

CÍNTIA TARABAL OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA,
QUANTIFICAÇÃO DO 6-GINGEROL E
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GENGIBRE (*Zingiber
officinale*)

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte

2018

CÍNTIA TARABAL OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA,
QUANTIFICAÇÃO DO 6-GINGEROL E
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GENGIBRE (*Zingiber
officinale*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Raquel Linhares Bello de Araújo

Coorientadora: Prof^a Adaliene Versiani Matos
Ferreira

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2018

O48c Oliveira, Cíntia Tarabal.
Caracterização físico-química, quantificação do 6-gingerol e determinação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do gengibre (*Zingiber officinale*) / Cíntia Tarabal Oliveira. – 2018.
108 f.

Orientadora: Raquel Linhares Bello de Araújo.
Coorientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos.

1. Obesidade – Teses. 2. Inflamação – Teses. 3. Antioxidantes – Teses. 4. Antiinflamatórios – Teses. 5. Agricultura orgânica – Teses. 6. Herbáceas – Teses. 7. Alimento funcional – Teses. 8. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) – Teses. I. Araújo, Raquel Linhares Bello de. II. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.398



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DO 6-GINGEROL E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO GENGIBRE (*Zingiber officinale*)

CÍNTIA TARABAL OLIVEIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 01 de outubro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo (Orientadora e Presidente da Comissão)
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Lucilene Rezende Anastácio
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof. Dr. Júlio Onésio Ferreira Melo
UFSJ

Prof. Dr. Christian Fernandes
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Gisele Cristiane Vaz
Universidade de Itaúna

Belo Horizonte, 1 de outubro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde, por me amparar nos momentos mais difíceis e me dar força interior para a realização de mais essa etapa.

Aos meus pais Lunardy e Denise, os quais amo muito, pelo apoio e incentivo nos estudos, sendo exemplo para mim de força e determinação.

Ao Diego, pelo amor, incentivo e pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas irmãs Fabiana e Natália pelo afeto e amizade.

Meu muito obrigado à minha orientadora Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo por aceitar me orientar, pela amizade, pela paciência, pela dedicação, pelos conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira pelo incentivo, pela dedicação e ensinamentos.

Aos amigos e colegas do laboratório de Química de Alimentos/ALM/FAFAR, pelas inúmeras ajudas, conversas, risadas e, principalmente pela amizade de vocês.

Aos funcionários do laboratório de Bromatologia/ALM/FAFAR, Marcão e Ronália, por toda ajuda, pela alegria e boa vontade sempre!

Às equipes dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Microbiologia, Bioquímica de Alimentos, todos do ALM/FAFAR, ao Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, do PFA/FAFAR, ao Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB e por me ajudarem em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Christian, pela enorme disponibilidade, conhecimento e ajuda com a análise de determinação do 6-gingerol.

À minha grande amiga Aline Pinheiro Amorim por sempre me incentivar, dar conselhos e ainda grandes oportunidades.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos que contribuíram muito na minha formação acadêmica, pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

Aos funcionários do PPGCA pelo apoio e auxílio em todos os assuntos administrativos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR – UFMG), na pessoa da Coordenadora Professora Dra. Sheilla Vitorino.

Aos membros da banca, pela prontidão, gentileza, correções e sugestões.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“Avança ainda que seja por entre lágrimas. Trabalha constantemente. Edifica sempre. Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar. Age auxiliando. Serve sem apego. E assim vencerás.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. TRANSIÇÃO NUTRICIONAL	22
3.2. OBESIDADE	23
3.3. BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL	25
3.3.1. Compostos bioativos	25
3.4. GENGIBRE	28
3.4.1. Determinação de 6-gingerol	30
3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
TRABALHO EXPERIMENTAL	51
CAPÍTULO 1	52
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1. MATERIAL	55
2.2. MÉTODOS	56
2.2.1 Preparo das amostras de gengibre	56
2.2.2. Determinação físico-química	56
2.2.2.1. Composição centesimal das amostras	56
2.2.3. Atividade antioxidante e Compostos fenólicos	57

2.2.3.1. Preparo dos extratos.....	57
2.2.3.2. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS	57
2.2.3.3. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre DPPH.....	58
2.2.3.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP).....	58
2.2.3.5. Determinação do teor de Compostos Fenólicos totais.....	58
2.2.4. Otimização do método de extração do 6-gingerol.....	59
2.2.5. Quantificação do 6-gingerol	60
2.3. Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Composição centesimal	62
3.2. Teor de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante do gengibre.....	65
3.3. Otimização do método de extração para determinação de 6-gingerol	69
3.4. Quantificação e determinação do 6-gingerol	70
3.4.4. Teor de 6-gingerol	75
4. CONCLUSÃO	77
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CAPÍTULO 2	85
RESUMO	85
1. INTRODUÇÃO.....	86
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1. Estudos <i>in vivo</i>	88
2.2. Preparo da dieta rica em carboidratos.....	88
2.3. Desenho experimental.....	89
2.4. Teste de tolerância oral à glicose	91
2.5. Calorimetria indireta	91
2.6. Análise morfológica do tecido adiposo epididimal	92
2.7. Dosagens sorológicas	92
2.8. Análise de citocinas em tecido adiposo.....	93
2.9. Contagem total e diferencial de leucócitos	93
2.10. Microscopia intravital	93

2.11. Análise estatística.....	94
3. RESULTADOS.....	94
3.1. Redução da adiposidade em animais alimentados com dieta HC suplementada com gengibre.....	94
3.2. Mudança no perfil lipídico induzida pelo gengibre	96
3.3. Alterações na glicemia induzida pela dieta HC	96
3.4 Gengibre reduzindo a inflamação induzida pela dieta HC.....	98
4. DISCUSSÃO	100
5. CONCLUSÃO	102
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Codificação das amostras de gengibre em estudo, de acordo com a região e o tipo de cultivo	54
Tabela 2. Composição química em base seca das amostras de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	61
Tabela 3. Teores de fibras solúvel, insolúvel e alimentar total presentes em base seca presente nas quatro diferentes amostras de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	62
Tabela 4. Dados referentes ao estudo da linearidade das curvas de calibração	73

Capítulo 2

Tabela 1. Distribuição de macro e micronutrientes de densidade calórica (kcal/g) da dieta controle e HC	87
Tabela 2. Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida	88

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. 6-gingerol	29
----------------------------	----

Capítulo 1

Figura 1. Teor de compostos fenólicos em mg de equivalentes de ácido gálico em 100g de gengibre	64
Figura 2. Atividade antioxidante total pela captura do radical livre em ABTS	66
Figura 3. Atividade antioxidante total pelo método de Redução do Ferro (FRAP).....	67
Figura 4. Atividade antioxidante total pela captura do radical DPPH	68
Figura 5. Avaliação da pureza de pico do padrão 6-gingerol (150 µg/mL)	69
Figura 6. Avaliação da pureza de pico do extrato de gengibre	70
Figura 7. Gráfico de Durbin-Watson da curva usual de ácido gálico. e_i (resíduo da regressão);	71
Figura 8. Demonstração gráfica da homogeneidade das variâncias da curva usual de gengibre obtida pelo teste de Levene modificado	71
Figura 9. Gráfico final da linearidade da curva usual de 6-gingerol	72
Figura 10. Teor 6-gingerol em amostras de gengibre (mg de gingerol / 100g de gengibre fresco)	75

Capítulo 2

Figura 1. Desenho experimental de indução da obesidade com dieta rica em carboidratos simples e gengibre em camundongos balb-c. Animais alimentados com dieta comum (Controle); animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (HC); Dieta HC suplementada com 200 (HC200G), 600 (HC600G) e 1800 (HC1800G) mg/kg de peso corporal de extrato de gengibre	89
Figura 2. Adiposidade, histologia do tecido adiposo e gasto energético. A. Índice de adiposidade. B. Área de adipócitos. C. Fotomicrografias representativas de tecido adiposo epididimal marcado com hematoxilina-eosina (200x) de camundongos com dieta HC e gengibre. D. Distribuição de frequência de adipócitos na área de superfície celular do tecido adiposo epididimal. E. Gasto energético em repouso. F. VO ₂ em repouso. G. ingestão de alimentos. Os dados representam médias de 8 animais por	

grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G) 94

Figura 3. Variáveis séricas e teste oral de tolerância à glicose. A. Colesterol sérico. B. Triglicéridos séricos. C. Ácidos graxos livres. D. Glicose sérica. E. Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose. Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G). 96

Figura 4. Visualização da interação leucócito-endotélio induzida pela dieta HC e ingestão de gengibre. Microscopia intravital foi utilizada para avaliar as células de rolamento (A) e de adesão (B) em vasos do tecido adiposo epididimal in vivo. Imagens representam essas análises (C). Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G). 98

Figura 5 – Produção de adipocinas. A. TNF-alfa no tecido adiposo epididimal. B. IL-6 no tecido adiposo epididimal. C. IL-13 no tecido adiposo epididimal. D. IL-4 no tecido adiposo epididimal. E. Quemerina sérica. F. Adiponectina sérica. Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G)..99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS - 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ACC - *acetil-CoA carboxilase*
ALM – Departamento de Alimentos
ANOVA – Análise de Variância
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBAs – Compostos Bioativos
CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
ChREBP - *carbohydrate responsive element-binding protein*
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DAD – Diode Array Detector
DCNTs – Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM2 – *Diabetes Mellitus* tipo 2
DMO – Densidade Mineral Óssea
DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
DPPH - Radical 2,2-difenil-1- picril-hidrazil
EE – Gasto Energético Total
EGA – Equivalente de ácido gálico
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FAFAR – Faculdade de Farmácia
FAS – *Fatty acid synthase*
FM – Fase Móvel
FRAP – Poder Antioxidante de Redução de Ferro
GENGCONVSP - Gengibre convencional proveniente de São Paulo
GENGCONVES - Gengibre convencional proveniente do Espírito Santo
GENGORG1 - Gengibre orgânico proveniente de Itaúna produtor 1
GENGORG2 - Gengibre orgânico proveniente de Itaúna produtor 2
HC – Grupo com dieta rica em carboidratos simples

HC200G - Grupo com dieta rica em carboidratos simples suplementada com 200mg/kg de peso corporal de extrato de gengibre

HC600G - Grupo com dieta rica em carboidratos simples suplementada com 600mg/kg de peso corporal de extrato de gengibre

HC1800G - Grupo com dieta rica em carboidratos simples suplementada com 1800mg/kg de peso corporal de extrato de gengibre

HC – High carbohydrate diet

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-13 – Interleucina 13

KCl – Cloreto de potássio

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos

MG – Minas Gerais

MIF – Fator inibitório da migração de macrófagos

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

PFA – Departamento de Produtos Farmacêuticos

PPAR- γ - *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*

PPGCA – Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

RQ – Coeficiente Respiratório

SREBP-1 - *sterol regulatory bindingprotein - 1c*

TAM – Tecido adiposo mesentérico

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

TAI – Tecido adiposo enginal

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TROLOX - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

TTOG – Teste de Tolerância Oral à Glicose

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV - Ultravioleta

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

WHO – World Health Organization

RESUMO

A obesidade é considerada uma condição que aumenta o risco de morbidade para outras doenças crônicas como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, doença coronariana e está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau e significativo estresse oxidativo. Estima-se que 52,5% da população brasileira esteja acima do peso, e 18,9% da população apresenta obesidade. A prevenção e controle das doenças crônicas não transmissíveis e também a promoção da saúde dependem de estratégias de mudanças de hábitos e comportamentos, como modificações na dieta e combate ao sedentarismo. Os alimentos de origem vegetal são ricos em nutrientes como as vitaminas A, C e E e compostos fenólicos que apresentam propriedades biológicas promotoras da saúde, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, além de um efeito protetor contra doenças crônicas não transmissíveis. Dentre estes, destaca-se o gengibre, um rizoma muito utilizado como ingredientes para pães, bolos, bebidas e chás. Este alimento tem sido estudado pelo seu potencial efeito nas atividades anti-inflamatória, antioxidante, antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras, o que faz com que seu consumo tenha aumentado muito nos últimos anos. Assim, a produção do mesmo tem aumentado e apesar da prática do cultivo de forma orgânica, a maioria dos produtores utilizam agrotóxicos e fertilizantes sintéticos, muito dos quais são prejudiciais à saúde, e podem comprometer a ação final do alimento. Diante desta realidade, este trabalho tem como objetivo determinar a composição centesimal do rizoma de gengibre procedente de cultivo orgânico e convencional e avaliar o potencial como alimento funcional determinando sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Assim, para avaliar a diferença de cultivo, foram adquiridos rizomas de gengibre de cultivos convencional e orgânico (2 amostras de cultivo convencional e 2 amostras de cultivo orgânico). Em ambas as formas de cultivo foi realizada a caracterização química, avaliando a composição centesimal (umidade, lipídeos totais, proteínas totais, cinzas, fibras alimentares e carboidrato), a atividade antioxidante, compostos fenólicos e teor de 6-gingerol por cromatografia líquida de ultra eficiência. Já para a avaliação da atividade anti-inflamatória do gengibre foi conduzido um ensaio experimental, no qual avaliou-se as propriedades do gengibre no tratamento da obesidade em camundongos Balb-c. A obesidade foi induzida por dieta rica em carboidratos simples durante as oito primeiras semanas do experimento. Da 9ª a 12ª semana de estudo, os animais que recebiam dieta rica em carboidratos (HC) foram realocados em outros três novos grupos que passaram a se alimentar de dieta HC adicionada de diferentes dosagens de extrato de gengibre (200, 600 e 1800 mg por Kg de peso corporal). Quanto à composição centesimal dos gengibres convencional e orgânicos, os resultados foram superiores em relação aos teores de fibra alimentar insolúvel e proteínas totais, bem como de 6-gingerol para as amostras de gengibre de cultivo orgânico. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram maior adiposidade, adipócitos hipertrofiados e alterações metabólicas e inflamatórias. Por outro lado, a suplementação de extrato de gengibre, resultou em menor área de adipócitos, maior concentração de adiponectina, menor concentração de resistina e redução de triglicerídeos no fígado. Observou-se ainda, nos animais alimentados com extrato de gengibre uma redução do teor de TNF-alfa e de leucócitos em rolamento e aderidos no tecido adiposo. Assim, houve uma melhora significativa na inflamação local no tecido adiposo e um quadro favorável a ação da insulina após tratamento com gengibre.

Palavras-chave: Cultivo convencional. Cultivo orgânico. Obesidade. Inflamação

ABSTRACT

Obesity is considered a condition that increases the risk of morbidity for other chronic diseases such as hypertension, dyslipidemia, diabetes, coronary disease and is associated with chronic low-grade inflammation and significant oxidative stress. It is estimated that 52.3% of the Brazilian population is overweight, and 17.8% of the population is obese. The prevention and control of CNCs and also the promotion of health depend on strategies of changes in habits and behaviors, such as diet modifications and the fight against sedentarism. Foods of plant origin are rich in nutrients such as vitamins A, C and E and phenolic compounds that have biological health-promoting properties, such as antioxidant, anti-inflammatory and hypocholesterolemic activity, as well as a protective effect against chronic non-communicable diseases. Among these, stands ginger, a rhizome widely used as ingredients for breads, cakes, beverages and teas. This food has anti-inflammatory, antioxidant, antiemetic, anti-nausea, antimutagenic, antiulcer, hypoglycemic and antibacterial activities, which makes its consumption increased greatly in recent years. Thus, the production of the same has increased and despite the practice of growing organically, most producers use pesticides and synthetic fertilizers, many of which are harmful to health, and may compromise the final action of the food. In view of this reality, this work aims to determine the centesimal composition of the rhizome of ginger from organic and conventional cultivation and to evaluate the potential as a functional food, determining its antioxidant and anti-inflammatory capacity. In order to evaluate the difference in cultivation, ginger rhizomes were obtained from conventional and organic cultivars (2 conventional culture samples and 2 organic culture samples). In both forms of cultivation the chemical characterization was performed, evaluating the centesimal composition, total lipids, total proteins, ashes, dietary fiber and carbohydrate), antioxidant activity, phenolic compounds and 6-gingerol content by UPLC. In order to evaluate the anti-inflammatory activity of ginger, an experimental study was conducted in which the properties of ginger were evaluated in the treatment of obesity in Balb-c mice. Obesity was induced by a diet rich in simple carbohydrates during the first eight weeks of the experiment. From the 9th to the 12th week of the study, animals receiving a high carbohydrate (HC) diet were relocated to three new groups that fed HC diet with different dosages of ginger extract (200, 600 and 1800 mg per Kg body weight). The results were superior in relation to the levels of insoluble dietary fiber and total proteins, as well as 6-gingerol for organic ginger samples. The animals fed HC diet presented higher adiposity, hypertrophied adipocytes and metabolic and inflammatory alterations. On the other hand, supplementation of ginger extract resulted in a lower adipocyte area, a higher concentration of adiponectin, a lower concentration of resistin and a reduction in triglycerides in the liver. In the animals fed with ginger extract, a reduction in the content of TNF-alpha and leucocytes was observed and adhered in adipose tissue. Thus, there was a significant improvement in local inflammation in adipose tissue and a favorable picture of insulin action after treatment with ginger.

Key words: conventional cultivation, organic farming, obesity, inflammation

INTRODUÇÃO

Tem-se observado nas últimas décadas um aumento significativo no consumo de alimentos de elevada densidade energética, ricos em gordura saturada, açúcar e sódio, associado à diminuição do consumo de cereais integrais, leguminosas, frutas e vegetais, os quais são alimentos fonte de micronutrientes, fibras e substâncias bioativas. Essas mudanças nos padrões alimentares são também conhecidas como transição nutricional e acometem principalmente países ocidentais (DIAS *et al.*, 2005; BAKKER *et al.*, 2010; SIRIWARDHANA *et al.*, 2013; WHO, 2015, NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

A alteração destes hábitos estão relacionadas ao desenvolvimento de várias doenças não transmissíveis (DCNT), incluindo o diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade e câncer. Assim, é necessário a adoção de hábitos saudáveis, com aumento do consumo de alimentos de origem vegetal, ricos em nutrientes e substâncias bioativas, e a redução da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada e de elevado índice glicêmico, para a melhoria do estado nutricional e saúde (CARDOSO, 2006, GERALDO & ALFENAS, 2008, BRESSAN *et al.*, 2009; IBGE, 2013).

As DCNT apresentam etiologia multifatorial e diversos fatores de riscos, os quais podem ser modificados (MALTA *et al.*, 2006). Dentre estas, a obesidade representa grave problema de saúde pública, afetando tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (BASTOS *et al.*, 2009).

A obesidade é considerada uma condição que aumenta o risco de morbidade para outras doenças crônicas como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, doença coronariana, alguns tipos de câncer e colecistite (SICHIERI *et al.*, 2000; WITHROW & ALTER, 2011; WHO, 2015). O estudo desta doença está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau e significativo estresse oxidativo, que predispõe a resistência à insulina e ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), doenças hepáticas e dislipidemia o que implica aumento do risco para doenças cardiovasculares (MCARDLE *et al.*, 2013; HILL *et al.*, 2014). Segundo os dados do VIGITEL (2017), 54% da população brasileira está acima do peso, e 18,9% da população apresenta obesidade.

A prevenção e controle das DCNT e também a promoção da saúde, de uma forma geral dependem, dentre outros fatores, de estratégias de mudanças de hábitos e

comportamentos, como modificações na dieta e combate ao sedentarismo (FONSECA *et al.*, 1999; TOSCANO, 2004; SIRIWARDHANA *et al.*, 2013).

Populações que consomem dietas ricas em frutas, hortaliças, grãos integrais, leguminosas, alimentos in natura de um modo geral, apresentam menor incidência dessas doenças quando comparadas às populações que fazem uso de alimentos refinados, uma vez que o processamento industrial elimina quase que totalmente as fibras alimentares presentes no alimento, alterando ainda, as suas características físicas e químicas (CARDOSO, 2006).

