre

Uma amostra comercial de gengibre em pó (200 g) foi submetida à extração e maceração com n-hexano por três vezes, com intervalo de 48 horas. O solvente utilizado tinha, portanto, o objetivo de extrair os metabólitos do gengibre. Após o processo de maceração exaustiva em n-hexano, a fase líquida foi filtrada e submetida à concentração sob pressão reduzida em rota-evaporador rotatório para fornecer o extrato hexânico.

A fase hexânica contendo os metabólitos da amostra de gengibre foi submetida a purificação por Cromatografia em Coluna de sílica gel (CC), utilizando-se hexano e acetato de etila (AcOEt) como sistema eluente, em ordem crescente de polaridade e metanol para finalizar a coluna. As proporções utilizadas do sistema hexano: AcOEt foram (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 100% acetato de etila, 100% de metanol).

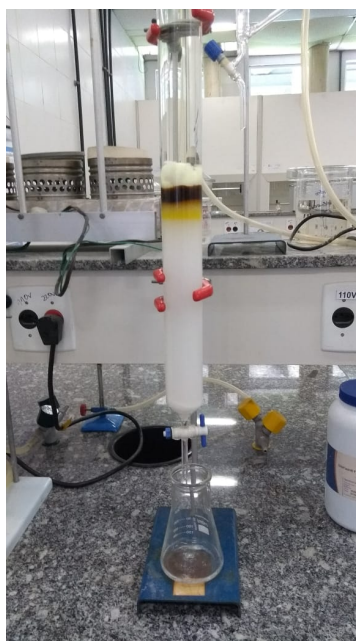


Figura 2. Cromatografia em coluna.

As frações obtidas a partir de CC do extrato hexânico foram analisadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), sendo empregadas cromatoplasmas de gel de sílica 60 F254 com 0,2mm de espessura (Merck). Para a eluição foram utilizados diversos solventes puros ou misturas entre dois deles para obter soluções com polaridades intermediárias aos utilizados. As cromatoplasmas analíticas foram reveladas por exposição à luz ultravioleta nos comprimentos de onda (λ) 254 nm e 365 nm, utilizando-se Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF260C.

Após a análise do perfil cromatográfico das sub-frações do extrato hexânico por CCD, verificou-se algumas semelhanças de perfil de eluição e idênticos RFs, assim, foram definidos os novos processos de purificação. Nessa primeira CC no sistema Hexano/Acetato de etila 8:2 e 7:3 foram obtidas

18 amostras com cores visíveis a olho nú, estas amostras também foram analisadas por CCD para avaliar o perfil de semelhança.

A partir da análise de CCD foram separados dois grupos para realizar duas novas colunas cromatográficas, este denominados de ZOHC 11 e 12, e a ZOHC 13, 14 e 15, já que foram a que apresentaram melhores resultados de separação e similaridade dos compostos.

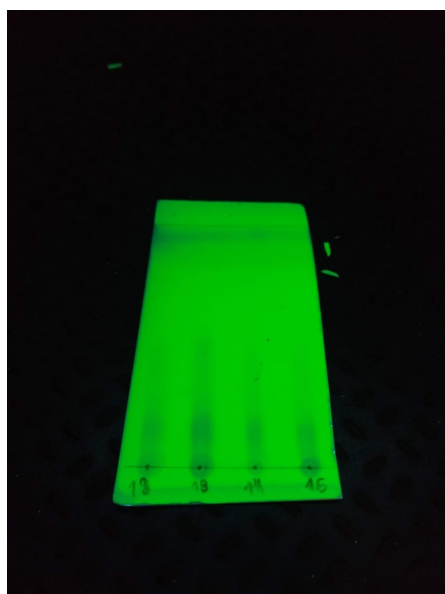


Figura 3 - ZOHC 12 a 15 na CCD.

A partir da CC de ZOHC 11 e 12, foram retiradas 8 amostras, onde usamos um sistema 8:2 e 7:3 de Hexano: Acetato de Etila, finalizando em etanol. Essas amostras foram submetidas a análise de CCD.

A fração ZOHC 13 – 15 foi submetida a CC de sílica gel, utilizando-se como eluentes a mistura de hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, sendo obtidas 9 sub-frações entre os sistemas 8:2 e 7:3 de Hexano/Acetato de Etila, essas amostras foram submetidas à CCD onde observou-se uma mancha homogênea entre as frações 4, 5 e 6, que foram reunidas para análise por RMN de ^1H .