O efeito protetor contra as DCNTs tem sido atribuído, em grande parte, à propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividade antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas A, C e E e de compostos fenólicos presentes nos vegetais (LIMA *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2008; PEREIRA, 2009). Diversas pesquisas já identificaram nutrientes e substâncias bioativas, presentes principalmente em alimentos de origem vegetal, que atuam em alvos fisiológicos específicos, interferindo nos processos patogênicos de inúmeras doenças (TOSCANO, 2004; BASTOS *et al.*, 2009).

O grande interesse no estudo dos compostos com ação antioxidantes é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres no organismo. Estes causam danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, lesando o organismo, promovendo assim, o desenvolvimento de um grande número de patologias incluindo o câncer, a aterosclerose e doenças degenerativas (GONÇALVES, 2008; COSTA, 2009; PEREIRA, 2009).

Dentre os alimentos de origem vegetal que apresentam propriedades promotoras da saúde, o gengibre (*Zinziber officinale Roscoe*), tem sido investigado por suas propriedades anti-inflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (ZARATE, *et al.* 1992; HABSAH *et al.*, 2000; DEDOV *et al.*, 2002). Além destas, a atividade antioxidante presente no gengibre é, provavelmente, proveniente da elevada concentração de compostos bioativos, principalmente de compostos fenólicos. No entanto, o estudo de propriedades biológicas de espécies da família Zingiberaceae, à qual pertence o gengibre, ainda é muito escassa, principalmente no que se refere às suas propriedades antioxidantes (BEAL, 2006).

O gengibre (*Zinziber officinale Roscoe*), é uma raiz tuberosa usada na culinária (seja como tempero ou mesmo compondo determinados pratos), na fabricação de

cervejas, aguardente, refrigerantes, balas, doces, cristais, amido, óleos essenciais e cosméticos. Com uma grande variedade de utilização, o gengibre torna-se um alimento de grande importância no comércio de produtos agroindustriais. A carência de informações sobre as formas de uso e dos benefícios à saúde leva as pessoas a desconhecerem a versatilidade desta matéria-prima (BEAL, 2006).

Embora o Brasil seja considerado um dos grandes fornecedores mundiais de gengibre, sua produção é pequena comparada à de outros países, e envolve um conjunto relativamente restrito de agricultores. As zonas brasileiras produtoras de gengibre abrangem as regiões litorâneas de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, litoral nordestino e algumas regiões de Minas Gêrias, Goiás e Rio de Janeiro (ALMEIDA *et al.* 2007). A produtividade média brasileira tem sido registrada em torno de 3.200 toneladas por ano, cifra bastante inferior à obtida nos principais produtores mundiais, como Índia, China e Nigéria (TOMAZELA, 2010). Sendo considerado o cultivo do gengibre uma atividade lucrativa, torna-se necessário um incentivo maior para o cultivo do mesmo. Este cultivo adapta-se bem a climas quentes, como o clima tropical e subtropical, não resistindo a condições adversas como a seca e a geada (ALMEIDA *et al.* 2007).

Demandando permanentes cuidados durante todo o seu ciclo vegetativo, o gengibre torna-se uma cultura que atende aos padrões da agricultura familiar, não só pelas características do seu sistema de produção, mas também pela alta rentabilidade, já que o custo inicial é baixo e a produção elevada (ESPINDOLA JUNIOR, 2008). Entretanto, deve-se atentar para a forma de cultivo do gengibre, dando preferência para o cultivo de maneira mais sustentável, já que o uso de agrotóxicos causa severos danos para a saúde.

Os efeitos nocivos do uso de agrotóxicos para a saúde humana têm sido objeto de estudos elaborados por profissionais da saúde, os quais têm detectado a presença dessas substâncias em amostras de sangue humano, no leite materno e resíduos presentes em alimentos consumidos pela população em geral, apontando a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas, de câncer, de doenças mentais, de disfunções na reprodutividade humana relacionadas ao uso de agrotóxicos (SIQUEIRA & KRUSE, 2008).

Devido às diversas propriedades encontradas no gengibre, principalmente anti-inflamatória e antioxidante, seu consumo tem aumentado significativamente nos últimos anos, por pessoas que visam reduzir o risco de doenças, combater radicais livres e

reduzir a inflamação no corpo devido a presença de substâncias nocivas, como poluição, aditivos alimentares e agrotóxicos, que estão presentes diariamente na rotina das pessoas (FAGUNDES & COSTA, 2003; LEONEL & MACEDO, 2013).

Diante do exposto, surge a necessidade de caracterizar melhor os rizomas de gengibre, a fim de se avaliar seus potenciais antioxidantes e seus efeitos anti-inflamatórios e se o tipo de cultivo, convencional e orgânico influenciam na composição do rizoma bem como na ação final do alimento na saúde humana

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o rizoma de gengibre procedente de cultivo orgânico e convencional quanto à composição química, teor de 6-gengirol e capacidade antioxidante e anti-inflamatória no tratamento da obesidade, sinalizando assim o potencial deste como alimento funcional.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a composição centesimal (umidade, cinzas totais, lipídeos totais, proteínas, fibra alimentar do rizoma de gengibre convencional e orgânico.

Avaliar a atividade antioxidante das amostras de gengibre de cultivo orgânico e convencional, empregando três sistemas distintos (ABTS, FRAP e DPPH).

Otimizar o método de determinação de 6-gingerol em amostras de gengibre empregando a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

Determinar o teor de 6-gingerol presente no gengibre convencional e orgânico.

Comparar a composição química e o teor de gingerol das amostras de gengibre convencional e o orgânico.

Avaliar *in vivo* o potencial do extrato de gengibre para o tratamento da obesidade e alterações metabólicas e inflamatórias induzidas pela dieta em camundongos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TRANSIÇÃO NUTRICIONAL

Os hábitos e comportamentos diários (consumo alimentar, atividade física, fumo e ingestão de álcool) influenciam fortemente na ocorrência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, cânceres de acordo com investigações epidemiológicas, tanto clínicas quanto experimentais (FONSECA *et al.*, 1999; BASTOS *et al.*, 2009; FUJII *et al.*, 2010)

Mudanças de hábitos alimentares nas últimas décadas associadas ao maior consumo de alimentos processados de baixo custo, estão relacionadas ao aumento da ingestão de produtos com elevada densidade energética e baixa densidade nutricional (FALLER & FIALHO, 2009). Além disso, a industrialização e a urbanização favoreceram o aumento da ingestão de calorias e diminuição da atividade física, estabelecendo o princípio do sobrepeso, ou seja, maior ingestão calórica e menor gasto energético, com acúmulo de gordura (TARDIDO & FALCÃO, 2006; SCHIMIDT *et al.* 2011).

Estudos sobre padrões alimentares têm demonstrado que o consumo habitual de carne vermelha, alimentos ultraprocessados, bebidas adoçadas e açúcares está diretamente relacionada ao desenvolvimento de doenças, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (CARDOSO, 2006, MENDES, 2013).

No ano de 2002, o Ministério da Saúde financiou o primeiro estudo de carga de doença, com o objetivo de avaliar um retrato mais preciso do peso decorrente das doenças mais prevalentes no país. De acordo com estes resultados observou-se que as doenças não transmissíveis são responsáveis pelas maiores proporções de anos de vida perdidos por morte prematura (59,0%), por anos de vida vividos com incapacidade (74,7%) e por anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (66,3%) (MALTA *et al.*, 2006).

As DCNT são de etiologia multifatorial e compartilham vários fatores de riscos, alguns dos quais podem ser modificados. A urgência em deter o crescimento das DCNT no país justifica a adoção de estratégias integradas e sustentáveis de prevenção e controle dessas doenças, assentadas sobre seus principais fatores de risco modificáveis: tabagismo; inatividade física; alimentação inadequada; obesidade; dislipidemia; e consumo de álcool (MALTA *et al.*, 2006).

3.2. OBESIDADE

A obesidade é considerada uma doença que aumenta o risco de morbidade para as principais doenças crônicas como hipertensão, dislipidemia, diabetes, doença coronariana, alguns tipos de câncer e colecistite (SICHERI *et al.*, 2000), ocasionando um grave problema de saúde pública, devido ao enorme repasse de verbas para o tratamento de tais morbidades (BASTOS *et al.*, 2009). Esta pode ser definida, simplificada, como uma doença caracterizada pelo aumento excessivo de gordura corporal, em consequência do balanço energético positivo que repercute na saúde do indivíduo, com perda considerável, tanto na quantidade como na qualidade de vida (BATISTA FILHO *et al.*, 2008; SCHIMIDT *et al.*, 2011).

A obesidade está associada a um quadro de inflamação crônica de baixo grau, que predispõe à resistência à insulina e ao desenvolvimento do diabetes, o que implica aumento do risco para doenças cardiovasculares. É um importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido, não somente, à gravidade das comorbidades associadas, mas também à elevada prevalência dessa condição (WANDERLEY & FERREIRA, 2010; WHO, 2015).

Em 2017 foram detectados 614 milhões de indivíduos obesos no mundo e, caso o ritmo de crescimento da obesidade mantenha-se elevado, estima-se que em 2025 aproximadamente 18% dos homens e 21% das mulheres serão obesos (NCD RISK FACTOR COLLABORATION, 2016). No Brasil estima-se que aproximadamente 18,9% da população adulta apresenta obesidade (VIGITEL, 2017).

A expansão do tecido adiposo resulta em adipócitos hipertrofiados e conseqüentemente, em hipóxia dessas células, devido a insuficiente vascularização desse tecido (MCARDLE *et al.*, 2013). A hipóxia de adipócitos gera importante ativação do sistema imunológico associado ao aumento de quimiocinas (MIF - fator inibitório da migração de macrófagos e MCP-1 - proteína quimiotática para monócitos), efeito responsável pelo aumento no recrutamento e infiltração de células imunológicas (linfócitos T, macrófagos, neutrófilos).

A associação da obesidade e alterações metabólicas é em parte determinada pela inflamação crônica de baixo grau e pelo excessivo estresse oxidativo, na qual alterações no perfil de adipocitocinas e citocinas secretadas pelo tecido adiposo alteram a homeostase metabólica. A exemplo, na obesidade ocorre redução na secreção, pelo tecido adiposo, de adiponectina, uma adipocina com perfil anti-

inflamatório. Por outro lado, observa-se aumento da liberação de moléculas pró - inflamatórias, tais como as interleucinas IL- 6 e IL-1 β , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as adipocinas: quemerina, leptina e resistina (FERREIRA *et al.* 2010; OSBORN & OLEFSKY, 2012; MCARDLE *et al.*, 2013; FERREIRA, *et al.* 2014; HILL *et al.*, 2014). Além disso, a obesidade está associada à maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ocasionam em estresse oxidativo, dano celular e exarcebação da inflamação (FURUKAWA *et al.*, 2004; HOPPS *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo e o aumento da resposta inflamatória local (no tecido adiposo) e sistêmica contribuem para a maior predisposição ao desenvolvimento de enfermidades, tais como diabetes *mellitus* tipo II, dislipidemias, doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças cardiovasculares (BOZAOGLU *et al.*, 2007; WANDERLEY & FERREIRA, 2010; OSBORN & OLEFSKY, 2012; MCARDLE *et al.*, 2013; HILL *et al.*, 2014). Além disso, a elevada produção de moléculas pró-inflamatórias e de ERO'S contribui para aumento da osteoclastogênese e, conseqüentemente, da reabsorção óssea, condições essas que podem acarretar em menor densidade mineral óssea (DMO) em indivíduos obesos (HALADE *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2015).

A prevenção e controle das DCNT e também a promoção da saúde, de uma forma geral dependem, entre outros fatores, de estratégias de mudanças de hábitos e comportamentos, como modificações na dieta e combate ao sedentarismo (FONSECA *et al.*, 1999, TOSCANO, 2004).

Dentre as modificações do hábito alimentar, deve-se destacar o aumento do consumo de frutas, hortaliças e grãos integrais (BASTOS *et al.*, 2009). Populações que apresentam hábitos de consumir grandes quantidades de frutas e hortaliças apresentam menor incidência dessas doenças quando comparadas às populações que fazem uso de alimentos ultraprocessados, uma vez que o processamento industrial elimina quase que totalmente as fibras alimentares presentes no alimento, alterando ainda, as suas características físicas e químicas (CARDOSO, 2006).

Assim, o consumo de frutas e vegetais tem sido associado a uma menor incidência e mortalidade por diversas doenças crônicas não-transmissíveis. A proteção que esses alimentos oferecem contra as enfermidades degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, está associada ao seu alto conteúdo de constituintes químicos com propriedades importantes, como as de antioxidantes (vitamina C, E, carotenóides e polifenóis) (LIMA *et al.*, 2007).

3.3. BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que existe uma correlação inversa entre o consumo regular de frutas e hortaliças e a prevalência de algumas DCNT, como obesidade, resistência à insulina, câncer e doenças cardiovasculares. Esta associação se dá, principalmente, pela composição química natural presente nestes alimentos (FALLER & FIALHO, 2009).

Alimentos de origem vegetal, como frutas e hortaliças são fontes de energia, proteína, vitaminas e minerais e a única ou principal fonte de vitamina C, folato, fibras alimentares e compostos bioativos, dos quais o metabolismo humano também é beneficiado (BASTOS *et al.*, 2009).

O efeito protetor dos alimentos de origem animal contra as DCNT tem sido atribuído, em grande parte, a propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividades antioxidantes, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica dos compostos bioativos e de nutrientes como as vitaminas C, A e E e dos compostos fenólicos, como os flavonoides (LIMA *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2008, PEREIRA, 2009; ; HIRAI *et al.*, 2010; DULLOO, 2011; SIRIWARDHANA *et al.*, 2013).

3.3.1. Compostos bioativos

As substâncias bioativas são provenientes principalmente do metabolismo secundário das plantas e possuem, entre outras ações, função de defesa para se protegerem de micro-organismos patogênicos, insetos, além de atrair agentes polinizadores (GARCIA & CARRIL, 2009).

Os compostos bioativos exercem várias ações do ponto de vista biológico, como atividade antioxidante, modulação de enzimas de destoxificação, estimulação do sistema imune, redução da agregação plaquetária, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, e atividade antibacteriana e antiviral (HORST & LAJOLO, 2012).

A ação antioxidante, comum nesses compostos, deve-se ao potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, à capacidade dessas moléculas em competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares e, ainda, à modulação da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos intracelulares

de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares (DNA, membranas) (BASTOS *et al.*, 2009).

O grande interesse no estudo dos compostos antioxidantes é decorrente, principalmente, do efeito dos radicais livres. Estes causam danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando lesões ao organismo, podendo levar a um grande número de patologias incluindo o câncer, a aterosclerose e doenças degenerativas (GONÇALVES, 2008; COSTA & MONTEIRO, 2009; PEREIRA, 2009).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Quando há um aumento na produção de radicais livres e redução nos mecanismos de defesa antioxidante, ocorre o chamado “estresse oxidativo” (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HIRATA *et al.*, 2004).

Sendo assim, as células humanas dependem de certa capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas do oxigênio. Para alcançar uma proteção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste de um arranjo de diversos componentes lipossolúveis (vitamina E; carotenóides), hidrossolúveis (ácido ascórbico; glutatona) e enzimáticos (glutatona peroxidase; superóxido dismutase; catalase) (SILVA *et al.*, 2010).

Os antioxidantes agem interagindo com os radicais livres antes que estes possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos (CERQUEIRA *et al.* 2007; FERREIRA & ABREU, 2007, PEREIRA & CARDOSO, 2012).

De acordo com Ratnam *et al.* (2006), o sistema de defesa antioxidante intrínseco não é completo sem os antioxidantes dietéticos. Assim, é fundamental o consumo diário de alimentos que contenham compostos antioxidantes.

Os alimentos, principalmente as frutas e hortaliças, contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres. As vitaminas C, E e o β - caroteno, bem como os compostos fenólicos são consideradas excelentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos

lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais, etc. e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais (ALVES, *et al.* 2010).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Pode-se citar o método de captura de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), pelo antioxidante de redução do ferro (FRAP), da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, análise por fluorescência por meio de ensaio fluorimétrico, sequestro do radical peroxil, método ORAC, dentre outros (ALVES, *et al.* 2010).

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é aquele baseado na captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com esse método, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Já o método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico.

O método Poder Antioxidante de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP*) foi descrito como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (RUFINO *et al.* 2007). O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (RUFINO *et al.*, 2007).

3.4. GENGIBRE

O gengibre é um rizoma de origem asiática, cultivado praticamente em todos os países do mundo (ESPINDOLA JUNIOR, 2008; TORRES, 2009). No Brasil, é encontrado nas regiões quentes e úmidas desde o Amazonas até o Paraná (PEREIRA et al. 2012), sendo que os primeiros rizomas (a parte subterrânea, comestível, responsável pela propagação vegetativa) chegaram há menos de um século após o descobrimento do país (MENDES, 2005; ESPINDOLA JUNIOR, 2008; RODRIGUES & LIRA, 2013).

O gengibre vem contribuindo para a absorção da mão-de-obra local na zona rural em diversos estados, por se tratar de uma lavoura com grande demanda de tratamentos culturais manuais. Esta planta necessita, também, durante todo o processo produtivo de um monitoramento da lavoura, devendo ser cultivado em pequenas áreas, o que a torna particularmente indicada para exploração em moldes familiares (ESPINDOLA JUNIOR, 2008).

O prognóstico do agronegócio gengibre é promissor, em função do aumento da área, produção e produtividade nos principais países produtores, incluindo o Brasil (TORRES, 2009).

O Brasil, segundo o censo de agronegócios (IBGE, 2006), possui cerca de 4 milhões de estabelecimentos utilizados para agricultura familiar e uma área total de 80 milhões de hectares, que corresponde a 32% das terras produtivas, utilizados para este fim. Só a região sudeste detém 12 milhões de hectares destinados à agricultura familiar, sendo que mais da metade deste valor (8,8 milhões de hectares) encontra-se no estado de Minas Gerais (IBGE, 2006). Embora o Brasil seja considerado um dos grandes fornecedores mundiais de gengibre, sua produção é pequena comparada à de outros países, envolvendo um conjunto relativamente pequeno de agricultores. A produtividade média brasileira tem sido registrada em torno de 3.200 toneladas anualmente, cifra bastante inferior à obtida nos principais produtores mundiais, como Índia, China e Nigéria (TOMAZELA, 2010). Sendo considerado o cultivo do gengibre uma atividade lucrativa, torna-se necessário um incentivo maior para produção de tal gênero.

O gengibre é comercializado sob três formas básicas: gengibre *in natura*, cristalizado e seco, além dos produtos derivados do gengibre, como o óleo essencial e

oleoresina. Este rizoma é muito utilizado como condimento e matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geleias, além do preparo de bebidas, como o *ginger ale*, *ginger beer*, quentão e chás (BEAL, 2006; FRANCISCO & FRANCISCO, 2007)

O gengibre é considerado também uma das especiarias mais importantes e valorizadas ao redor do mundo, possuindo ainda alto potencial terapêutico em diversas patologias, como náuseas, dores estomacais, resfriados, hiperglicemias (RODRIGUES & LIRA, 2013). Suas propriedades terapêuticas são resultado da ação de várias substâncias, como gingerol, canfeno, felandreno, zingibereno e zingerona (ZARATE, *et al.* 1992; BEAL, 2006).

O gingerol é a principal substância que dá ao gengibre a característica pungente, apresentando diversas funções farmacológicas como atividade na agregação plaquetária, modulação de macrófagos, atividade imunossupressora e inibição de lipopolissacarídeos (VIEIRA, *et al.* 2014).

O rizoma de gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na medicina popular (excitante, estomacal e carminativo) (NEGRELLE, 2005). Popularmente, o chá de gengibre, feito com pedaços do rizoma fresco fervido em água, é usado no tratamento de gripes, tosse e resfriado (BEAL, 2006).