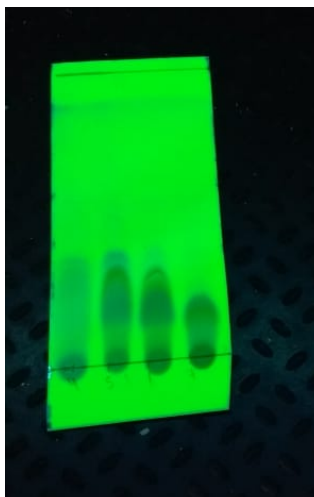


Figura 4 - ZOHC 13-15: 4, 5 e 6

As frações 7 e 8 também foram reunidas pelo seu perfil parecido, a identificação dos compostos isolados da amostra de gengibre foi realizada através de RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

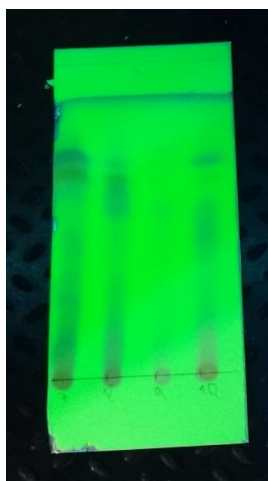


Figura 5 - ZOHC 13-15: 7 e 8

3.13 – Materiais e Métodos

3.13.1 Maceração

A maceração do material comercial em pó foi realizada em N-Hexano P. A. da marca Vetec. Para a concentração de frações líquidas foi utilizado rota evaporador rotatório sob pressão reduzida da marca BUCHI.

3.13.2 Separações cromatográficas

Para a purificação das substâncias foi utilizada a cromatografia por adsorção em coluna de vidro (CC) utilizando-se como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh da ACROS ORGANIC e os solventes hexano, acetato de etila e metanol da marca Vetec.

3.14 Análises por cromatografia em camada delgada

Para as análises em CCD foram utilizadas folhas de alumínio com sílica gel 60 F254, com 0,2 mm de espessura da Merck. Como reveladores foram utilizados luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, utilizando-se Cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C.

3.14.1 Métodos de determinação estrutural

Foram utilizados os seguintes métodos para determinação estrutural das substâncias isoladas:

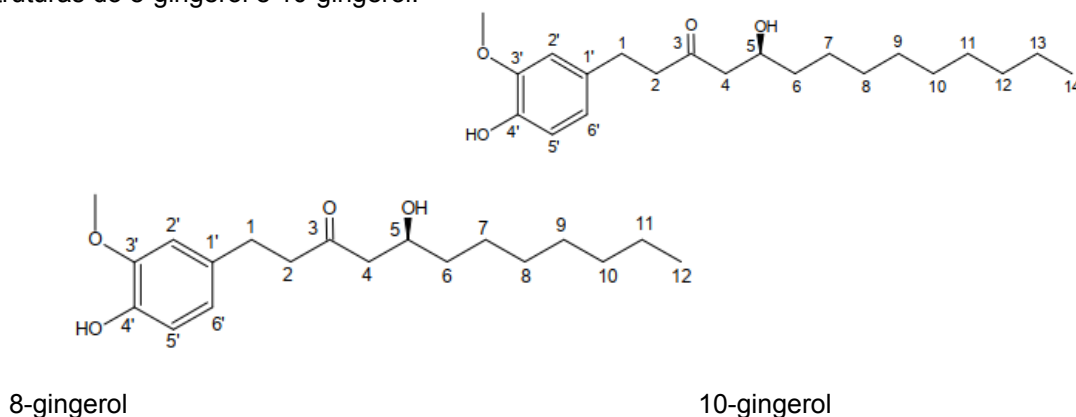
i. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D)

Para as análises de RMN substâncias puras ou em mistura foram solubilizadas em solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, com % de deutério de 99,8% para CDCl_3 . Foram utilizados espectrômetros de RMN do DQ/UFSCAR: Bruker DRX 9,8 T (400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C) e AVANCE III 400 NANO Varian 9,4 T (400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz para RMN de ^{13}C).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação dos gingeróis (8-gingerol e 10-gingerol)

Figura 6. Estruturas do 8-gingerol e 10-gingerol.



Os espectros de RMN de ^1H de ZOHC-13-15-7 e ZOHC-13-15-8 apresentaram grande semelhança em seus sinais, permitindo identificar diferença apenas na integração do sinal de multipeto em 1,25 ppm referente aos hidrogênios metilênicos. Ambos os espectros apresentaram sinais de três hidrogênios aromáticos, sendo um dupeto com constante de acoplamento em orto em aproximadamente 6,79 ppm, um duplo dupeto com constantes de orto e meta em 6,65ppm e um dupeto com constante de acoplamento em meta em 6,60 ppm, caracterizando-se assim um sistema aromático substituído nas posições 1,3 e 4.