Várias propriedades do gengibre vem sendo estudadas em experimentos científicos, tendo sido descritas atividades antiinflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (ZARATE *et al.* 1992; HABSAH *et al.*, 2000; DEDOV *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante presente no gengibre é proveniente da elevada concentração de compostos bioativos principalmente de compostos fenólicos. No entanto, o estudo de propriedades biológicas de espécies da família Zingiberaceae, à qual pertence o gengibre, ainda é muito escassa, principalmente no que se refere às suas propriedades antioxidantes (BEAL, 2006, LIANG LU, *et al.* 2014).

Várias são as ações biológicas exercidas pelas diferentes classes de substâncias bioativas, incluindo atividade quimiopreventiva, antioxidante, hipolipidêmica e antiinflamatória (PADILHA & PINHEIRO, 2004; TALHOUK *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010). A capacidade de algumas substâncias naturais em sequestrar radicais livres ou diminuir a sua produção podem explicar, pelo menos em parte, a correlação entre sua ingestão com a redução do risco de doenças crônicas e agravos não transmissíveis (CEFALU *et al.*, 2008; BADIMON *et al.*, 2010; CHUANG *et al.*, 2010).

3.4.1. Determinação de 6-gingerol

O gengibre contém uma quantidade elevada de diferentes substâncias pungentes e compostos bioativos, denominados gingeróis. O 6-gingerol é a principal substância bioativa presente no gengibre, apresentando atividades farmacológicas como antipirético, hipotensor, antiangiogênico, antiplaquetário, anticancerígeno, antifúngico e hepatoprotetor (RAI *et al.*, 2006).

Esta substância é um alquil de átomos de carbono, conforme demonstrado na figura abaixo.

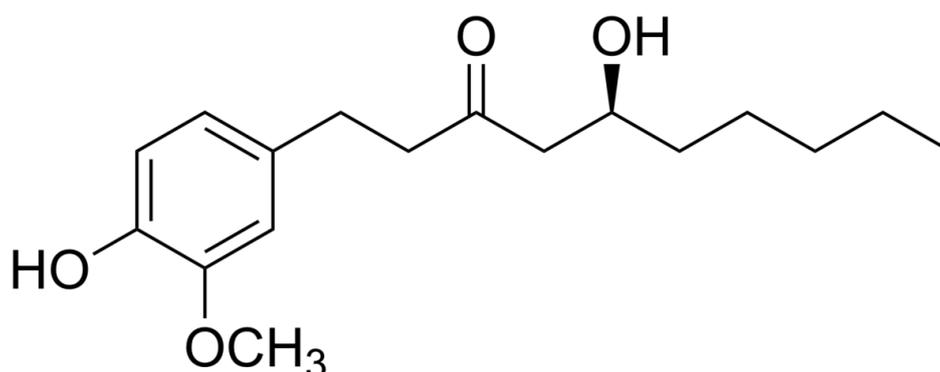


FIGURA 1. 6-gingerol

Os gingeróis são termolábeis e sofrem degradação térmica e perda de uma molécula de água quando submetidos a temperaturas superiores a da ambiente, transformando-se principalmente nos compostos do grupo dos shogaóis (PRATO, 2010)

A técnica mais simples para a determinação do teor de 6-gingerol em rizomas de gengibre é a espectrofotometria de UV. No entanto, este método não é preciso e apresenta diversas variações de leitura (RAI *et al.*, 2006).

Já a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais utilizada atualmente para a análise quantitativa de 6-gingerol. Neste método, têm-se utilizado coluna C18 e diversas misturas de solventes como metanol, acetonitrila e água, utilizando comprimentos de ondas próximos de 280 nm., com corridas variando de 20 a 60 minutos (WOHLMUTH *et al.*, 2005; RAI *et al.*, 2006; SANWAL *et al.*, 2010; LIANG LU *et al.*, 2014).

Sanwal e colaboradores (2010) utilizaram rizomas frescos de gengibre que foram extraídos com metanol e centrifugados a 5000 rpm a 10 min. A determinação de gingerol foi realizada em CLAE com detector UV e coluna C18 a 280 nm, utilizando água e acetonitrila como fase móvel.

Já no estudo conduzido por Wohlmuth e colaboradores (2005), amostras frescas foram submetidas ao ultrassom por 20 minutos com etanol e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm por 5 min. A determinação do gingerol foi realizada em CLAE em coluna C18 de fase reversa. Como fase móvel foi utilizado água, acetonitrila e ácido trifluoracético, sendo a leitura realizada a 228 nm.

Pawar e colaboradores (2011) utilizaram o rizoma de gengibre desidratado em pó que foram extraídos com metanol em banho de ultrassom por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos e a leitura foi realizada em CLAE, tendo como fase móvel acetonitrila e água, utilizando uma coluna C18 realizando a leitura em 280nm.

Sean Ok & Sik Jeong (2012) determinaram o gingerol em gengibre desidratado, utilizando etanol no processo de extração por refluxo por 24 horas. A leitura foi realizada em CLAE a 230 nm, utilizando uma coluna C18 de fase reversa. Acetonitrila e água foram utilizadas como fase móvel.

No entanto, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) está dando espaço à cromatografia líquida ultra eficiente, que fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da CLAE, tendo como principais diferenças o uso de colunas cromatográficas de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as elevadas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade das substâncias a serem analisadas, diminuindo o tempo das análises. Em vista disso, as análises tornam-se mais rápidas e com melhor poder de detecção (MALDANER & JARDIM, 2012; PORTO, 2014).

Atualmente já observam-se diversos estudos com doseamento de fármacos e extratos de alimentos utilizando a metodologia de cromatografia líquida ultra eficiente (ORTIZ *et al.*, 2010; CARVALHO, 2012; PAULA, 2013; LOPEZ, 2014).

3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem fazer com que sejam tomadas decisões erradas, além de gastos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação, que consiste em um processo contínuo, iniciado no planejamento da estratégia analítica e realizado ao longo de todo o seu desenvolvimento e aplicação (RIBANI *et al.*, 2004; MARTINS, 2008, NATIVIDADE, 2014).

A validação pode ser definida como a confirmação da adequação de determinado método para o propósito de uso. De acordo com a NBR ISO 9000:2005 (ABNT, 2005a), validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. A validação de métodos se aplica a um protocolo definido, para a determinação de analitos específicos, numa faixa de concentração, em um determinado grupo de matrizes, por um tipo de teste em particular, tendo um propósito específico de uso (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; CARREIRA, 2009).

Os estudos para determinação dos parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados, sendo conduzidos por pessoal competente na área, com conhecimento suficiente para tomar decisões apropriadas (INMETRO, 2010; SOUZA *et al.*, 2007).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos, é possível distinguir dois tipos. O primeiro, chamado de validação no laboratório, consistindo das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente, ou para verificar se um método adotado de outras fontes está sendo bem aplicado. Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis à diferentes situações (VAN DER VOET *et al.*, 1999). Além disso, por estes

processos, pode-se avaliar, não somente a exatidão e a precisão de um método, mas também outros parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação (VAN DER VOET *et al.*, 1999).

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, que não deve ser estatisticamente diferente de 1 (avaliado pelo teste “t” de Student), observando-se que a inclinação da reta seja diferente de zero. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a um coeficiente angular diferente de zero (STUBBERUD & ASTROM, 1998; AMARANTE, 2001; BRITO, 2001).

A linearidade do método é verificada por meio da regressão linear simples ou método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Sob o ponto de vista experimental, a avaliação da linearidade consiste em construir uma curva de calibração estabelecida com pelo menos seis níveis de concentrações (abscissa), mais o zero, e suas absorvâncias (ordenada). O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo. Os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida. Seguem a distribuição normal, e são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X (variável independente). Além disso, o resíduo de uma observação não deve ser correlacionado com o resíduo em outra observação, ou seja, a covariância deve ser zero e a relação entre X e Y (variável dependente) deve ser linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005, CARREIRA, 2009).

O delineamento experimental para testes de efeitos de matriz consiste do preparo de curvas de calibração usuais (curvas de analito em solventes), e curvas de materiais de referência ou de adição de analito, em amostras brancas ou não (curvas de analito em matriz), com concentrações idênticas ou abrangendo a mesma faixa de concentração (SOUZA, 2007). Consideram-se amostras brancas aquelas de matrizes isentas do analito, ou para as quais o analito não tenha sido detectado. O uso de amostras típicas de cada matriz é fundamental para eliminar a possibilidade de efeitos de matriz, que diferem em magnitude de uma amostra para a outra. As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais. Isto, para que

as quantidades e as características dos interferentes presentes no extrato final de uma amostra sejam reproduzidas nas curvas. Não somente os interferentes provenientes da matriz são avaliados nestes experimentos, mas também todos aqueles provenientes de materiais, reagentes e soluções utilizados no preparo das amostras (SOUZA, 2007; LABANCA *et al.*, 2008). Os estudos de efeitos de matriz se espelham nos experimentos de avaliação da linearidade. Assim, as considerações sobre o delineamento experimental para comprovação da linearidade, também são válidas para o preparo das curvas de calibração, destinadas às verificações dos efeitos de matriz (SOUZA, 2007; NATIVIDADE *et al.*, 2014).

Exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. Exatidão pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz limpa da amostra ou ainda na matriz da amostra (HUBERT *et al.* 1999; SOUZA, 2007).

Precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. Precisão é expressa em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo. Para definir os critérios de aceitação no estudo de precisão, pode ser usada a equação de Horwitz, que indica que a precisão decresce quando a concentração do analito decresce (HORWITZ, 1980).

Materiais de referência certificados são relacionados a todos os aspectos da tendência (do método, do laboratório e do ensaio), por apresentarem incerteza estabelecida e rastreabilidade a padrões internacionais comprovada. Estes materiais são utilizados com diversas finalidades, tais como alcançar a rastreabilidade em medidas analíticas, calibrar equipamentos e métodos, monitorar o desempenho do laboratório, validar métodos e permitir a comparação entre métodos. Entretanto, os materiais de referência certificados são caros e podem não ser representativos de amostras típicas, não garantindo a exatidão do método. A condição ideal seria utilizar um material de referência certificado da matriz de interesse. No caso da precisão, o uso de materiais de referência certificados, os quais são frequentemente bem mais homogêneos que amostras verdadeiras, podem subestimar a variação dos resultados

(THOMPSON *et al.*, 2002). Na área de alimentos, materiais de referência certificados são escassos e dispendiosos, principalmente devido às dificuldades no preparo, homogeneização e garantia de estabilidade durante armazenamento e transporte. Quando não há material de referência certificado disponível, uma amostra branca da matriz de interesse pode ser adicionada de quantidades conhecidas de analito na forma de material puro (ou de pureza conhecida) e estável, ou de outro material bem caracterizado, para realização de ensaios de recuperação aparente (SOUZA, 2007).

Exatidão e precisão são geralmente dependentes da concentração do analito, devendo ser determinadas para um diferente número de concentrações. Na literatura sobre validações intralaboratoriais de métodos, um mínimo de três níveis de concentração, com três a dez replicatas por nível, é frequentemente recomendado (SOUZA, 2007). Nos experimentos para avaliação da precisão, as variações entre ensaios devem representar o que normalmente acontece no laboratório em condições de rotina. Os materiais usados devem ser típicos em termos de tipos de matriz, devendo representar as amostras encontradas na aplicação do método. Variações de lotes e marcas de reagentes, analistas e equipamentos também devem ser representativas no delineamento dos parâmetros repetitividade e reprodutibilidade parcial (SOUZA, 2007; CARREIRA, 2009).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2010). O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento, enquanto que a definição do limite de detecção do método (LDM) baseia-se na concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 % ou 99 % de confiança, de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz (INMETRO, 2010). Na validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, obter a média das respostas conseguidas para amostras brancas mais três desvios padrão, considerando análise de sete ou mais amostras de branco. Quando o experimento for realizado com replicatas de amostras contendo o analito em baixa concentração, o limite de detecção corresponde a três desvios padrão das respostas obtidas (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007; INMETRO, 2010). O limite de quantificação é a menor concentração do

analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser considerado como sendo a média das respostas obtidas para amostras brancas mais cinco, seis ou dez desvios padrão, considerando análise de sete ou mais amostras de branco. Algumas vezes, é também denominado de “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias (SOUZA, 2007). A diferença entre os Limites de Detecção e de Quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). ABNT NBR ISO 9000:2005. Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 35 p. (a)
- ALMEIDA, N.G.; SERPE ELPO, E.R.; GIROTTO, A. Aspectos econômicos da cultura do gengibre. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/gengibre_2007_08.pdf. Acessado em dezembro de 2015.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, No. 10, 2202-2210, 2010.
- AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, v. 12, p. 116-131, 2001.
- BADIMON, L.; VILAHUR, G.; PADRO, T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. **Cardiovascular Therapeutics**, v.28, p.202-215, 2010.
- BAKKER, G.C; VAN ERK, M.J;PELLIS, L; WOPERIS, S; RUBINGH, C.M; CNUBBEN, N.H.P; KOOISTRA, T; VAN OMEN, B; HENDRIKS, H.F.J. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, p.1044–1059, 2010.
- BASTOS, D.H.M. ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 5, p. 646-56, 2009.

- BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A.I.; MIGLIOLI, T.C.; SANTOS, M.C.; Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24 Sup 2:S247-S257, 2008.
- BEAL, B.H. Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* ROSCOE) Florianópolis 2006, 87p. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 12, n. 2 p. 123-130, 1999.
- BOZAOGLU, K; BOLTON, K; MCMILLAN, J; ZIMMET, P; JOWETT, J; COLLIER, G; WALDEN, K; SEGAL, D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4687–4694, 2007.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- BRESSAN, J; HERMSDORFF, H.H; ZULET, M.A; MARTINEZ, J.A. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 572–581, 2009.
- BRITO, N. M. Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.
- CARDOSO, S.M.G.; PINTO, W.J.; REYES, F.G.; AREAS, M.A. Hypercholesterolemia and production of free radicals: protect effects of dietary fibers. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 31, n. 2, p. 123-134, 2006.

- CARREIRA, R.L.B. Obtenção de extrato enzimático da casca de abacaxi e sua utilização no preparo de hidrolisados protéicos de farinha de trigo com teor reduzido de fenilalanina. 2009. **Tese** de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. 238p.
- CARVALHO, A.R.M. Monitorização de Desreguladores Endócrinos em águas de rede e águas residuais por SPE-UPLC-ESI-MS/MS Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL). 2012. **Dissertação** apresentada ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Ambiente. 103p.
- CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G; AUGUSTO, H. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 441-449, 2007.
- CEFALU, W.T.; YE, J.; WANG, Z. Efficacy of Dietary Supplementation with Botanicals on Carbohydrate Metabolism in Humans. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v.8, p.78-81, 2008.
- CHUANG, C.C.; MARTINEZ, K.; XIE, G.; KENNEDY, A.; BUMRUNGPET, A.; OVERMAN, A.; JIA, W.; MCINTOSH, M.K. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.96, n.6, p.1511-1521, 2010.
- COSTA, P.R.F. & MONTEIRO, A.R.G. Benefícios dos antioxidantes na alimentação. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 1, p. 87-90, jan./abr. 2009.
- DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.
- DIAS, T. S.; FERRIANI, M. G. C.; MARTINS, C. S.; SILVA, K. Z. Auto-imagem corporal de adolescentes atendidos em um programa multidisciplinar de assistência ao

- adolescente obeso. *REVISTA DA ESCOLA DE ENFERMAGEM DA USP*, São Paulo, v. 45, n.2. 2005.
- DULLOO, A. G. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: From pharmaceuticals to functional food ingredients. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 10, p. 866–883, 2011.
- ESPÍNDULA JUNIOR, A. Aspectos Nutricionais e Aptidão Agrícola das Terras para o Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em Agricultura Familiar na Região Serrana do Espírito Santo 2008, **Dissertação** submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo Seropédica, RJ Fevereiro de 2008. 83 p.
- FAGUNDES, R.L.M; COSTA, Y.R. Uso dos alimentos funcionais na alimentação. **Higiene Alimentar**. v.17, n. 108, p.42-48, maio 2003.
- FALLER, A.L.K & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 211-8, 2009.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**; v. 43, n. 1: p. 61-8, 1997
- FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, Antioxidante e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2. 2007.
- FERREIRA, A.V.M; M-G, ZÉLIA; VIANA, J.B; MÁRIO, É.G; BOTION, L. M. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1138–1143, 2014.
- FERREIRA, A.V; MARIO, E.G; PORTO, L.C; ANDRADE, S.P; BOTION, L.M. HighCarbohydrate Diet Selectively Induces Tumor Necrosis Factor-alpha Production in Mice Liver. **Inflammation**, v. 34, n. 2, 2010.

FONSECA, M.J.M.; CHOR, D.; VALENTE, J.G. Hábitos alimentares entre funcionários de banco estatal: padrão de consumo alimentar. **Cad. Saúde Pública**, v. 15, n. 1, p. 29-39, 1999.

FRANCISCO, J.L.; FRANCISCO, R. Fabricação de produtos a base de gengibre. **Dossiê Técnico**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro REDETEC dezembro/2007.

FUJII; T.M.M; MEDEIROS, R.; YAMADA, R. Nutrigenômica e nutrigenética: importantes conceitos para a ciência da nutrição. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v. 35, n. 1, p. 149-166, 2010.

FURUKAWA, S; TAKUYA, F; SHIMABUKURO,M; IWAKI, M; YAMADA, Y; NAKAJIMA, Y; NAKAYAMA, O; MAKISHIMA, M; MATSUDA, M; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GARCÍA, A. A. & CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário de plantas. **REDUCA**, v.2, n.3, p.119-145, 2009.

GERALDO JM, ALFENAS RCG. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. **Arq Bras Endocrinol Metabol**; v. 52(6): p. 951-67, 2008.

GONÇALVES, A.E.S.S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. 88p. 2008. Mestrado (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; RAHMAN, A. A.; GHAFAR; ALI, A. M. Screening of

- Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.403 – 410, 2000.
- HALADE, G.V; EL JAMALI, A; WILLIAMS, P.J; FAJARDO, R.J; FERNANDES, G. Obesity-mediated inflammatory microenvironment stimulates osteoclastogenesis and bone loss in mice. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 1, p. 43–52, 2011.
- HILL, A.A; BOLUS, W.R; HASTY, A.H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. **Immunological Reviews.**, v. 262, n. 1, p. 134–152, 2014.
- HIRAI, S. Takahashi, N; Goto, T; Lin, S; Uemura, T; Yu, R; Kawada, T. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.
- HIRATA, L.L.; SATO, M.L.O’.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.
- HOPPS, E; NOTO, D; CAIMI, G; AVERNA, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72–77, 2010.
- HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. 2012, Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade São Paulo. Disponível em:
<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/Link/Anexos/Biodisponibilidade.pdf>. Acesso em 13/03/2013.
- HORWITZ, W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.
- HUBERT, P. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p.135-139, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. 2006

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde**. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasil, 2013.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LABANCA, R.A.; GLÓRIA, M.B.A.; AFONSO, R.J.C.F. Determinação de carbamato de etila em aguardentes de cana por CG-EM. *Quim. Nova*, v.31, n.7, p.1860-1864, 2008.

LACERDA, D. R; SERAKIDES, R; OCARINO, N. D. M; FERREIRA, A. V. M; MORAES, M. M; BOELONI, J. N; SILVA, J. F; OLIVEIRA, M. C.; BARCELLOS, L. A. M.; RODRIGUES, L. O. C; SOARES, D. D. Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 1, p. 44–56, 2015.

LEONEL, M.; MACEDO, V.C.M. Perfil de consumo de tuberosas na cidade de Botucatu-SP. **Congresso de Extensão Universitária**, 7., 2013, Águas de Lindólia. Anais... São Paulo: PROEX; UNESP, 2013, p. 09762 Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/146981>.