Observou-se ainda neste espectro um sinal de simpleto em 3,87 ppm, integrando para 3 hidrogênios, sugerindo uma metoxila como substituinte do anel aromático. Um sinal de hidrogênio oxi-metínico (H-5) foi observado em 4,00 ppm (integração para 1 hidrogênio), sinais de hidrogênios alfa-beta carbonílicos na faixa de 2,4– 2,50 ppm e 2,50 – 2,70 ppm, e um sinal de tripleto de metila 0,85. A análise destes dados em comparação com a literatura (ALI et al., 2008), permitiram a identificação do gingerol nas frações ZOHC-13-15-7 e ZOHC-13-15-8, sendo portanto lançado mão da espectrometria de massas para determinar o número de CH_2 na estrutura.

O espectro de massas (impacto de elétrons) de ZOHC-13-15-7 apresentou pico do íon molecular em m/z 322, indicando tratar-se do 8-gingerol, enquanto que o espectro de massas (eletrospray, modo positivo) de ZOHC-13-15-8 apresentou pico do íon *pseudomolecular* em 351 ($M + H$), sendo portanto identificado como o 10-gingerol.

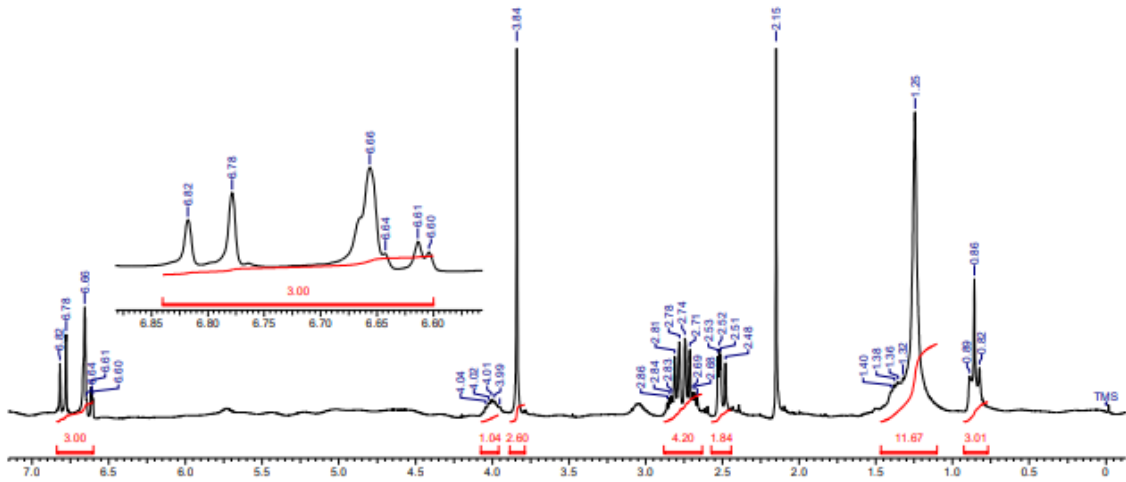
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de ZOHC-13-15-7 (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 8. Espectro de Massas de ZOHC-13-15-7 (IE, 70 eV)

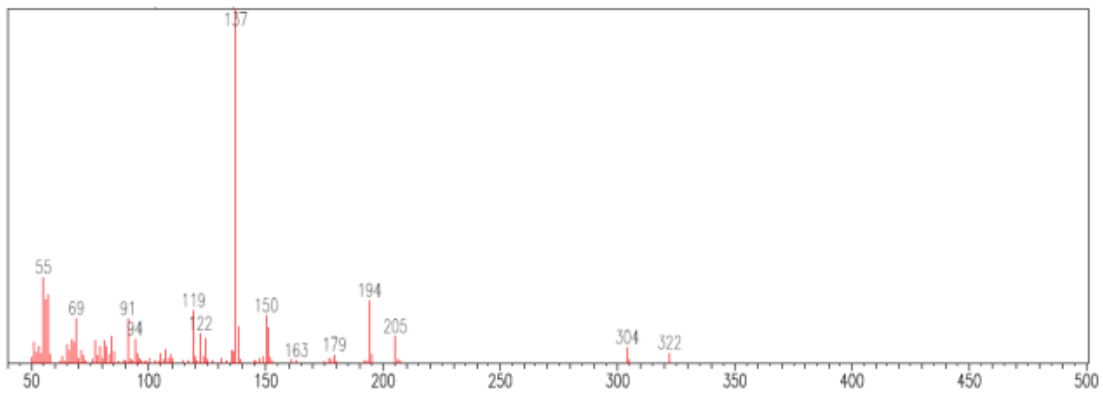
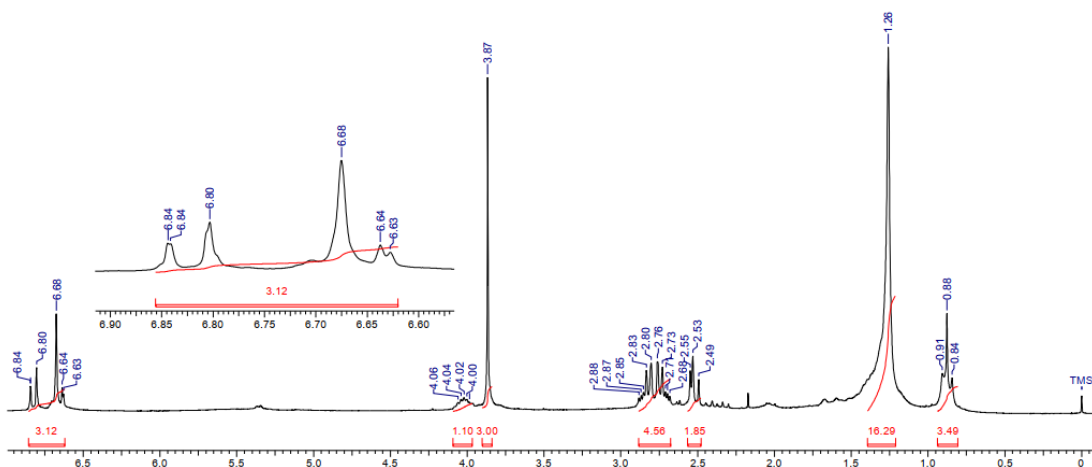
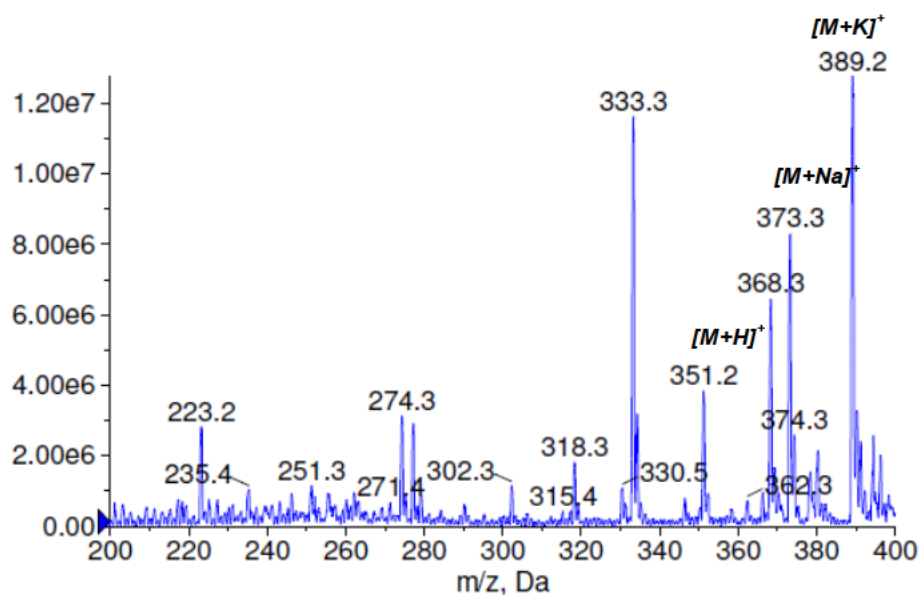
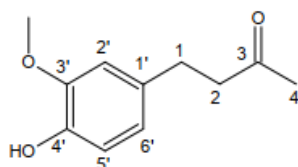
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H de ZOHC-13-15-8 (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 10. Espectro de Massas de ZOHC 13-15-8 (ESI, modo positivo)



4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ZINGERONA (ZOHC-13-15-6)

Figura 11. Estrutura da Zingerona



O espectro de RMN de ^1H da fração ZOHC-13-15-6 apresentou sinais de três hidrogênios aromáticos, sendo um duplete com constante de acoplamento em orto em aproximadamente 6,79 ppm, um duplo duplete com constantes de orto e meta em 6,65 ppm e um duplete com constante de acoplamento em meta em 6,60 ppm, caracterizando-se assim um sistema aromático substituído nas posições 1,3 e 4, assim como ocorre na estrutura dos gingeróis.

O espectro de RMN de ^1H desta fração apresentou ainda um simpleto integrando para 3 hidrogênios em 3,87 ppm, caracterizando a presença de um

substituinte metoxila e um sinal de simpleto integrando para três hidrogênios em 2,14 ppm, sendo este característico de uma metila ligada a carbonila. Por fim, observou-se ainda um sinal de multiplete entre 2,5 – 2,80 ppm, integrando para quatro hidrogênios, caracterizando assim dois grupos CH₂ alfa-beta carbonila.