LIANG LU, D.; ZHUANG LI, X.; DAI, F.; FEI KANG, Y.; LI, Y. MENG MA, M. REN, X.R.; WEI DU, G.; LING JIN, X.; ZHOU, B. Influence of side chain structure changes on antioxidant potency of the [6]-gingerol related compounds. **Food Chemistry** 165, 191–197, 2014.

- LIMA, L.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense, camb.*). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- LIU, Y.T.; LU, B.N.; LI-NA, X.U., YIN, L.H.; WANG, X.N.; PENG, J.Y.; LIU, K.X. The antioxidant activity and hypolipidemic activity of the total flavonoids from the fruit of *Rosa laevigata* Michx. *Natural Science*, v. 2, n.3, p.175-183, 2010.
- LOPEZ, B.G.C. Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana. 2014. **Dissertação** apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra em Ciências. 117p.
- MALDANER, L.; JARDIM, I.C.F.S. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica** v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.
- MALTA, D.C.. CEZARIO, Antônio Carlos, MOURA, Lenildo de *et al.* Building surveillance and prevention for chronic non communicable diseases in the national Unified Health System. **Epidemiol. Serv. Saúde**, vol.15, no.3, p.47-65, 2006.
- MARTINS, I. Validação. In: MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 20-39.
- MCARDLE, M. A. FINUCANE, O.M; CONNAUGHTON, R.M; MCMORROW, A.M; ROCHE, H.M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–23, 2013.

MENDES, M. O. - Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – **Resposta Técnica: O cultivo de gengibre** – 2005. Site visitado em 08/10/2013. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>

MENDES, Eugênio Vilaça. 25 anos do Sistema Único de Saúde: resultados e desafios. **Estud. av.**, São Paulo , v. 27, n. 78, p. 27-34, 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000200003&lng=en&nrm=iso>. access on 31 Mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142013000200003>.

NATIVIDADE, M.M.P. Potencial de sucos integrais de uvas produzidas no Vale do São Francisco, Brasil: caracterização físico-química, atividade antioxidante e avaliação sensorial. 2014. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG. 164p.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377–1396, 2016.

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

ORTIZ, Rafael Scorsatto; ANTUNES, Marina Venzon; LINDEN, Rafael. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 2, p. 389-393, 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000200028&lng=en&nrm=iso>. access on 01 Apr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200028>.

- OSBORN, O; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 363–74, 2012.
- PADILHA, P.C.; PINHEIRO, R.L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de cancerologia**, v.50, n.3, p.251-260, 2004.
- PAULA, D.A.C. Estudos metabolômicos de Astreadeceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro e suas correlações através de métodos in silico. 2013. Tese apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências. 118p.
- PAWAR, N.; PAI, S.; NIMBALKAR, M.; DIXIT, G. RP-HPLC analysis of phenolic antioxidant compound 6-gingerol from different ginger cultivars. **Food Chemistry** 126(3) · June 2011.
- PEREIRA, A.L.F.; VIDAL T.F.; CONSTANT, P.B.L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.** v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November 2012.
- PEREIRA, R.C.A.; BEZERRA, M.G.A.; RODRIGUES, T.H.S. Cultivo de Gengibre em Região Litorânea do Ceará. **Comunicado técnico**, Sebrae ISSN 1679-6535 Abril, 2012 Fortaleza, CE.
- PORTO, H.S.M. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos. 2014. **Dissertação** apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Farmacêuticas.

- PRATO. T.S. Influência da secagem sobre compostos medicinais e de pungência do gengibre. 2010. **Dissertação** apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, 89p.
- RAI. S.; MUKHERJEE, K.; MAL, M. WAHILE, A.; SAHA, B.P.; MUKHERJEE, P.K. Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography, **J. Sep. Sci.** 29, 2292–2295, 2006.
- RATNAM, D.; ANKOLA, D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.; KUMAR, M. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Control Release.**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.
- RODRIGUES, M.L.; LIRA, R.K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato Hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.1, p.44-52, jan./abr., 2013.
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Comunicado Técnico On line Embrapa 125. Fortaleza, CE. Dezembro, 2007.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci. Tech. Int.** **2002**, 8, 121
- SANWAL. S.K.; RAI, N.; SINGH, J.; BURAGOHAJ, J. Antioxidant phytochemicals and gingerol content in diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). **Scientia Horticulturae** 124, 280–285, 2010.

- SEON OK AND WOO-SIK JEONG. Optimization of Extraction Conditions for the 6-Shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Prev Nutr Food Sci.** Jun; 17(2): 166–171. 2012.
- SICHERI, R.; COITINHO, D. C.; BRESSAN, J. B. & COUTINHO, W. F., 2000. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 44:227-232.
- SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; SILVA, G.A.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **Saúde no Brasil 4.** Maio, 2011.
- SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SIRIWARDHANA, N; KALUPAHANA, N.S;CEKANNOVA, M; LEMIEUX, M; GREER, B; MOUSTAID-MOUSSA, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613–623, 2013.
- SIQUEIRA, S.L.; KRUSE, M.H.L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Rev. Esc. Enferm. USP.** v. 42(3), p. 584-90, 2008.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação interlaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos. Faculdade de Farmácia, UFMG, 2007 (Tese, Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

- STUBBERUD, K. P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. *J. Chromatogr. A.*, v. 826, p. 95-102, 1998.
- TALHOUK, R.S.; KARAM, C.; FOSTOK, S.; EL-JOUNI, W.; BARBOUR, E.K. Anti-Inflammatory Bioactivities in Plant Extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.10, n.1, p.1-10, 2007.
- TARDIDO, A.P. & FALCÃO, M.C. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. **Rev Bras Nutr Clin.**, v. 21(2), p.117-24, 2006.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- TOMAZELA, J.M. **Mercado interno descobre o gengibre**. O Estado de São Paulo. Junho, 2010. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,mercado-interno-descobre-o-gengibre,567328>. Acessado em: 01/04/2017.
- TORRES, L.M. Caracterização dos parametros tecnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre. 2008. **Dissertação** apresentada a Faculdade e Ciências Agronomicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtencao do título de mestre em Agronomia – Area de Concentracao em Energia na agricultura.120p.
- TOSCANO, C.M. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não-transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 885-895, 2004.
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 159- 171, 1999.

VIEIRA, N.A.; TOMIOTTO, F.N.; MELO, G.P.; MANCHOPE, M.F.; LIMA, N.R.; OLIVEIRA, G.G.; WATANABE, M.A.E. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 149-162, 2014.

VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

WANDERLEY, E. N.& FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185–194, 2010.

WHO (World Health Organization). **Fact sheet: obesity and overweight**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 21 de abril de 2016

WITHROW, D.; ALTER, D. A. The economic burden of obesity worldwide: A systematic review of the direct costs of obesity. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 2, p. 131–141, 2011

WOHLMUTH, W.; LEACH, D.N.; SMITH, M.K.; MYERS, S.P. Gingerol Content of Diploid and Tetraploid Clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **J. Agric. Food Chem.** 53, 5772-5778, 2005.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, v. 609, p. 407 – 413, 1992

TRABALHO EXPERIMENTAL

APRESENTAÇÃO

A parte experimental deste trabalho será apresentada na forma de dois capítulos independentes.

No primeiro capítulo, foi conduzido um estudo visando caracterizar a composição química de gengibre. Foram adquiridas duas amostras de rizomas de gengibre cultivados de forma convencional provenientes dos estados do Espírito Santo e São Paulo e duas amostras de rizomas de cultivo orgânico provenientes da região de Itaúna, no estado de Minas Gerais.

Inicialmente foi realizada a quantificação dos teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e fibra alimentar. Em seguida, foi determinada a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos. Um estudo foi realizado para se determinar as condições adequadas da extração das amostras para obtenção dos extratos e posterior quantificação do 6-gingerol empregando-se a cromatografia líquida de ultra eficiência.

No segundo capítulo, foi avaliada a capacidade anti-inflamatória do gengibre em um estudo experimental utilizando camundongos linhagem *balb-c* com obesidade induzida a partir ingestão de dieta rica em carboidratos. Foram avaliados a tolerância oral à glicose, contagem total de linfócitos no sangue, teores séricos de glicose, colesterol total e triglicérides, presença de inflamação no tecido adiposo por meio da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e presença de macrófagos no tecido, adipocinas, área de adipócitos e consumo de oxigênio.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, QUANTIFICAÇÃO DO 6-GINGEROL E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES CULTIVARES DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*)

RESUMO

O gengibre é uma planta de origem asiática cujo rizoma apresenta uma composição rica em fibras alimentares e substâncias bioativas, sendo muito utilizado no setor alimentício e farmacêutico. Possui elevado potencial terapêutico no combate a diversas patologias devido à ação de vários de seus constituintes, especialmente do gingerol, responsável pela característica pungente do gengibre. Essa substância atua na modulação de macrófagos, agregação antiplaquetária, atividade imunossupressora e inibição de lipopolissacarídeos. Com a finalidade de avaliar se o tipo de cultivo interfere nas características deste rizoma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o gengibre cultivado de forma convencional e orgânico quanto à composição nutricional, atividade antioxidante *in vitro* e teor de 6-gingerol. Os resultados demonstraram que as amostras de cultivo orgânico apresentaram teores mais elevados de fibras alimentares insolúvel e proteínas totais, bem como de 6-gingerol. As amostras apresentaram respectivamente $27,0 \pm 8,1$; $45,1 \pm 11,2$; $64,2 \pm 5,6$; $74,3 \pm 9,5$ mg de 6-gingerol / 100g para as amostras de GENGCONSP, GENGCONVES, GENGORG1 e GENGORG2. Após a dosagem de 6-gingerol e com o objetivo de ingerir uma quantidade necessária que apresente benefícios para a saúde, como ação anti-inflamatória, é necessária uma ingestão de 21 a 43 g de gengibre fresco. Deve-se ainda dar preferência à ingestão de gengibre orgânico, visto que, além da ausência de agrotóxico, ainda apresentou maiores teores de 6-gingerol, fibras alimentares e proteínas.

Palavras chave: gengibre, cultivo convencional, cultivo orgânico, composição centesimal, atividade antioxidante, gengirol

Já a atividade antioxidante presente no gengibre é proveniente da elevada concentração de compostos bioativos principalmente de compostos fenólicos (BEAL, 2006). No entanto, o estudo de propriedades biológicas de espécies da família Zingiberaceae, à qual pertence o gengibre, ainda é muito escassa, principalmente no que se refere às suas propriedades antioxidantes.

Além do sabor característico e das diversas propriedades encontradas no gengibre, principalmente anti-inflamatória e antioxidante, seu consumo tem aumentado significativamente nos últimos anos, por pessoas que visam reduzir o risco de doenças, combater radicais livres e reduzir a inflamação no corpo devido a presença de substâncias nocivas, como poluição, aditivos alimentares e agrotóxicos, que estão presentes diariamente na rotina das pessoas (FAGUNDES & COSTA, 2003; LEONEL & MACEDO, 2013).

Apesar da importância para a saúde da ingestão de alimentos que contém tais substâncias bioativas, é necessário dar preferência aos alimentos que são de cultivo orgânico ou os que são cultivados de maneira mais sustentável possível, já que o uso de agrotóxicos pode causar severos danos para a saúde.

Os efeitos nocivos do uso de agrotóxicos para a saúde humana têm sido objeto de estudos elaborados por profissionais da saúde, os quais têm detectado a presença dessas substâncias em amostras de sangue humano, no leite materno e resíduos presentes em alimentos consumidos pela população em geral, apontando a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas, de câncer, de doenças mentais, de disfunções na reprodutividade humana relacionadas ao uso de agrotóxicos (SIQUEIRA & KRUSE, 2008).

Sabe-se que o Brasil, mantém desde 2008, o título de país que mais consome agrotóxico no mundo. O consumo crônico e contínuo de agrotóxico pode causar doenças como câncer, Parkinson, Alzheimer, depressão, anorexia, insônia, diversas formas de demência, e alterações hormonais (SANTA CATARINA, 2015). Assim, ao consumir alimentos, principalmente os vegetais, deve-se optar sempre, àqueles que são provenientes de cultivo orgânico em detrimento dos alimentos de cultivo convencional.

Nesse cenário, plantas como o gengibre vêm ganhando atenção no Ocidente como uma boa fonte de antioxidantes e como alimento saudável e, portanto, parâmetros como efeitos biológicos e contaminação com agroquímicos tornam-se muito importantes para a maioria dos consumidores. Desta forma, o objetivo deste

trabalho foi caracterizar melhor os rizomas de gengibre, a fim de avaliar seus potenciais efeitos antioxidantes e antiinflamatórios e se o tipo de cultivo convencional e orgânico influencia na composição do rizoma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

As análises foram realizadas empregando-se rizomas de gengibre (*Zingiber officinale*) provenientes de cultivo convencional e orgânico de diferentes estados da região sudeste do Brasil.

Foram utilizados os seguintes reagentes nas análises em estudo hipoclorito de sódio, éter etílico, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, metanol, acetonitrila, acetona, trolox, ABTS, DPPH, sulfato ferroso, FRAP, *folin ciocalteu*.

Foram adquiridos 2 kg de amostras de gengibre de cultivo convencional provenientes dos estados de São Paulo e Espírito Santo. Já as amostras de gengibre de cultivo orgânico foram provenientes da agricultura familiar de dois produtores da cidade de Itaúna, Minas Gerais. Todas as amostras convencionais foram adquiridas em comércios da cidade de Belo Horizonte e as informações do local de cultivo foram fornecidas pelo representante do próprio comércio. Já as amostras orgânicas foram coletadas no próprio local de cultivo, direto do produtor. As quatro amostras foram adquiridas no mês de maio de 2014 e o tempo de cultivo das mesmas foi de 8 meses.

As amostras foram identificadas de acordo com o apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Codificação das amostras de gengibre em estudo, de acordo com a região e o tipo de cultivo

Amostra	Código
Gengibre convencional proveniente de São Paulo	GENGCONVSP
Gengibre convencional proveniente do Espírito Santo	GENGCONVES
Gengibre orgânico proveniente de Itaúna produtor 1	GENGORG1
Gengibre orgânico proveniente de Itaúna produtor 2	GENGORG2

2.2. MÉTODOS

2.2.1 Preparo das amostras de gengibre

As amostras de rizomas de gengibre foram lavadas com água deionizada, sanitizadas com hipoclorito de sódio (5 mg/L de cloro ativo) por 15 minutos, secas em temperatura ambiente e divididas em seis lotes.

Cada lote foi processado e triturado em multiprocessador (Philco®, All in One, Brasil) e as amostras processadas foram armazenadas em frascos de vidros devidamente higienizados e fechados hermeticamente a temperatura de - 20°C, para posterior análise.

2.2.2. Determinação físico-química

2.2.2.1. Composição centesimal das amostras

As análises da composição química das amostras foram realizadas de acordo com os métodos descritos na AOAC (2012). O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa ventilada (Quimis, Q31M242, Diadema, Brasil) a 105 °C, até peso constante. A determinação dos lipídeos totais foi realizada em extrator de matéria graxa (Quimis, Q308G26, Diadema, Brasil), empregando-se éter etílico como solvente extrator (IAL, 1985). Para a quantificação das proteínas totais, foi empregado o digestor (Gerhardt Bonn, TR, Alemanha) e destilador de proteínas (Marconi, MA036, Piracicaba, Brasil), seguindo a técnica de micro-kjedahl, empregando-se o fator de conversão de nitrogênio de 6,25. Na análise do teor de cinzas totais, as amostras foram incineradas em mufla (Coel, UL 1400, São Paulo, Brasil) a 550 °C. A determinação do teor de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi realizada empregando-se a digestão enzimática (alfa-amilase termorresistente, pepsina e pancreatina) com posterior filtração e precipitação da fibra solúvel com álcool etílico. Os cadinhos utilizados na filtração foram secos em estufa ventilada (Quimis, Q31M242, Diadema, Brasil) a 105 °C overnight e pesados. Parte dos cadinhos foi incinerada em mufla (Coel, UL 1400, São Paulo, Brasil) a 550 °C e parte foi utilizada para determinação das proteínas não digeridas empregando-se a técnica de micro-kjedahl nas mesmas condições descritas

acima (PROSKY *et al.*, 1992). O teor de carboidratos foi calculado por diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e fibra alimentar.

2.2.3. Atividade antioxidante e Compostos fenólicos

2.2.3.1. Preparo dos extratos

Foram pesados 300 mg de cada lote de amostra de gengibre e colocadas em eppendorf com posterior adição de 1 mL de solução de metanol a 50%, agitados em vortex (LabFlex, QL-901, Brasil) por 30 segundos e colocados em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos (Jouan, BR4i, França) foram centrifugados por 15 minutos a $32.700 \times g$ sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante obtido foi recolhido e armazenado em balões de 10 mL revestidos com papel alumínio. A partir do resíduo da primeira extração, adicionou-se 1 mL de solução de acetona a 70% em cada eppendorf repetindo-se as etapas de agitação e repouso. Este procedimento foi repetido 2 vezes e os sobrenadantes recolhidos foram transferidos para o mesmo balão volumétrico de 10 mL. Completou-se os balões com água destilada e o extrato foi utilizado para determinar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos (RUFINO *et al.* 2007a,b,c).

A partir do extrato obtido foram preparadas três diferentes diluições de cada extrato, com concentrações de 3000, 6000 e 9000 mg/L. Cada extração foi realizada em triplicata.

2.2.3.2. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre ABTS

Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 µL de extrato de amostra e 180 µL de solução ABTS. Foi utilizada uma curva de 5 pontos de solução (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) de trolox e a leitura foi realizada após 6 minutos da adição das soluções em espectrofotômetro (Spectramax Plus, 384, Molecular Device, São Paulo) a 734 nm. Foi utilizado álcool etílico como branco (RUFINO *et al.* 2007a).

2.2.3.3. Determinação da Atividade Antioxidante Total pela Captura do Radical Livre DPPH

Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 25 µL de extrato de amostra e 243 µL de solução DPPH. Foi utilizada uma curva de 8 pontos em diferentes concentrações de DPPH e utilizado álcool metílico como branco. Em um dos pontos da placa foi pipetado a solução controle (metanol:acetona:água, 1:1:0,5). A leitura foi realizada a cada minuto em espectrofotômetro (Spectramax Plus, 384, Molecular Device, São Paulo) a 515 nm até a estabilização da solução controle (tempo EC₅₀) (RUFINO et al. 2007b).

2.2.3.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Em uma microplaca de 96 poços, foram pipetados 25 µL de extrato de amostra e 230 µL de radical FRAP. Foi utilizada uma curva de 5 pontos de sulfato ferroso em diferentes concentrações e utilizado radical FRAP como branco como branco. A placa foi deixada em repouso por 30 minutos sob o abrigo da luz e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectramax Plus, 384, Molecular Device, São Paulo) a 595 nm (RUFINO et al. 2007c).

2.2.3.5. Determinação do teor de Compostos Fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos, adicionou-se 500 µL de cada extrato de gengibre obtido no item 2.2.3.1. em eppendorfs devidamente identificados, com posterior adição de 200 µL de solução de *Folin Ciocalteu* a 20%. Após 3 minutos de repouso, foram adicionados 300 µL de solução saturada de NaHCO₃, com posterior agitação. Os tubos foram incubados por 30 minutos sob abrigo da luz e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectramax Plus, 384, Molecular Device, São Paulo) a 720 nm. Foi realizada uma curva de 10 pontos com diferentes concentrações de ácido gálico (0,0005; 0,001; 0,0015; 0,002; 0,0025; 0,003; 0,0035; 0,004; 0,0045; 0,005 mg/mL) e água destilada como branco (SINGLETON et al., 1999).

A partir da leitura da curva, foi calculada a equação da reta.

2.2.4. Otimização do método de extração do 6-gingerol

No processo de otimização foram avaliados diversos tipos de extração das amostras de gengibre, variando-se a concentração das amostras e dos solventes. Como parâmetro de comparação do teor de gingerol nas amostras, foi construída uma curva com um padrão de 6-gingerol (Sigma®), o principal composto bioativo presente no gengibre. Para avaliação do teor de 6-gingerol nas amostras de gengibre, os rizomas foram tratados conforme item 2.2.1. e posteriormente liofilizadas em Liofilizador L101(Liotop®), com posterior avaliação da umidade.

A escolha dos tipos de solventes, processo de extração e método de corrida foi determinada a partir de outros métodos que dosaram o teor de gingerol em rizomas de gengibre (SEAN OK & SIK JEONG, 2012; PAWAR et al. 2011; SANWAL et al. 2010; WOHLMUTH et al. 2005).

Não foram encontrados trabalhos que dosaram o teor de gingerol em cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Assim, foram feitos vários testes de otimização de extração e leitura em CLAE a fim de se adaptar as melhores condições analíticas.

Inicialmente, preparou-se uma solução de 100 µg/mL do padrão de 6-gingerol (Sigma®) em metanol e esta foi submetida à análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector DAD a 280 nm (Walters®, USA), em fluxo 0,5 ml/min, fase móvel gradiente de acetonitrila : água (45:55 até 90:10 durante 48 minutos), coluna C18, realizando assim uma varredura para avaliar o perfil da amostra.

Assim, 20 µL do extrato de gengibre obtido foi analisado nas mesmas condições do padrão. Comparando-se as áreas dos picos das amostras com a registrada para o padrão, a melhor condição de extração foi obtida empregando-se metanol como solvente extrator, seguido de agitação em ultra-turrax e centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos. Após determinar a melhor condição de extração, utilizou-se o software (*Empower*®) do equipamento do equipamento de UPLC (Walters®, USA), para adequação das condições cromatográficas a serem utilizadas no UPLC. A partir da padronização das condições em UPLC, realizou-se assim, a verificação da estabilidade, pureza de pico e precisão do método e posteriormente o doseamento do 6-gingerol em amostras de gengibre orgânico e convencional.

2.2.5. Quantificação do 6-gingerol

Após a otimização da extração, foi realizada a quantificação do 6-gingerol nas amostras em estudo. Para avaliar a veracidade dos dados, alguns parâmetros como pureza de pico, linearidade, efeitos de matriz, exatidão e precisão, foram avaliados. A adequação para uso do método foi avaliada, em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos. O procedimento adotado foi baseado em um delineamento experimental simples e testes estatísticos robustos, incluindo verificações das premissas relacionadas a cada teste (SOUZA et al., 2005, SOUZA et al., 2007a, SOUZA et al., 2007b) O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

A pureza do pico demonstra a homogeneidade espectral do pico de forma a garantir que o pico do ativo é atribuído a um único componente. A pureza do pico cromatográfico é determinada após varredura do padrão e da amostra (extrato de gengibre) empregando detector de DAD. O pico do espectro é considerado homogêneo quando o ângulo de pureza for menor que o ângulo do limite (ERMER & MILLER, 2005).

A avaliação da linearidade foi conduzida conforme procedimentos propostos por SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Uma curva de calibração foi preparada, nos níveis de concentração 30, 60, 90, 120, 150 e 180 $\mu\text{g/mL}$ de gingerol sendo três replicatas independentes de cada nível. As soluções foram analisadas em ordem aleatória. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear, por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade (DRAPER & SMITH, 1998).

Para verificação dos efeitos de matriz, duas curvas de calibração foram estudadas nos níveis de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 $\mu\text{g/mL}$ de gingerol, sendo cada nível em três replicatas independentes, e analisadas em ordem aleatória, na mesma bateria analítica. A curva usual do analito foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade e adicionou-se em cada ponto da curva 100 μL de extrato de gengibre, totalizando um volume final de 500 μL . O extrato de gengibre foi preparado a partir da pesagem de 200 mg de amostra de gengibre liofilizada e adição de 10 mL de metanol, seguido de agitação em ultra-turrax por 5 minutos e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro de 0,22 μm . Uma vez comprovadas as premissas e o ajuste ao modelo

linear, a inclinação e a interseção obtidas para a curva usual foram comparadas com aquelas calculadas para a curva em matriz. A premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de F (SNEDECOR & COCHRAN, 1989), para verificar se inclinações e interseções seriam comparadas pelo teste de t com as variâncias combinadas ou distintas (ARMITAGE & BERRY, 1994).

Para analisar a veracidade e precisão, foram preparadas doze replicatas independentes de amostras de gengibre, totalizando 3 níveis de concentração (amostra nativa e dois níveis de adição). Para cada nível de concentração estudado, as replicatas foram divididas em 4 baterias analíticas, avaliadas em dias diferentes por 2 analistas. Uma curva de calibração usual foi preparada para calcular a concentração de analito nas amostras. A avaliação da veracidade e precisão foi feita conforme procedimento descrito por Souza et al. (2007).

Para a determinação do teor de 6-gingerol presente no gengibre, as amostras inicialmente foram processadas em moinho de facas e posteriormente liofilizadas em Liofilizador L101(Liotop®). A partir do processo de liofilização, foi calculado o teor de umidade da amostra para posterior cálculo de 6-gingerol no gengibre fresco. Pesou-se 200 mg de amostra de gengibre liofilizado com posterior adição de 10 mL de metanol. A mistura foi homogeneizada em ultraturrax por 5 minutos. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 20 minutos a $3.600 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e analisado no cromatógrafo líquido de ultra pressão (UPLC) com detector DAD a 280 nm (Walters®, USA), em fluxo 0,3 ml/min, fase móvel gradiente de acetonitrila : água (40:60 até 90:10 durante 16 minutos). Assim, 1 μL do extrato obtido foi analisado nas mesmas condições do padrão em uma coluna C18 com fase reversa (modelo Acquity UPLC – Waters, diâmetro 1,7 micrômetros, tamanho: 2,1 x 100 mm).

2.3. Análise estatística

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA fator único) e o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparar os valores encontrados em todas as análises (PIMENTEL-GOMES, 1990).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal

Os resultados da composição centesimal das amostras analisadas, expressos em base seca, estão apresentados na Tabela 2

TABELA 2

Composição química em base seca de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*)

Composição Química	GENGCONVSP	GENGCONVES	GENGORG1	GENGORG2
Cinzas	6,37 ^b ± 0,88	7,66 ^a ± 0,27	5,91 ^{bc} ± 0,36	5,49 ^c ± 0,49
Lipídeos	2,04 ^a ± 0,77	2,54 ^a ± 0,43	1,11 ^b ± 0,19	1,12 ^b ± 0,45
Proteínas	10,40 ^c ± 1,03	14,2 ^{ab} ± 2,57	13,3 ^b ± 1,79	16,5 ^a ± 2,69
Fibra alimentar	49,17 ^a ± 2,82	33,83 ^b ± 16,87	55,80 ^a ± 2,89	52,67 ^a ± 4,16
Carboidrato	32,02	41,77	23,88	24,22

¹ O teor de carboidratos foi calculado por diferença. Valores médios ± desvio padrão (n = 6) com subscritos iguais abc na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 5$; teste de Tukey). (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

Os teores de umidade determinados para o gengibre convencional proveniente de São Paulo, gengibre convencional proveniente do Espírito Santo, gengibre orgânico produtor 1 e gengibre orgânico produtor 2 foram de 85,00^a; 86,25^a; 72,29^b e 72,43^b%, respectivamente, sendo que as amostras de gengibre de cultivo convencional apresentaram teores de umidade significativamente maiores que as amostras de gengibre orgânico.

Em relação à análise de cinzas, o maior teor foi encontrado para a amostra de gengibre convencional proveniente do Espírito Santo (7,66%), sendo significativamente maior que as amostras orgânicas provenientes de ambos os produtores. Além disso, pode-se dizer que entre as amostras de cultivo convencional, a amostra produzida no Espírito Santo apresentou teores significativamente maiores que o teor de cinzas do gengibre proveniente em São Paulo.

Quanto ao teor de lipídeos, as amostras de cultivo convencional apresentaram teores significativamente maiores que as de cultivo orgânico, não havendo diferença dentro do mesmo tipo de cultivo.

Na análise de proteínas, a amostra de maior teor foi a de gengibre orgânico GENGORG2, não diferindo significativamente da amostra convencional proveniente do estado do Espírito Santo. A amostra convencional proveniente de São Paulo apresentou significativamente o menor teor de proteínas quando comparado com as demais amostras em estudo.

Em um trabalho realizado por Adel & Prakash (2010) foi encontrado em base seca para rizomas de gengibre, 5,98% de proteína, 4,37% de lipídeos totais e 4,53% de cinzas. Ao comparar estes valores com os encontrados neste presente trabalho, todos os nutrientes aqui encontrados apresentaram maiores teores com exceção do teor de lipídeos.

Já El-Ghorad (2010), encontrou para o gengibre em base seca, 6,1% de cinzas, 7,2% de proteínas e 1,4% de gorduras totais, sendo o teor de gorduras, menor que o do presente estudo.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) ao avaliar a composição centesimal de gengibre encontrou 78,89% de umidade e 1,82, 0,75 e 0,77g de proteínas, lipídeos e cinzas respectivamente para 100g de gengibre fresco (USDA, 2008).

Na Tabela 3 estão apresentados os dados dos teores de fibra alimentar total e suas frações solúvel e insolúvel presentes nas quatro amostras estudadas.

TABELA 3

Teores de fibras solúvel, insolúvel e alimentar total presentes em base seca presente nas quatro diferentes amostras de gengibre (*Zingiber officinale*)

Fibras	GENGCONVSP	GENGCONVES	GENGORG1	GENGORG2
Fibra alimentar	49,17 ^a ± 2,82	33,83 ^b ± 16,87	55,80 ^a ± 2,89	52,67 ^a ± 4,16
Fibra solúvel	4,62 ^b ± 0,48	3,52 ^b ± 1,43	6,44 ^a ± 1,4	6,8 ^a ± 1,43
Fibra insolúvel	44,55 ^a ± 3,23	30,30 ^b ± 17,10	49,35 ^a ± 2,45	45,86 ^a ± 4,13

Valores médios ± desvio padrão (n = 6) com subscritos iguais abc na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 5$; teste de Tukey (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

As amostras de gengibre apresentaram elevadas porcentagens de fibra alimentar, com teores variando de 33,83% a 55,80% para o gengibre convencional e o gengibre orgânico, respectivamente. Em todas as amostras analisadas, houve um predomínio de fibra alimentar do tipo insolúvel, não tendo sido encontradas diferenças significativas dentro das amostras orgânicas. O mesmo vale para as fibras solúveis, não havendo diferenças entre o mesmo tipo de cultivo, sendo as amostras de cultivo orgânico apresentando maiores teores de fibra solúvel quando comparado com os cultivares convencionais.

Adel & Prakash (2010) ao analisarem os teores de fibras alimentares de rizomas de gengibre, encontraram valores semelhantes de fibras insolúvel (27,65%) quando comparado com o presente trabalho, apresentando, no entanto, valores maiores de fibra solúvel (30,0%).

Devido ao elevado teor de fibras alimentares presente nas amostras de gengibre, os mesmos podem ser considerados alimentos com alto teor de fibras de acordo com a RDC nº 54 de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Tal portaria estabelece que a presença mínima de 6 g de fibra alimentar total por 100 g de alimento o caracteriza como alto teor de fibra alimentar. Neste trabalho foi encontrado um teor maior que 30 g de fibra alimentar por 100 g de gengibre para todas as amostras estudadas, sendo então todas as amostras consideradas alimentos com alto teor de fibras.

As fibras alimentares têm recebido bastante atenção nas últimas décadas devido às suas importantes funções no organismo humano. Estas apresentam capacidade de alterar o trânsito intestinal, reduzindo metabólitos tóxicos, controlando e reduzindo a diarreia ou constipação intestinal e alterando a microflora intestinal. Além disso, diminuem o risco de câncer de cólon, reduzem os níveis de colesterol e controlam a pressão arterial reduzindo o risco de obesidade e diabetes insulino-dependente e a intolerância à lactose (ANJO, 2004; FONTANARI, 2010). Segundo Mello & Laaksonen (2009) evidências convincentes, a partir de estudos epidemiológicos, suportam um papel para os produtos alimentícios à base de grãos integrais e para as fontes de fibras insolúveis na prevenção do Diabetes Melitus tipo 2.

As fibras solúveis tendem a formar géis em contato com água, aumentando a viscosidade dos alimentos parcialmente digeridos no estômago. Tais fibras diminuem a absorção de ácidos biliares e têm atividades hipocolesterolêmicas. Quanto ao

metabolismo lipídico, parecem diminuir os níveis de triglicerídeos, colesterol e reduzir a insulinemia (MORAES & COLLA, 2006).

Já as fibras insolúveis permanecem intactas através de todo o trato gastrointestinal e apresentam como funções funcionais o incremento do bolo fecal e o estímulo da motilidade intestinal, o aumento da excreção de ácidos biliares e propriedades antioxidantes e hipocolesterolêmicas (MORAES & COLLA, 2006).

3.2. Teor de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante do gengibre.

A Figura 1 apresenta o teor de compostos fenólicos presente nas quatro amostras de gengibre estudadas. Foram encontrados, $16,2 \pm 1,5$; $14,9 \pm 1,5$; $15,2 \pm 1,03$; $14,3 \pm 0,7$ mg de equivalente de ácido gálico (EAG) em 100g de gengibre, nas amostras de GENGCONVSP, GENGCONVES, GENGORG1, GENGORG2 respectivamente. Não houve diferença entre as amostras.

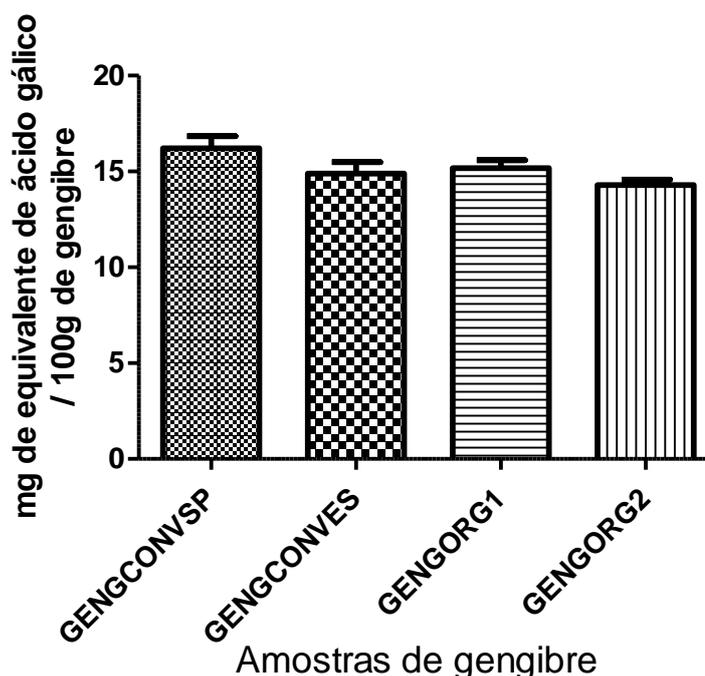


FIGURA 1. Teor de compostos fenólicos em mg de equivalente de ácido gálico em 100g de gengibre. (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

El-Ghorab e colaboradores (2010) encontram 87,5 mg para amostras de gengibre fresco e 67,5 mg de equivalente de ácido gálico em 100g de gengibre seco, valores superiores aos encontrados neste trabalho. Essa diferença pode ser justificada pelo tipo de extração, já que no trabalho de El-Ghorab e colaboradores (2010) a extração foi realizada com metanol e neste trabalho em metanol e acetona.

Em um estudo realizado por Vieira e colaboradores (2011), foi determinado o teor de compostos fenólicos de frutas como acerola, bacuri, cajá, caju, goiaba e tamarindo, encontrando valores de 449,63; 7,23; 6,62; 165,07; 20,21 e 23,35 mg de equivalente de ácido gálico por 100g das frutas analisadas respectivamente.

Ao comparar estes dados com os do presente estudo, observa-se que o gengibre apresenta maior de teor de compostos fenólicos comparando-se com o bacuri e o cajá e teores semelhantes aos da goiaba e ao do tamarindo.

A atividade antioxidante total foi avaliada pelos métodos de captura do radical livre ABTS, DPPH e pelo método de redução do ferro (FRAP).

Pelo método de ABTS, foram encontrados valores de $1.373.096 \pm 223625$; $1.514.977 \pm 85817$; $1.674.408 \pm 162515$; $1.628.640 \pm 113034$ μmol de trolox/g de gengibre, para as amostras GENGCONVSP, GENGCONVES, GENGORG1 e GENGIORG2, conforme observado na Figura 2. Foi observado diferença significativa entre as amostras convencionais e as orgânicas, sendo estas últimas significativamente maiores que as amostras convencionais, como pode ser observado no gráfico abaixo.

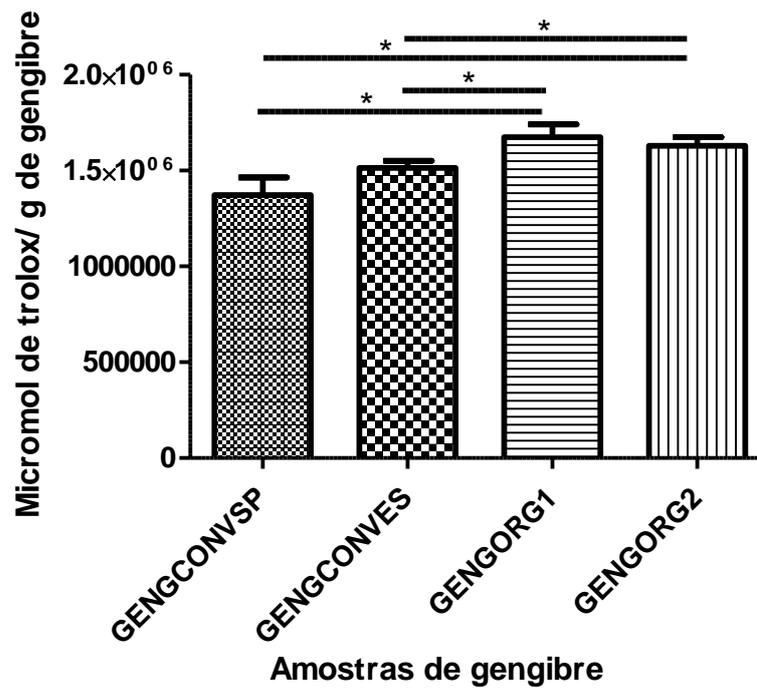


FIGURA 2. Atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS. (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2).

Quanto a determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP), observa-se para as amostras GENGCONVSP, GENGCONVES, GENGORG1 e GENGORG2, valores de $18,9 \pm 5,14$; $21,4 \pm 4,23$; $19,8 \pm 2,7$; $24,5 \pm 1,7$ μM sulfato ferroso/g de gengibre. Os valores da atividade antioxidante determinados para a amostra orgânica do produtor 2 foi significativamente maior que as amostras de gengibre orgânico produtor 1 e gengibre convencional proveniente de São Paulo, empregando-se esta metodologia. A Figura abaixo apresenta a atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).