A comparação dos dados espectrais obtidos com a literatura (JALAD et al., 2005) permitiram a identificação inequívoca da zingerona, confirmada por espectrometria de massas, onde se observou o pico do íon molecular m/z 192

Figura 12. Espectro de RMN de ¹H de ZOCH-13-15-6 (CDCl₃, 400 MHz)

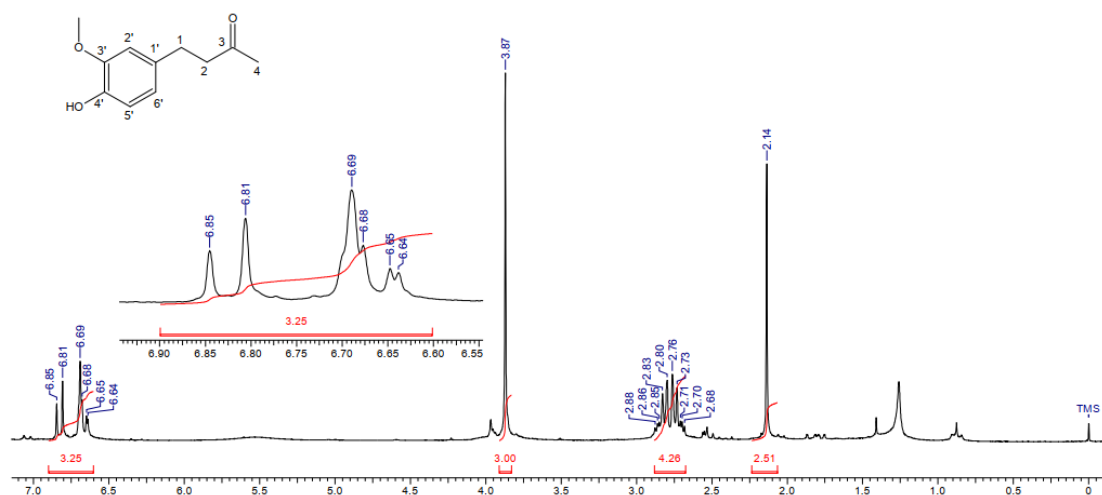
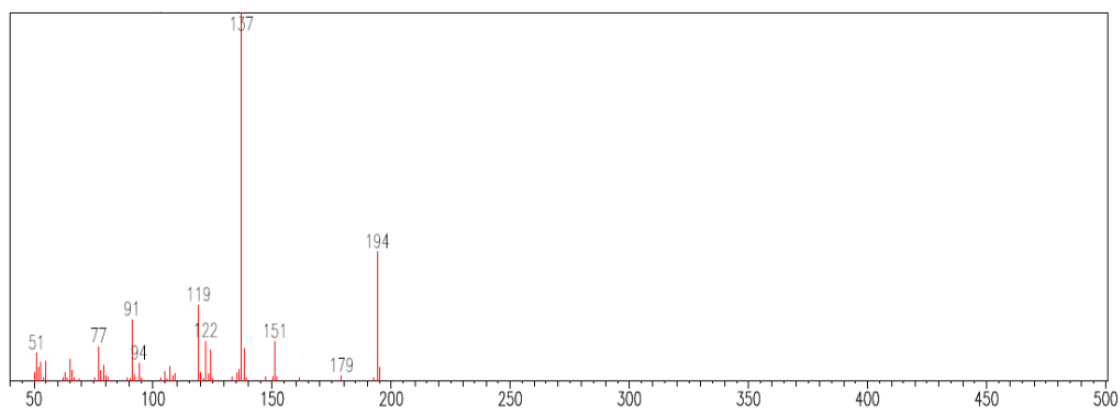
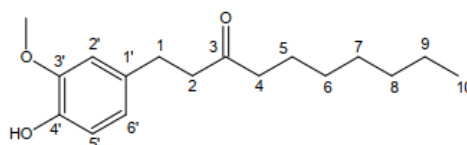


Figura 13. Espectro de massas da fração ZOCH-13-15-6 (IE, 70 eV)



4.3 Identificação do 6-PARADOL

Figura 14. Estrutura do 6-paradol



O espectro de RMN de ^1H desta fração apresentou grande semelhança com o espectro da zingerona, uma vez que apresentou os mesmos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, a metoxila, os dois grupo CH_2 alfa-beta carbonila e a diferença é que na estrutura deste composto temos uma quantidade maior de grupos metilênico está com o pulmão e ele se mostrou útil. A comparação dos dados obtidos com a literatura (ALI et al., 2008) permitiram a identificação do 6-paradol.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de ZOHC 12-5 (CDCl_3 , 400 MHz)