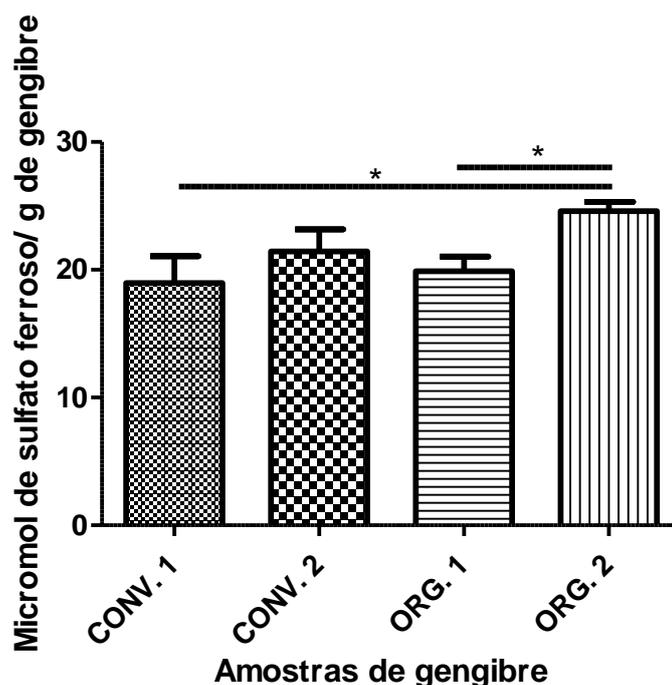


FIGURA 3. Atividade antioxidante total pelo método de Redução do Ferro (FRAP). Valores médios \pm desvio padrão ($n = 6$) com subscritos iguais abc na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 5$; teste de Tukey). (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

Já a determinação da atividade antioxidante pela capturada do radical DPPH está demonstrada na figura abaixo (FIGURA 4).

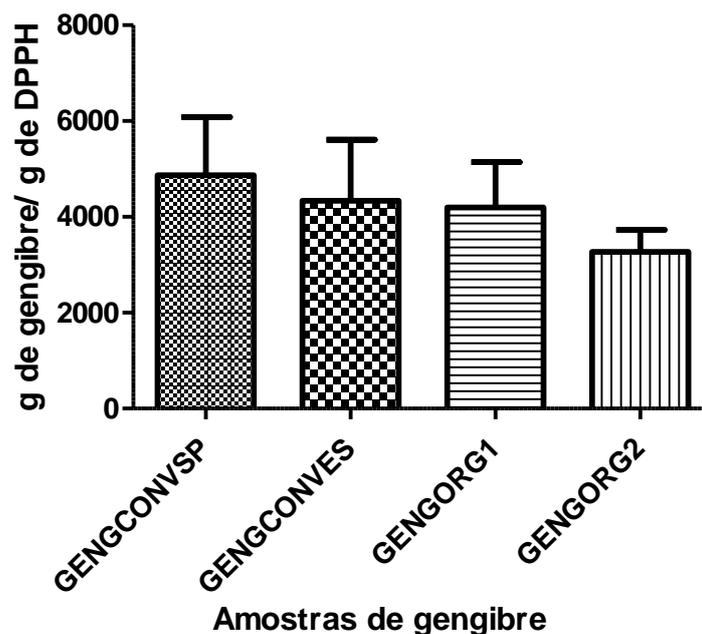


FIGURA 4. Atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH. Valores médios \pm desvio padrão (n = 6) com subscritos iguais abc na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 5$; teste de Tukey). (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

Foram encontrados valores de $4868,89 \pm 2430$; $4335,14 \pm 2549$; $4197,32 \pm 1886$; $3269,09 \pm 796,85$ g de gengibre por g de DPP respectivamente para as amostras GENGCONVSP, GENGCONVES, GENGORG1 e GENGIORG2. Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras quanto a atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH.

3.3. Otimização do método de extração para determinação de 6-gingerol

Foram realizados vários testes de extração com diferentes solventes, tempos de extração e parâmetros de leitura, para se determinar o melhor método de extração que apresentou maior valor de absorvância. Assim, os melhores parâmetros para a extração foram o uso de metanol como solvente, uso de ultraturrax e 20 minutos de centrifugação a $3600 \times g$.

3.4. Quantificação e determinação do 6-gingerol

A validação analítica é necessária para avaliar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

Um das formas de avaliar se o analito foi identificado corretamente nas suas diferentes formas ou na presença de interferentes é avaliando a pureza do pico cromatográfico. A pureza do pico e a seletividade foi determinada após varredura do padrão e da amostra (extrato de gengibre) empregando detector de DAD. O pico do espectro é considerado homogêneo quando o ângulo de pureza for menor que o ângulo do limite.

Pode-se observar na figura abaixo, um exemplo de um gráfico com cálculo da pureza de pico para o padrão de 6-gingerol na concentração de 150 µg/mL.

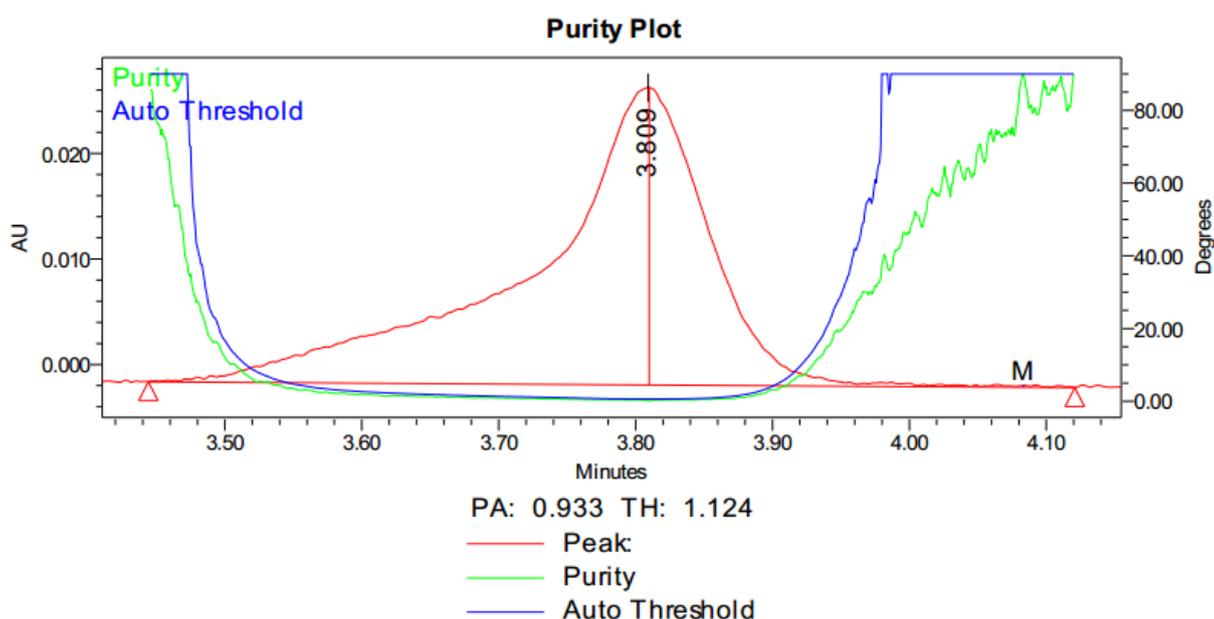


FIGURA 5. Avaliação da pureza de pico do padrão 6-gingerol (150 µg/mL)

Na Figura 5, observa-se no eixo y do lado esquerdo os valores de absorvância, no eixo y do lado direito os graus de contraste do espectro e no eixo x o tempo de corrida em minutos.

A linha vermelha representa o pico do padrão de 6-gingerol, a linha verde representa o ângulo de pureza e a linha azul representa a pureza do limite. Como já dito anteriormente, o espectro é considerado homogêneo quando o valor do ângulo de pureza for menor que o limite. Assim, conclui-se que o gráfico acima apresenta espectro homogêneo já o valor do ângulo de pureza (0,933) é menor que o limite

(1,124), indicando que o pico apresentado é de apenas um analito, não havendo sobreposição de mais de uma substância no mesmo pico.

Essa mesma situação foi observada em todas as concentrações do padrão de 6-gingerol analisadas e também nas amostras como pode ser observado na Figura 6.

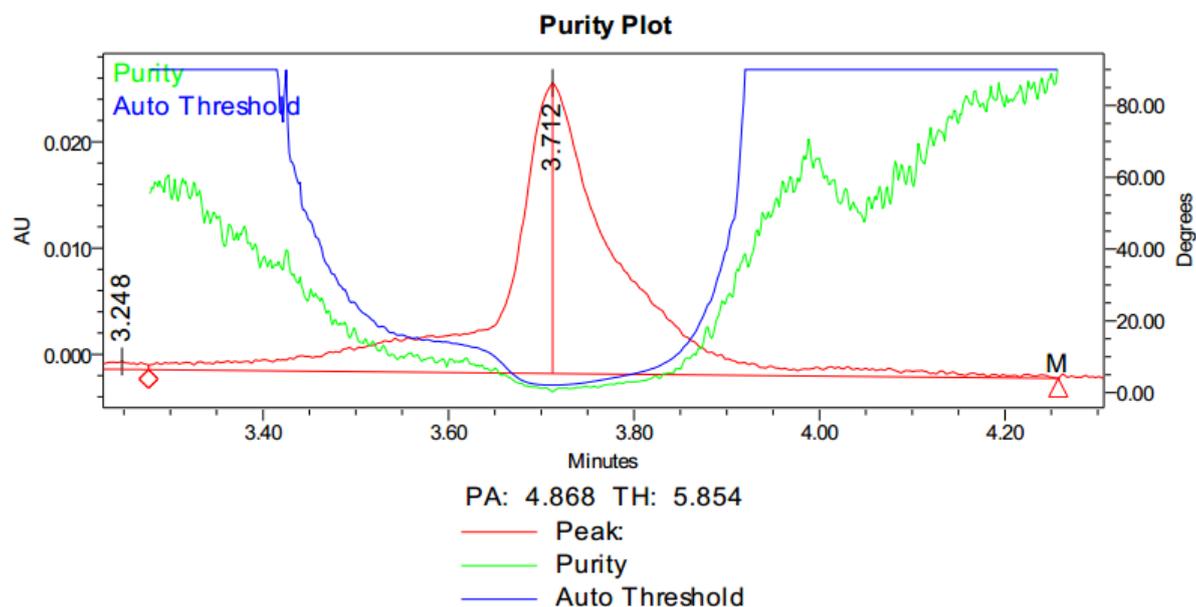


FIGURA 6. Avaliação da pureza de pico do extrato de gengibre.

As análises apresentadas abaixo foram utilizadas para avaliar a linearidade, seletividade, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão.

Pelo teste de resíduos padronizados Jackknife foi identificada a presença de quatro *outliers* que foram devidamente removidos. No teste de Ryan-Joiner obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9860, com valor crítico de 0,9481 ($p > 0,10$), indicando que os resíduos seguem a distribuição normal. A independência dos dados foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson, cuja estatística calculada foi de 1,67 ($p > 0,05$). A distribuição dos resíduos está representada na Figura 7, na qual pode-se observar a independência dos dados.

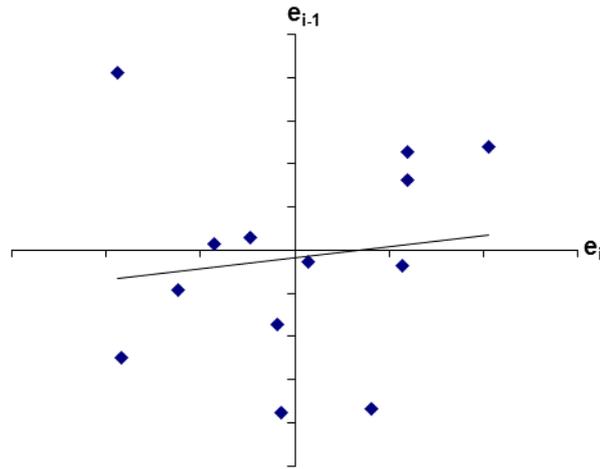


FIGURA 7. Gráfico de Durbin-Watson da curva usual de ácido gálico. e_i (resíduo da regressão);

A estatística t de Levene (0,87) não foi significativa ($p > 0,05$), comprovando a homoscedasticidade, ou seja, a variabilidade dos resíduos nas concentrações estudadas foi constante (Figura 8).

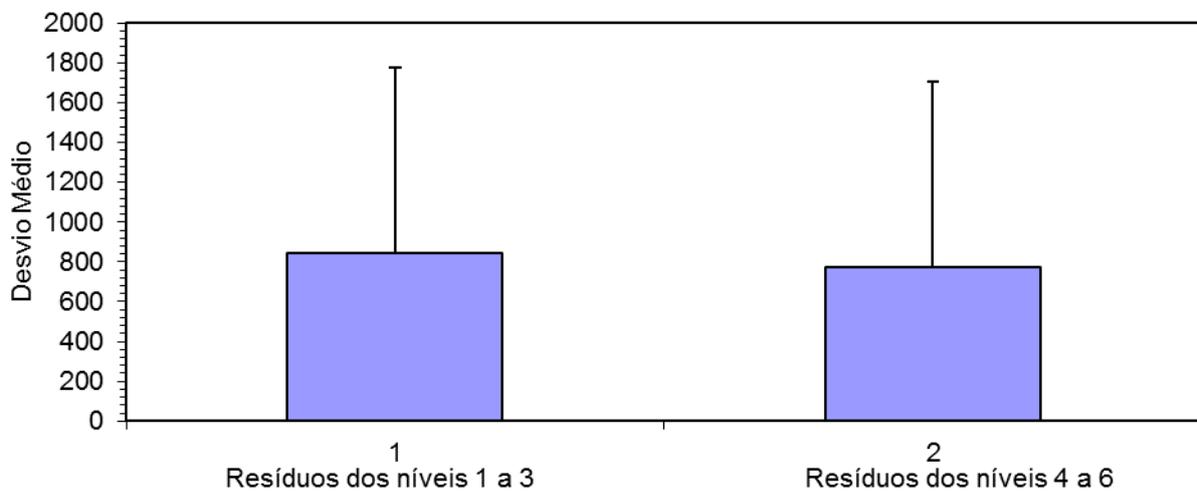


FIGURA 8. Demonstração gráfica da homogeneidade das variâncias da curva usual de gengibre obtida pelo teste de Levene modificado

Os dados foram submetidos à ANOVA, na qual foi confirmada a significância da regressão ($p < 0,001$) e a ausência de desvio significativo da linearidade ($p > 0,05$). Portanto, os parâmetros avaliados confirmaram a linearidade da curva usual na faixa de concentração de analito de 30 a 180 $\mu\text{g/mL}$ -1.

Na Figura 9 está representado o gráfico final da linearidade da curva usual de gingerol, bem como a equação da reta e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2).

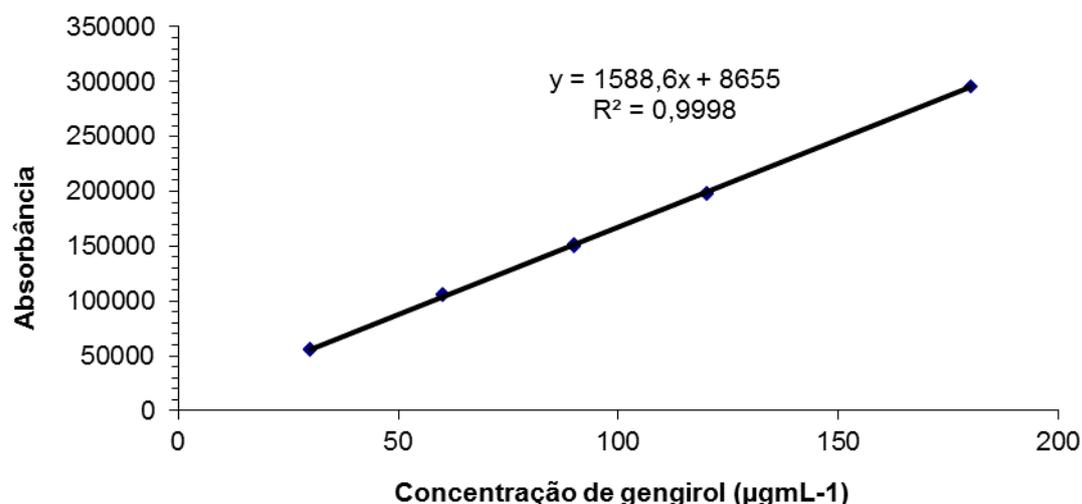


FIGURA 9. Gráfico final da linearidade da curva usual de 6-gingerol

Todas as premissas da regressão linear foram confirmadas para a curva usual e matrizada construídas com seis níveis de concentração de 6-gingerol (30 a 180 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A comparação da inclinação das retas pelo Teste de t não apontou efeito de matriz ($p > 0,05$). Na Tabela 4 são apresentados os dados referentes ao estudo da linearidade nas curvas de calibração com seis níveis de concentração.

TABELA 4

Dados referentes ao estudo da linearidade das curvas de calibração

Estatística	Curva Usual	Curva Matrizada
Número de observações (n)	14	18
<i>Normalidade</i>		
Coeficiente de correlação (R)	0,9860	0,9668
R crítico	0,9061	0,9228
Significância (p)	p > 0,10	p > 0,10
<i>Independência</i>		
Estatística de Durbin-Watson (d)	1,67	1,47
Significância (p)	P > 0,05	P > 0,05
<i>Homoscedasticidade</i>		
Estatística t de Levene (t1)	0,8704	0,1003
Significância (p)	P > 0,05	P > 0,05
<i>Regressão</i>		
F (razão entre variâncias)	53104,33	164,58
F crítico	4,74	4,49
Significância (p)	p < 0,001	p < 0,001
<i>Desvio da Linearidade</i>		
F (razão entre variâncias)	2,48	2,69
F crítico	3,83	3,25
Significância (p)	p > 0,05	p > 0,05

O teste de Ryan-Joiner confirmou a normalidade dos resíduos ($p > 0,10$). As estatísticas calculadas no teste de Durbin-Watson indicaram a ausência de auto-correlação entre os resíduos da curva usual e matrizada ($p > 0,05$ em ambas as curvas). Homoscedasticidade foi evidenciada pelo teste de Levene, cujas estatísticas calculadas não foram significativas ($p > 0,05$).

A ANOVA dos dados confirmou a significância da regressão ($p < 0,001$) e a ausência de desvio de linearidade ($p > 0,05$). O teste de F foi aplicado para verificar a homogeneidade das variâncias das duas curvas. O valor de F calculado (2,31) foi menor que o $F_{crítico}$ (2,59), demonstrando que as variâncias são homogêneas ($p > 0,05$). Dessa forma, o teste de t com variância combinada foi realizado para comparar a inclinação das retas. Por este teste evidenciou-se que a diferença entre a inclinação das retas não foi significativa ($p > 0,05$).

A estatística de t calculada ($t_b = 0,38$) foi menor que o valor crítico de t ($t_{crítico} = 2,04$), confirmando a ausência de efeito de matriz. Portanto, a curva de gingerol em solvente pode ser usada para estimar a quantidade de gingerol em amostras de gengibre.

Os dados de recuperação nos dois níveis de adição de analito estudados (nível 1 e nível 2) foram submetidos ao teste de Grubbs, que indicou a ausência

de *outliers* ($p > 0,05$). A média da recuperação observada nos níveis de adição 1 e 2 foram de 88,15% e 91,5%, respectivamente. Estes resultados situam-se na faixa de aceitabilidade de 80% a 110% estabelecida pela European Commission (EC, 2002), indicando veracidade adequada nos níveis de concentração estudados.

Em relação à precisão do método, antes da estimativa dos DPRr e DPRR por ANOVA foi feita a verificação das premissas da análise de variância, que confirmou que os dados seguiam a distribuição normal e apresentavam variâncias homogêneas. Os valores de DPRr e DPRR foram menores que seus respectivos valores críticos, indicando a precisão do método.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que validaram a quantificação do gingerol presente em rizomas de gengibre, empregando-se cromatografia líquida ultra eficiente ou outra técnica de análise quantitativa.

3.4.4. Teor de 6-gingerol

As amostras de gengibre de cultivo orgânico apresentaram teores de 6-gingerol significativamente maiores quando comparadas as amostras de cultivo convencional, não havendo diferença entre as amostras dentro do mesmo cultivo ($27,0 \pm 8,1$; $45,1 \pm 11,2$; $64,2 \pm 5,6$; $74,3 \pm 9,5$ mg de 6-gingerol / 100g de amostras frescas de gengibre convencional cultivada em São Paulo, gengibre convencional cultivada no Espírito Santo, gengibre orgânico produtor 1 e gengibre orgânico produtor 2), conforme observado na Figura 10.