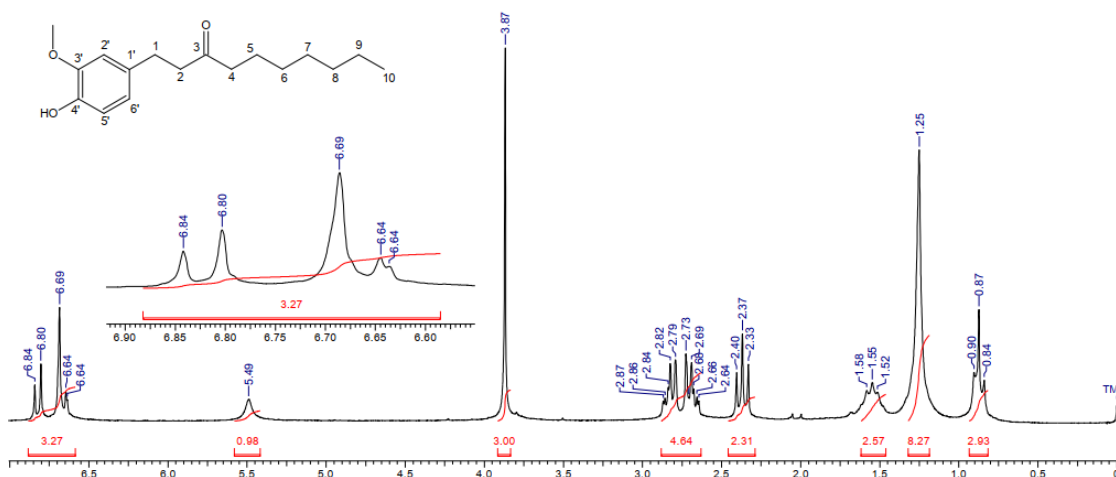
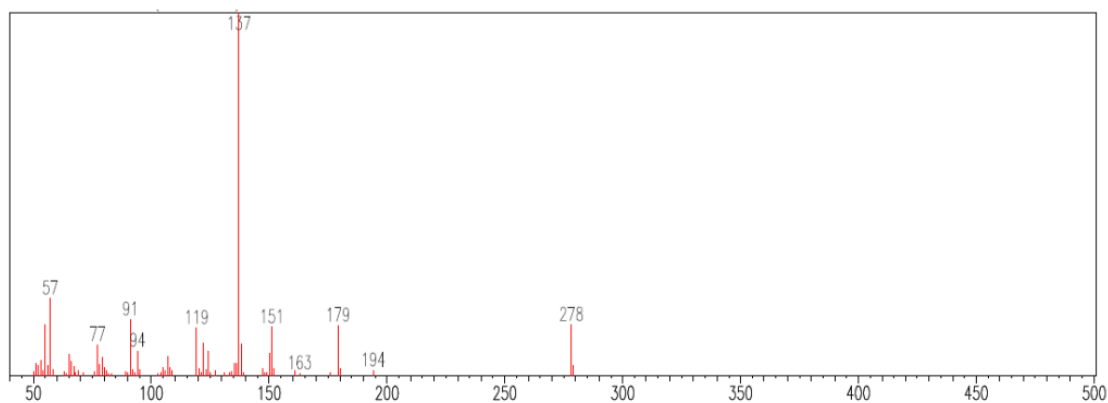


Figura 16. Espectro de massas da fração ZOHC 12-5 (IE, 70 eV)



4.4 Identificação dos fitoesteróides

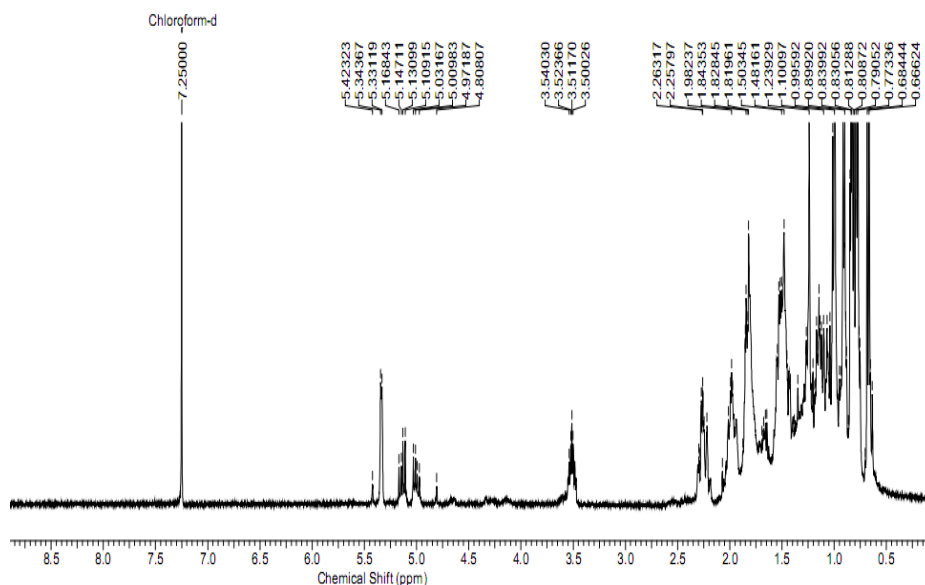
O espectro de RMN de ^1H apresentou um sinal de duplete em δ 5,35 ($J=4,8$ Hz) referente ao hidrogênio olefínico H-6 característico de esteróides, este deveria desdobrar-se num *dd* uma vez que acopla com os hidrogênios diastereotópicos H-7_{ax} e H-7_{eq}, no entanto como a diferença da constante de acoplamento de H-6 com H-7_{ax} e H-7_{eq} é muito pequena, observou-se o desdobramento de H-6 como um dublete. Observou-se ainda neste espectro um multipletto em δ 3,50 referente ao hidrogênio oxi-metínico H-3. Os demais sinais entre δ 0,70 e δ 2,20 são característicos do anel ciclopentano perhidrofenantreno, indicando que a mistura tratava-se de esteróides. Os dois multipletos em δ 5,01 e δ 5,20 sugeriram a presença de dois hidrogênios olefínicos adicionais, respectivamente H-23 e H-24.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de carbonos sp^2 em δ 121,70 e δ 140,70 referente aos carbonos C6 e C5, respectivamente, característicos do anel ciclopentano perhidrofenantreno e os sinais em δ 129,20 e δ 138,28 dos carbonos C-23 e C-22. Neste espectro o sinal observado δ 71,8 de carbono carbinólico, aliado aos sinais descritos anteriormente sugeriu a presença de um esteróide do tipo Estigmast-5,22-dien-3- β -ol, com a hidroxila em C-3 orientada no plano equatorial.

A mistura dos esteróides foi sugerida uma vez que os sinais dos carbonos C-5 e C-6 encontraram-se dobrados, além disso, foram observados mais de 29 sinais de carbono no espectro de RMN de ^{13}C .

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C da mistura foram comparados com a literatura (RICCA & NICOTRA, 1978), sendo suficientes para propor que a mistura ZOHC-04 tratava-se dos fitosteróis β -sitosterol e Estigmasterol.

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H da mistura de fitoesteróides (ZOHC-4)



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico da amostra comercial de gengibre cumpriu satisfatoriamente os objetivos previstos, possibilitando a avaliação da qualidade da amostra de gengibre estudada. Através de nosso estudo, a partir do extrato n-Hexano do gengibre comercial em pó, foram realizados experimentos comuns de separação cromatográfica por Cromatografia em Coluna de sílica gel (CC), levando ao isolamento dos metabólitos bioativos, sendo estes os gingeróis (8 e 10-gingerol), zingerona, 6-paradol e os fitoesteróis beta sitosterol e estigmasterol.

Esses resultados mostram que essa amostra comercial, encontrada de forma simples do gengibre, atinge um padrão de qualidade muito interessante, já que apresentou quantidades relevantes dessas substâncias, que possuem efeitos benéficos no tratamento de várias doenças.

A zingerona confere sabor e até aroma em alguns tipos de especiarias e óleos para perfumaria, além de possuir efeito antidiarréico e anti oxidante relevantes. O 6-paradol tem efeito antitumoral muito interessante, principalmente no caso de alguns cânceres como o de mama, que já vêm sendo estudados e testados, como no estudo citado anteriormente neste trabalho. Já os fitoesteróis tem a função de controlar o

hormônio do estresse, conhecido como cortisol, que é um dos causadores da compulsão alimentar e do acúmulo de gorduras na região do abdômen e dos açúcares no sangue, podendo ajudar no controle de peso e auxílio para manter uma dieta menos danosa.

Então, com todos esses resultados, essa amostra se mostrou muito rica em compostos bioativos importantes do gengibre, e pode ter efeitos significativos se usados de forma correta contra todos os tipos de doença listados anteriormente, principalmente na questão da Captetina K.

Essa amostra estudada apresentou quantidade de 8 e 10-gingerol bem relevante, cerca de 80 mg, o que é muito benéfico, já que o uso do gengibre como inibidor da Captetina K é o uso mais recorrente em literatura, e está estreitamente associada ao gingerol, muito disso se dá pelos seus benefícios em relação aos tratamentos tradicionais, que são muito agressivos, e pelo fato de atacar a raiz do problema na doenças osteoarticulares, que é a degeneração das cartilagens, e não a dor causada pela doença, que é o alvo dos AINEs por exemplo, além de também ser mais acessível financeiramente dos que os outros tratamentos no geral.

Com tudo isso discutido e relatado nesse trabalho, e também em muitos outros, acho importante lembrar sempre dos tratamentos naturais e alternativos, que muitas vezes são negligenciados no meio científico e da saúde no geral, para dar preferência para tratamentos focados em medicamentos de origem sintética e de grandes indústrias farmacêuticas, que também são muito importantes claramente, mas não devem ser o único meio e forma de tratamento avaliado na hora de decidir um tratamentos, então espero que cada vez mais seja divulgado e pesquisado os tratamentos naturais que forem eficazes para buscar no fim o melhor bem estar para o paciente sempre.