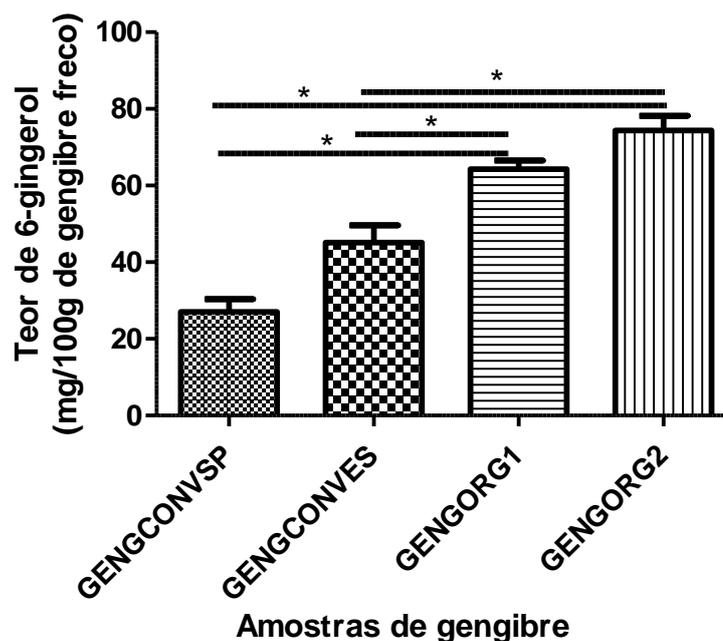


FIGURA 10. Teor 6-gingerol em amostras de gengibre (mg de gingerol / 100g de gengibre fresco). Valores médios \pm desvio padrão (n = 6) com subscritos iguais abc na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 5$; teste de Tukey). (GENGCONVSP: gengibre de cultivo convencional proveniente de São Paulo; GENGCONVES: gengibre de cultivo convencional proveniente do Espírito Santo; GENGORG1: gengibre de cultivo orgânico produtor 1; GENGORG2: gengibre de cultivo orgânico produtor 2)

De acordo com a Instrução Normativa de 02 de maio de 2014, a Vigilância Sanitária recomenda a ingestão diária de 4 a 16 mg de gingeróis (6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol) para crianças acima de 6 anos de idade e de 16 a 32 mg de gingeróis para adultos (BRASIL, 2014).

Neste presente trabalho, foi determinado apenas o teor de 6-gingerol, não sendo quantificada o teor total de gingeróis.

Considerando a amostra de gengibre orgânica de maior concentração de 6-gingerol (74,3mg/100g) deste estudo, um adulto precisaria comer em torno de 21 a 43 g de gengibre fresco.

Além disso, esta mesma Instrução Normativa (BRASIL, 2014) recomenda a ingestão diária de 1 a 2 g. de pó de gengibre para ingerir o equivalente a 8 a 16 mg de gingeróis.

Neste estudo, a análise de 6-gingerol foi realizada com o gengibre liofilizado, ou seja, com o pó do rizoma. Assim, ao converter o valor de 6-gingerol em base seca, cada amostra de gengibre contém 724; 998; 630 e 780 mg de 6-gingerol em 100g de

pó de gengibre para as amostras CONV.1, CONV.2, ORG.1 e ORG.2 respectivamente. Desta forma, ao ingerir 2 g do pó das amostras de gengibre, seria ingerido 14,5; 19,9; 22,6 e 15,6 mg de 6-gingerol para as amostras CONV.1, CONV.2, ORG.1 e ORG.2 respectivamente, corroborando com as concentrações apresentadas pela Vigilância Sanitária.

4. CONCLUSÃO

Deve-se dar preferência à ingestão de gengibre orgânico, visto que, além da ausência de agrotóxico, ainda apresentou maiores teores de 6-gingerol, fibras alimentares e proteínas.

A otimização dos métodos de extração de 6 gingerol e de quantificação empregando-se a cromatografia líquida ultra eficiente foi adequada para quantificar o teor de 6-gingerol em amostras de gengibre orgânico e convencional.

A realização desta análise permitiu estimar uma ingestão de 21 a 43 g de gengibre fresco, para se atingir a quantidade adequada de gingeróis, substâncias biologicamente ativas, responsáveis pela atividade anti-inflamatória do gengibre.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEL P.R.S.; PRAKASH, J. Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*). **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 4(24), pp. 2674-2679, 18 December, 2010
- ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vasc. Br.**, v.3 (2), p. 145-54, 2004.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18th ed. Rev. 2. HORWITZ, W.; LATIMER JR., G.W. (Editors) Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2012.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1994. 620 p.
- BEAL, B.H. Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* ROSCOE) Florianópolis 2006, 87p. **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar**. Resolução RCD nº 54, de 12 de novembro de 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa, nº 02, de 13 de maio de 2014. **Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado**. 2014.
- CHEN,C.Y., LIU,T.Z., LIU,Y.W., TSENG,W.C. et al.,6-Shogaol (alkanone from ginger) induces apoptotic cell death of human hepatoma p53mutant Mahlavu subline via

an oxidative stress-mediated caspase-dependent mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 948–954.

DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley. 1998. 706p

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.

EL-GHORAB, A.; NAUMAN, MUHAMMAD; ANJUM, FAQIR; HUSSAIN, SHAHZAD; NADEEM, MUHAMMAD. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of agricultural and food chemistry*. V. 58, n. 14, p. 8231-7, 2010.

ERMER, J.; MILLER, J.H.M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Joachim Ermer, John H. McB. Miller (Eds.). 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

ESPÍNDULA JUNIOR, A. Aspectos Nutricionais e Aptidão Agrícola das Terras para o Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) em Agricultura Familiar na Região Serrana do Espírito Santo 2008, **Dissertação** submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo Seropédica, RJ Fevereiro de 2008. 83 p.

FAGUNDES, R.L.M; COSTA, Y.R. Functional foods in feeding. *Higiene Alimentar*. v. 17 n. 08, p. 42-48, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **GINGER: Post-Production Management for Improved Market Access**. 2002.

- FONTANARI, G.G.; MOLINA, J.P.; BATISTUTI, J.; FERTONANI, F.L. Caracterização térmica das frações protéicas albumina e globulina de grão de bico (*Cicer arietinum*) e tremoço (*Lupinus albus*). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA**. 7, 2010, São Paulo. Resumo expandido. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2010.
- FRANCISCO, J.L.; FRANCISCO, R. Fabricação de produtos a base de gengibre. **Dossiê Técnico**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro REDETEC dezembro/2007.
- GAN, F. F., NAGLE, A. A., ANG, X., HO, O. H. et al., Shogaols at proapoptotic concentrations induce G(2)/M arrest and aberrant mitotic cell death associated with tubulin aggregation. *Apoptosis* 2011, 16, 856–867.
- JIANG, H., SOLYOM, A. M., TIMMERMANN, B. N., GANG, D.R., Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 2957–2964.
- JIANG, H., TIMMERMANN, B. N., GANG, D. R., Characterization and identification of diarylheptanoids in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 509–518.
- LEONEL, MI; MACEDO, V.C.M. Perfil de consumo de tuberosas na cidade de Botucatu-SP. CONGRESSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 7., 2013, Águas de Lindólia. Anais... São Paulo: PROEX; UNESP, 2013, p. 09762 Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/146981>
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.) **Contributions to probability and statistics**. Stanford: Stanford University Press, 1960. p. 278-292.

- MELLO, V.D. & LAAKSONEN, D.E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 53 (5), p. 509-518, 2009.
- MORAES, F.P. & COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev. Eletron. Farmácia**, v. 3 (2), p.109-122, 2006.
- PAN, M. H., HSIEH, M. C., HSU, P. C., HO, S. Y. et al., 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 1467–1477.
- PAWAR, N.; PAI, S.; NIMBALKAR, M.; DIXIT, G. RP-HPLC analysis of phenolic antioxidant compound 6-gingerol from different ginger cultivars. **Food Chemistry** 126(3) · June 2011.
- PEREIRA, R.C.A.; BEZERRA, M.G.A.; RODRIGUES, T.H.S. Cultivo de Gengibre em Região Litorânea do Ceará. **Comunicado técnico**, Sebrae ISSN 1679-6535 Abril, 2012 Fortaleza, CE.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 13^a ed. Piracicaba: Nobel, 1999, 467 p.
- PROSKY *et al.*, 1992: Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods, food products: collaborative study. **J.AOAC Int.**, v.75, (2), p.306-7, 1992.
- RODRIGUES, M.L.; LIRA, R.K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato Hidroalcoólico dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.1, p.44-52, jan./abr., 2013.
- RUFINO, M do SM; ALVES, RE; BRITO, ES de; MORAIS, SM de; SAMPAIO, C de G; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, FD. 2007. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (a).

- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007. 4 p. (b)
- RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Comunicado Técnico On line Embrapa 125. Fortaleza, CE. Dezembro, 2007. (c)
- RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.
- SANWAL, S.K.; RAI, N.; SINGH, J.; BURAGOHAJIN, J. Antioxidant phytochemicals and gingerol content in diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Scientia Horticulturae** 124, 280–285, 2010.
- SEAN OK and WOO-SIK JEONG. Optimization of Extraction Conditions for the 6-Shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Prev Nutr Food Sci**. 2012 Jun; 17(2): 166–171.
- SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SANTA CATARINA. Boletim Informativo do Núcleo de Telessaúde, SC. **Precisamos falar sobre agrotóxicos**. Santa Catarina, 2015.
- SIQUEIRA, S.L.; KRUSE, M.H.L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Rev. esc. enferm. USP**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 584-590, Sept. 2008.
- SINGLETON, V. L. ; Orthofer, R. ; LAMUELA RAVENTO'-S, RM Analysis of the total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer, L. **Methods in Enzymology**, 1999.

- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação interlaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos. Faculdade de Farmácia, UFMG, 2007 (**Tese, Doutorado** em Ciência dos Alimentos).
- SOUZA, S.V.C., PINTO, C.T.; JUNQUEIRA, R.G. In-house method validation: application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 241-247, 2007. (b)
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- TORRES, L.M. Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre. 2008. **Dissertação** apresentada a Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Agronomia – Área de Concentração em Energia na agricultura. 120p.
- USDA. United States Department of Agriculture. National Agriculture Library. National Nutrient Database for Standard Reference.
- VIEIRA, L.N.; SOUSA, M.S.B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.
- VIEIRA, N.A.; TOMIOTTO, F.N.; MELO, G.P.; MANCHOPE, M.F.; LIMA, N.R.; OLIVEIRA, G.G.; WATANABE, M.A.E. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 149-162, 2014.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. **Journal of Chromatography**, v. 609, p. 407 – 413, 1992.

WOHLMUTH, W.; LEACH, D.N.; SMITH, M.K.; MYERS, S.P. Gingerol Content of Diploid and Tetraploid Clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **J. Agric. Food Chem.** 53, 5772-5778, 2005.

YU, Y., HUANG, T., YANG, B., LIU, X. et al., Development of gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 2007, 43, 24–31.

CAPÍTULO 2

USO DO GENGIBRE (*Zingiber officinale*) NO TRATAMENTO DA OBESIDADE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATO SIMPLES EM CAMUNDONGOS

Este capítulo foi submetido à revista Journal of Medicinal Food e aceito para publicação em 09/09/2018

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade funcional do gengibre no tratamento das disfunções metabólicas e inflamatórias ocasionadas pela obesidade induzida por dieta rica em carboidratos refinados. Parte dos camundongos obesos, foi tratada com três doses diferentes de extrato seco de gengibre (200, 600 e 1800 mg de extrato de gengibre/kg de peso corpóreo). Os achados indicaram que o consumo de altas doses de extrato de gengibre previniu o aumento da adiposidade induzida pela dieta HC, melhora no perfil lipídico além de promover diminuição dos marcadores inflamatórios em camundongos. A suplementação de gengibre na dieta HC contribuiu para diminuir o recrutamento de células visualizadas *in vivo* na microvasculatura do tecido adiposo, diminuição de citocinas inflamatórias e aumento dos níveis séricos de adiponectina. Assim, pode-se concluir que estes resultados indicaram que o consumo de gengibre diminuiu as conseqüências metabólicas negativas induzidas pela dieta HC.

Palavras-chave: obesidade, gingerol, inflamação, citocinas

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, relacionada à inflamação crônica de baixo grau, que leva às disfunções metabólicas, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, esteatose hepática e doenças cardíacas (MCARDLE et al., 2013; AGRAWAL et al., 2017; REILLY & SALTIEL, 2017). Tem sido notado nos últimos anos uma incidência de obesidade em um ritmo alarmante em todo o mundo, podendo este fenômeno ser descrita como uma pandemia (NCD Risk Factor Collaboration. 2016).

Segundo os dados do VIGITEL (2017), 51% da população brasileira está acima do peso, e 45,3% da população adulta de Belo Horizonte apresenta sobrepeso, isto é, o índice de massa corporal superior a 25 kg/m².

A obesidade relaciona-se, ainda, com uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que geram estresse oxidativo, dano celular e exacerbação da resposta inflamatória (FURUKAWA et al., 2004; HOPPS et al., 2010). Neste contexto, indivíduos obesos apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de comorbidades, tais como diabetes melito tipo II, dislipidemias, doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças cardiovasculares (BOZAOGLU et al., 2007; WANDERLEY & FERREIRA, 2010; OSBORN & OLEFSKY, 2012; MCARDLE et al., 2013; HILL et al., 2014).

A etiologia da obesidade é multifatorial, mas a mudança nos hábitos alimentares, principalmente o aumento no consumo de carboidratos simples nos últimos anos, tem sido proposta como um dos principais contribuintes para a maior prevalência mundial da obesidade (TAPPY & LE, 2010; AUSTIN et al., 2011). O consumo de dieta rica em carboidratos refinados pode promover não apenas acúmulo de gordura, mas também alterações inflamatórias e metabólicas em modelos animais (OLIVEIRA et al., 2013).

A prevenção e controle das DCNT e também a promoção da saúde, de uma forma geral dependem, dentre outros fatores, de estratégias de mudanças de hábitos e comportamentos, como modificações na dieta e combate ao sedentarismo (FONSECA et al., 1999, TOSCANO, 2004; GBD 2015).

O efeito protetor contra as DCNTs tem sido atribuído, em grande parte, à propriedades biológicas ditas promotoras da saúde, tais como atividade antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica de nutrientes como as vitaminas A, C e E e de compostos fenólicos presentes nos vegetais (GONÇALVES, 2008; PEREIRA, 2009;

SIRIWARDHANA et al., 2013). Várias pesquisas já identificaram nutrientes e substâncias bioativas, presentes principalmente em alimentos de origem vegetal, que atuam em alvos fisiológicos específicos, interferindo nos processos patogênicos de inúmeras doenças (BASTOS et al., 2009).

O gengibre (*Zingiber officinale*), uma raiz tuberosa, tem sido estudado pelas atividades que desempenham como atividades antiinflamatória, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana, entre outras (ZARATE, et al. 1992; HABSAH et al, 2000; DEDOV et al, 2002; WHITE, 2007; GIACOSA, 2015; LETE & ALLUÉ, 2016). Além destas, a atividade antioxidante presente no gengibre é, provavelmente, proveniente da elevada concentração de compostos bioativos, principalmente de compostos fenólicos. No entanto, o estudo de propriedades biológicas de espécies da família Zingiberaceae, à qual pertence o gengibre, ainda é muito escassa, principalmente no que se refere às suas propriedades antioxidantes (ZAEOUNG et al., 2005; BEAL, 2006; STOILOVA et al., 2007; DU et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram que o gengibre pode ser um alimento com interessantes propriedades no tratamento adjuvante da obesidade e comorbidades metabólicas. No entanto, os efeitos do gengibre são estudados apenas na obesidade induzida pela dieta de rica em gordura (HF), e não pela dieta rica em carboidratos (HC). As dietas HC e HF promovem diferentes efeitos metabólicos e inflamatórios, além de estimular o acúmulo de gordura por vias metabólicas distintas. Embora as dietas com HC tenham aumentado o acúmulo de gordura pelo aumento da lipogênese, as dietas de HF diminuíram a atividade lipolítica nos adipócitos (NAMMI et al., 2009; SARAVANAN et al., 2014; WANG et al., 2017).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos e mecanismos da ingestão de extrato de gengibre no ganho de adiposidade, distúrbios metabólicos e inflamatórios induzidos por uma dieta rica em carboidratos refinados (HC) em camundongos. Além disso, pretende-se elucidar como o gengibre interfere na dinâmica celular de leucócitos na microvasculatura no tecido adiposo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estudos *in vivo*

O protocolo experimental proposto está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG). Este foi submetido ao referido comitê para aprovação, Protocolo 107/2012.

Foram utilizados camundongos com seis a sete semanas de vida, da linhagem Balb/c, provenientes da colônia do Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG). Os animais foram alojados em gaiolas de policarbonato, em grupos de quatro animais. A temperatura da sala de experimentação foi controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), assim como a umidade (50 – 60%), sob ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram ofertados aos animais *ad libitum*.

2.2. Preparo da dieta rica em carboidratos

Para indução do aumento da adiposidade e alterações metabólicas associadas, os camundongos foram alimentados com dieta rica em carboidrato (HC). Para o preparo de aproximadamente 1 kg de ração palatável foram usados 395 g de leite condensado, 395 g de ração Labina® em pó, 70 g de açúcar e 86 ml de água. O modo de preparo da ração consiste em peineirar o pó da ração comercial e acrescentar a este a mistura de água, açúcar e leite condensado até a obtenção de uma massa. Em seguida, pelets serão confeccionados manualmente.

A Tabela 1 apresenta a distribuição de macro e micronutrientes, assim como a porcentagem de quilocalorias provenientes da dieta controle e da dieta HC. A análise bromatológica da dieta foi realizada no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

TABELA 1

Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (kcal/g) da dieta controle e HC

	Dieta Controle (C)	Dieta HC
Proteínas (%)	23,3	17,5
Lipídios (%)	2,6	5,0
Carboidratos (%)	55,6	64,8
Fibra bruta (%)	6,2	4,1
Minerais (%)	9,3	8,5
Energia (kcal/g)	4,0	4,4

Fonte: Oliveira et al. (2013)

Inicialmente os animais foram divididos de modo a constituir os grupos Controle (8 camundongos alimentados com ração comercial Labina) e HC (32 camundongos alimentados com dieta HC) durante 8 semanas, uma vez que este é o tempo necessário para indução de maior número de alterações metabólicas e aumento de parâmetros inflamatórios (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3. Desenho experimental

Durante as oito primeiras semanas de estudo os animais foram divididos em dois grupos experimentais tratados com dieta controle (C) e rica em carboidrato HC. Da 9^a a 12^a semana de estudo, 24 animais alimentados com dieta HC foram realocados em outros três novos grupos que passaram a se alimentar de dieta HC adicionada de três diferentes concentrações de extrato de gengibre, 200, 600 e 1800 mg/kg de peso corporal. O extrato de gengibre foi adquirido em farmácia de manipulação, que apresentou laudo de padronização do produto. Sendo assim, formaram-se 5 grupos experimentais (n = 8): Controle, HC, HC200G, HC600G e HC1800G. A Tabela 2 apresenta os grupos de animais em estudo e o tipo de dieta consumida por cada grupo.