REFERÊNCIAS

ADKISON, K. K.; BARRETT, D. G.; DEATON, D. N.; GAMPE, R. T.; HASSEL, A. M.; LONG, S. T.; MCFADYEN, R. B.; MILLER, A. B.; MILLER, L. R.; PAYNE, J. A.; SHEWCHUK, L. M.; WELLS-KNECHT, K. J.; WILLARD-JR, D. H.; WRIGHT, L. L. **Semicarbazone-based inhibitors of cathepsin K, are they prodrugs for aldehyde inhibitors?** Bioorg. Med. Chem. Lett., v. 16, p. 978–983, 2006.

AHMED, S.; ANUNTIYO, J.; MALEMUD, C. J.; HAQQI, T. M. **Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review.** eCAM, v. 2, n. 3, p. 301-308, 2005.

ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M; O.; NEMMAR, A. **Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research.** Food Chem. Toxicol.,v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008.

BIN-MEFERIJ, M. M.; EL-KOTT, A. F.; SHATI, A. A.; EID, R. **Extrato de gengibre melhora o dano renal na obesidade induzida por dieta rica em gordura em ratos: estudo bioquímico e ultraestrutural.** 2019. International Journal of Morphology, vol.37, no.2, Temuco, 2019.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. C. **Micropropagação do gengibre (*Zingiber officinale*).** Revista Brasileira de Agrociência, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2004.

DUGASANI, S.; PICHKA, M. R.; NADARAJAH, V. D.; BALIJEPALLI, M. K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J. N. **Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol.** J. Ethnopharm., v. 127, n. 2, p. 515-520, 2010.

FUNK, J. L.; FRYE, J. B.; OYARZO, J. N.; TIMMERMANN, B. N. **Comparative effects of two gingerol-containing *Zingiber officinale* extracts on experimental rheumatoid Arthritis.** J. Nat. Prod., v. 72, n. 2, p. 403-407, 2009.

HENROTIN, Y.; CLUTTERBUCK, A. L.; ALLAWAY, D.; LODWIG, E. M.; HARRIS, P.; MATHY-HARTERT, M.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. **Biological actions of curcumin on articular chondrocytes.** Osteoarthritis Cartilage, v. 18, n. 2, p. 141-149, 2010.

HE, X-G.; BERNART, M. W.; LIAN, L-Z.; LIN, L-Z. **High-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger.** J. Chromatogr. A., v. 796, n. 2, p. 327-334, 1998.

JEONG, J. C.; KANG, S.K.; YOUN, C. H.; JEONG, C. W.; KIM, H. M.; LEE, Y. C.; CHANG, Y. C.; KIM, C. H. **Inhibition of Drynariae Rhizoma extracts on bone resorption mediated by processing of cathepsin K in cultured mouse osteoclasts**. Intern. Immunopharmacol. v. 3, n. 12, p. 1685-1697, 2003.

LEAL, D. T.; FONTES, G. G.; VILLA J. K.; FREITAS, R. B.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, C. A.; PIZZILO, V. R.; DIAZ, M. **A formulação de Zingiber officinale reduz a lesão hepática e o ganho de peso em ratos alimentados com uma dieta não saudável**. 2019. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 2019.

MARTIN, Ana Carolina Baptista Moreno. **Eficácia do [10]-gingerol contra metástases de câncer de mama: estudos in vitro e in vivo em camundongos**. 2015. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação (Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MCGRATH, M.E. **The lysosomal cysteine proteases**. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., v. 28, p. 181-204, 1999.

NEGRELLE, R.R.B.; ELPO, E.R.S.; RÜCKER, N.G.A. **Análise prospectiva do agronegócio gengibre no estado do Paraná**. Hortic. Bras., v. 23, n. 4, p. 1022-1028, 2005.

PARK, M.; BAE, J.; LEE, D. S. **Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria**. Phytother. Res., v. 22, n. 11, p. 1446-1449, 2008.

PUENGPHEAN, C.; SIRICHOTE, A. **[6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction**. As.J. Food Ag-Ind., v. 1, n. 1, p. 29-36, 2008.

RICCA, S.; NICOTRA, F. **Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some phytosterols**. *Gazeta chimica Italiana*, 108, 713, 1978.

SILVA, James 's Almada. **Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares**. 2011. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação (Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

ZICK, S. M.; DJURIC, Z.; RUFFIN, M. T.; LITZINGER, A. J.; NORMOLLE, D. P.; ALRAWI, S.; FENG, M. R.; BRENNER, D. E. **Pharmacokinetics of 6-Gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects**. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., v. 17, n. 8, p. 1930-1936, 2008.