TABELA 2

Grupos de animais em estudo e tipo de dieta consumida

Grupos	Dieta	Duração da dieta
Grupo 1 (dieta controle)	Animais alimentados com ração comercial Labina®	12 semanas
Grupo 2 (HC)	Animais alimentados com dieta HC	12 semanas
Grupo 3 (HC + Extrato de gengibre [200mg/kg])	Animais alimentados com dieta HC + Extrato de gengibre [200mg/kg]	Primeiras 12 semanas apenas HC. Na 9ª semana foi adicionado extrato de gengibre [200mg/kg]
Grupo 4 (HC + Extrato de gengibre [600mg/kg])	Animais alimentados com HC + Extrato de gengibre [600mg/kg]	Primeiras 12 semanas apenas HC. Na 9ª semana foi adicionado extrato de gengibre [600mg/kg]
Grupo 5 (HC + Extrato de gengibre [1800mg/kg])	Animais alimentados com HC + Extrato de gengibre [1800mg/kg]	Primeiras 12 semanas apenas HC. Na 9ª semana foi adicionado extrato de gengibre [1800mg/kg]

A ingestão alimentar média foi determinada diariamente a partir da diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade restante na gaiola dos animais durante as semanas de experimento. O valor obtido foi dividido pelo número de animais que estavam na caixa. O mesmo foi realizado para avaliar o consumo e verificar as doses de tratamento, quando os animais passaram a receber dieta adicionada dos extratos vegetais.

Após 12 semanas de estudo, os animais foram submetidos à análise de calorimetria indireta e a teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e posteriormente eutanasiados por exsanguinação, após terem sido anestesiados com 200 µL de solução de PBS: ketamina: xilazina (4:3:1). O sangue, o fígado, tecidos adiposos epididimal (TAE), mesentérico (TAM), retroperitoneal (TAR), inguinal (TAI), marrom, foram removidos, pesados e conservados em freezer -80°C, para posteriores análises.

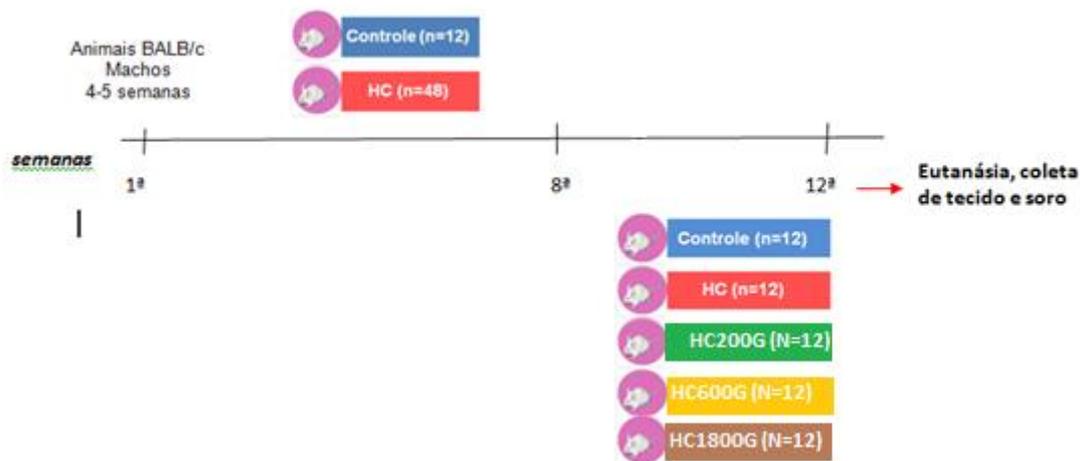


FIGURA 1. Desenho experimental de indução da obesidade com dieta rica em carboidratos simples e gengibre em camundongos balb-c. Animais alimentados com dieta comum (Controle); animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (HC); Dieta HC suplementada com 200 (HC200G), 600 (HC600G) e 1800 (HC1800G) mg/kg de peso corporal de extrato de gengibre.

Foi realizado o cálculo do índice de adiposidade por meio da soma do peso dos tecidos adiposos viscerais em relação ao peso corpóreo do animal ($TAE+TAM+TAR \times 100/ \text{Peso Corporal}$).

2.4. Teste de tolerância oral à glicose

Ao final da 12ª semana do experimento, os animais receberam por gavagem, após jejum de 6h, D-glicose (0,2 g/100g de peso corporal). A glicemia foi monitorada (glicosímetro Accue-Check - Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Indiana, USA) em amostras de sangue obtidas da cauda dos animais nos seguintes tempos experimentais: 0 (estado de jejum), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da solução saturada de glicose.

2.5. Calorimetria indireta

Foi utilizada a calorimetria indireta para mensuração simultânea do consumo de oxigênio, da produção de dióxido de carbono, do gasto energético total (EE) e do índice de trocas respiratórias, chamado quociente respiratório (RQ). Para realização desta

análise foi utilizado o calorímetro indireto (E405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Espanha). Ao final da 12^a semana do experimento, os camundongos, em repouso e com a dieta suspensa por 2h, foram pesados e submetidos à análise de calorimetria indireta por um período de 3h, cujos dados foram apurados a cada 2 minutos. Os primeiros 30 minutos da análise foram descartados, uma vez que se considera este o tempo necessário para adaptação e redução do estresse animal (FREIRE et al., 2015). O calorímetro foi calibrado antes de cada utilização, com mistura certificada de gases.

2.6. Análise morfológica do tecido adiposo epididimal

Fragmentos do tecido adiposo epididimal foram imersos em solução fixadora de formol a 4% por período mínimo de 48 horas e em seguida incubados em álcool 70%. Posteriormente, procedeu-se a desidratação dos tecidos seguida de inclusão em parafina. Foram obtidas, no micrótomo, secções histológicas de 5 µm de espessura, que foram coradas com hematoxilina e contrastadas com eosina. Para a determinação do tamanho dos adipócitos, as lâminas foram analisadas através de microscópio de luz, equipado com uma câmera digital (Motican 2500). O perímetro e a área seccional foram obtidos através da mediada aleatória de 50 adipócitos por lâmina e posterior análise com o programa ImageJ para o processamento de imagens digitais.

2.7. Dosagens sorológicas

No momento da eutanásia, após a anestesia, o sangue dos camundongos foi coletado e centrifugado (3000 rpm por 10 minutos a 4°C) para obtenção do soro. Em seguida, o material foi aliquotado e congelado (-80°C) para posteriores análises. No soro foram analisadas as concentrações de glicose, triglicérides e colesterol por meio de kits enzimáticos (KATAL, Belo Horizonte, MG, Brasil). Ácidos graxos não-esterificados (*non-esterified fatty acids* - NEFA) foram avaliados no soro dos animais por meio de método colorimétrico enzimático (Wako Life Sciences, Inc., Mountain View, CA, USA). As concentrações de adiponectina, resistina, leptina, quemerina foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) (R&D systems Europe Ltd., Abington, UK). Todas as análises sorológicas foram realizadas conforme orientação fornecida pelo fabricante do kit enzimático utilizado.

2.8. Análise de citocinas em tecido adiposo

Fragmentos do tecido adiposo epididimal (100 mg) foram homogeneizados em 1 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 mol/L; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mmol/L; cloreto de benzetônio 0,1mmol/L; EDTA 10 mmol/L; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8 g NaCl, 0,2 g KCl e 2,89 g Na₂HPO₄.12H₂O diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado (10 min, 10000 r.p.m., 4°C), sendo o infranadante recolhido para a dosagem pela técnica de ELISA. Os infranadantes recolhidos das amostras foram utilizados para determinação de citocinas pelo método de ELISA (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Foram determinadas as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-4 e IL-13.

2.9. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total de leucócitos, amostras de sangue obtidas da cauda dos animais foram diluídas (1:20) em solução de Turk (RenyLab, Barbacena, MG, Brasil). Para contagem utilizou-se microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. Utilizando-se da técnica de coloração com kit panótico, foi realizada a contagem diferencial de leucócitos pela análise morfológica em lâminas com esfregaço sanguíneo.

2.10. Microscopia intravital

Os animais foram anestesiados com ketamina (130 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg). Em seguida, foi injetada na artéria ocular 100 μ L do corante fluorescente 67 rodamina 6G (de peso corl; Sigma, St. Louis, MO). O tecido adiposo epididimal foi exposto para avaliação do número de leucócitos em rolamento e aderidos ao vaso sanguíneo. A microcirculação foi visualizada sobre microscópio confocal utilizando-se escaneador Olympus Fluoview FV300 equipado com laser de argônio a 488nm (OLIVEIRA et al., 2013). Todas as imagens foram adquiridas por meio de lente objetiva de 3x e foi realizada média do número de leucócitos observados em rolamento de no

mínimo três campos aleatórios para cada animal, por minuto. O leucócito foi considerado aderido quando permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100µm de extensão da vênula

2.11. Análise estatística

Após a verificação da distribuição Gaussiana, por meio de teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, procederam-se as comparações estatísticas entre os vários grupos por meio de ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ (PIMENTEL- GOMES,1999).

3. RESULTADOS

3.1. Redução da adiposidade em animais alimentados com dieta HC suplementada com gengibre.

De acordo com estudos prévios (OLIVEIRA et al., 2013), camundongos alimentados com dieta HC apresentaram maior peso de tecido adiposo epididimal e maior área de adipócitos em relação aos camundongos alimentados com ração, o que pode ser observado também nos animais deste presente estudo conforme a figura 2A, 2B e 2C.

Quando os animais foram submetidos à dieta HC com adição de gengibre, observou-se uma redução significativa no índice de adiposidade nos camundongos por meio da área dos adipócitos conforme as figuras 2A, 2B e 2C. A análise da distribuição do tamanho dos adipócitos mostra que camundongos alimentados com dieta HC apresentaram uma quantidade maior de adipócitos de maior tamanho. No entanto, os grupos 600G e 1800G apresentaram maior número de adipócitos menores (Figura 2D). Nenhuma alteração foi observada na massa corporal (Figura 2D).

Para investigar o mecanismo pelo qual o gengibre induz a perda de gordura, foi analisado também as medidas de gasto energético. Os resultados de volume de consumo de oxigênio em repouso, gasto energético e consumo alimentar diário não se

alteraram com a adição de gengibre (Figura 1F, 1G e 1H) indicando que não houve um aumento da gasto energético com a dieta suplementada com extrato de gengibre.

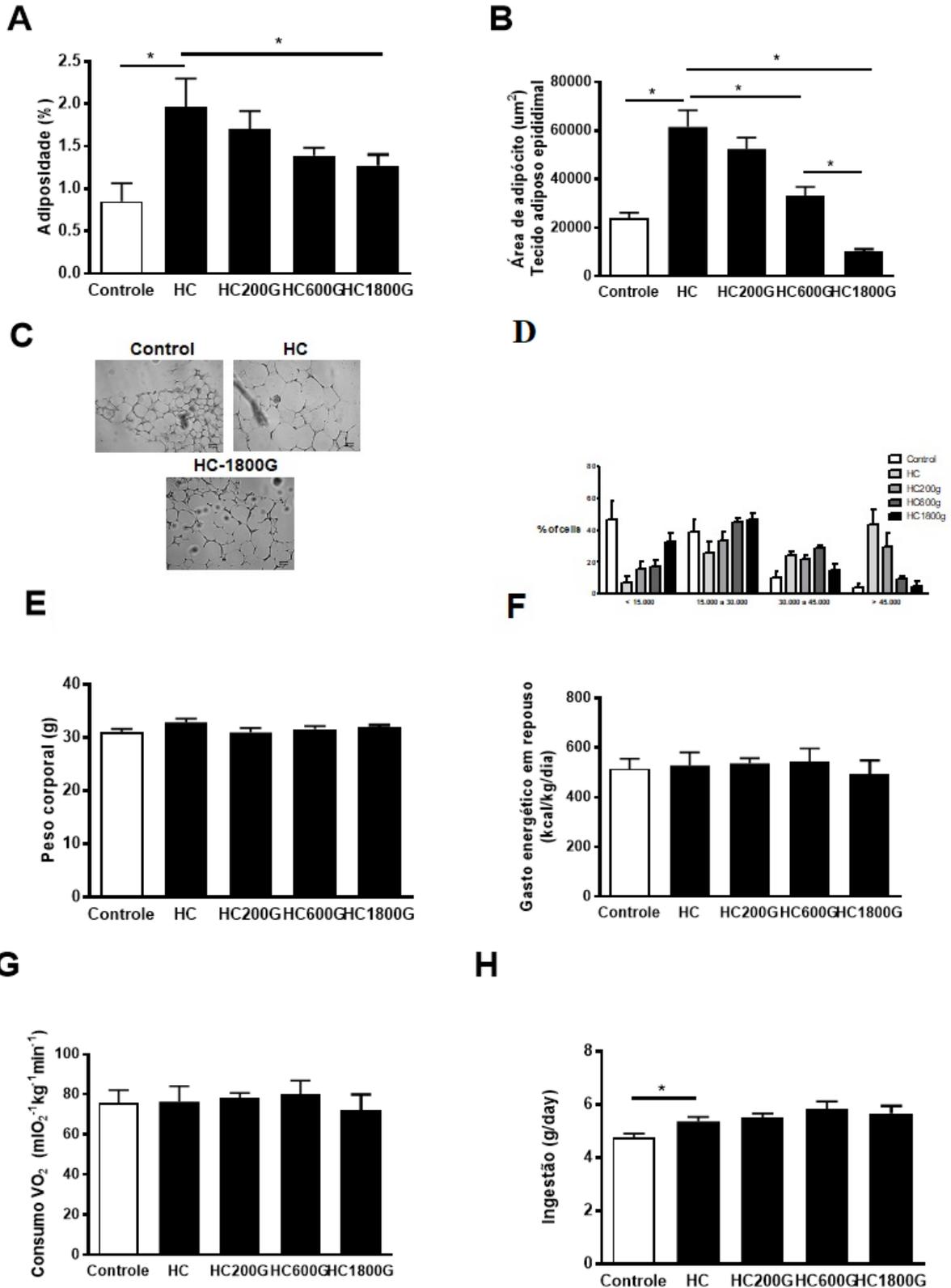


FIGURA 2. Adiposidade, histologia do tecido adiposo e gasto energético. A. Índice de adiposidade. B. Área de adipócitos. C. Fotomicrografias representativas de tecido adiposo epididimal marcado com hematoxilina-eosina (200x) de camundongos com dieta HC e gengibre. D. Distribuição de freqüência de adipócitos na área de superfície celular do tecido adiposo epididimal. E. Gasto energético em repouso. F. VO₂ em repouso. G. ingestão de alimentos. Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G).

3.2. Mudança no perfil lipídico induzida pelo gengibre

Foram observadas mudanças significativas no perfil lipídico induzido pela dieta HC (Figura 3A, 3B e 3C). As concentrações de 200G e 600G de gengibre adicionadas à dieta HC reduziram o colesterol total e os triglicerídeos séricos (Figura 3A e 3B). Mudanças nos níveis de ácidos graxos livres ocorreram apenas na dose de 1800G (Figura 3C).

3.3. Alterações na glicemia induzida pela dieta HC

Camundongos alimentados com dieta HC apresentaram hiperglicemia e intolerância à glicose conforme as Figura 3D e 3E. Apesar da redução na adiposidade e melhora nas variáveis lipídicas, o gengibre não alterou a glicemia e a intolerância à glicose induzida pela dieta HC (Figura 3D e 3E).

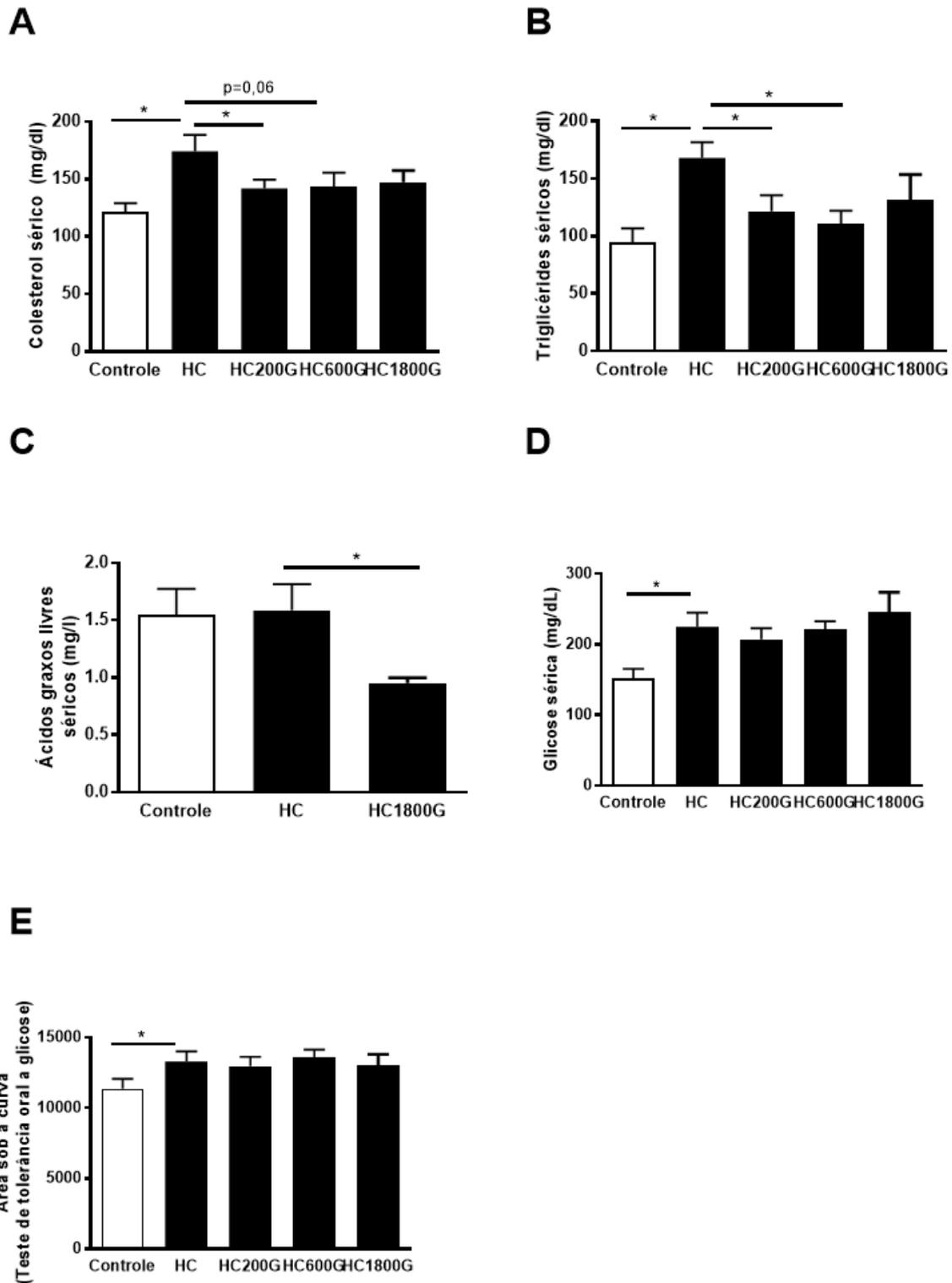


FIGURA 3. Variáveis séricas e teste oral de tolerância à glicose. A. Colesterol sérico. B. Triglicéridos séricos. C. Ácidos graxos livres. D. Glicose sérica. E. Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose. Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G).

3.4 Gengibre reduzindo a inflamação induzida pela dieta HC

A fim de visualizar as interações das células endoteliais leucocitárias na microcirculação do tecido adiposo epididimal em camundongos vivos, foi utilizado a microscopia intravital *in vivo*. O número de leucócitos rolantes e aderidos aumentou devido à dieta HC (Figura 4A-4C). A microscopia intravital foi realizada apenas no grupo 1800G, já que o mesmo foi o único na qual a concentração levou à uma expressiva perda de gordura no tecido adiposo.

Foi observado que o gengibre reduziu significativamente o recrutamento de células para o tecido adiposo conforme mostrado na Figura 4A-4C). Esses resultados foram acompanhados por menores níveis de TNF-alfa, IL-6 e IL-13 nos animais alimentados com gengibre (Figura 5A, 5B e 5C).

Apesar do fato de a dieta HC também reduzir a IL-4, o gengibre não alterou essa citocina (Figura 5D).

Nenhuma alteração foi encontrada na níveis séricos de quimerina (Figura 5E). No entanto, a concentração de 600G de gengibre aumentou a adiponectina sérica nos camundongos (Figura 5F).

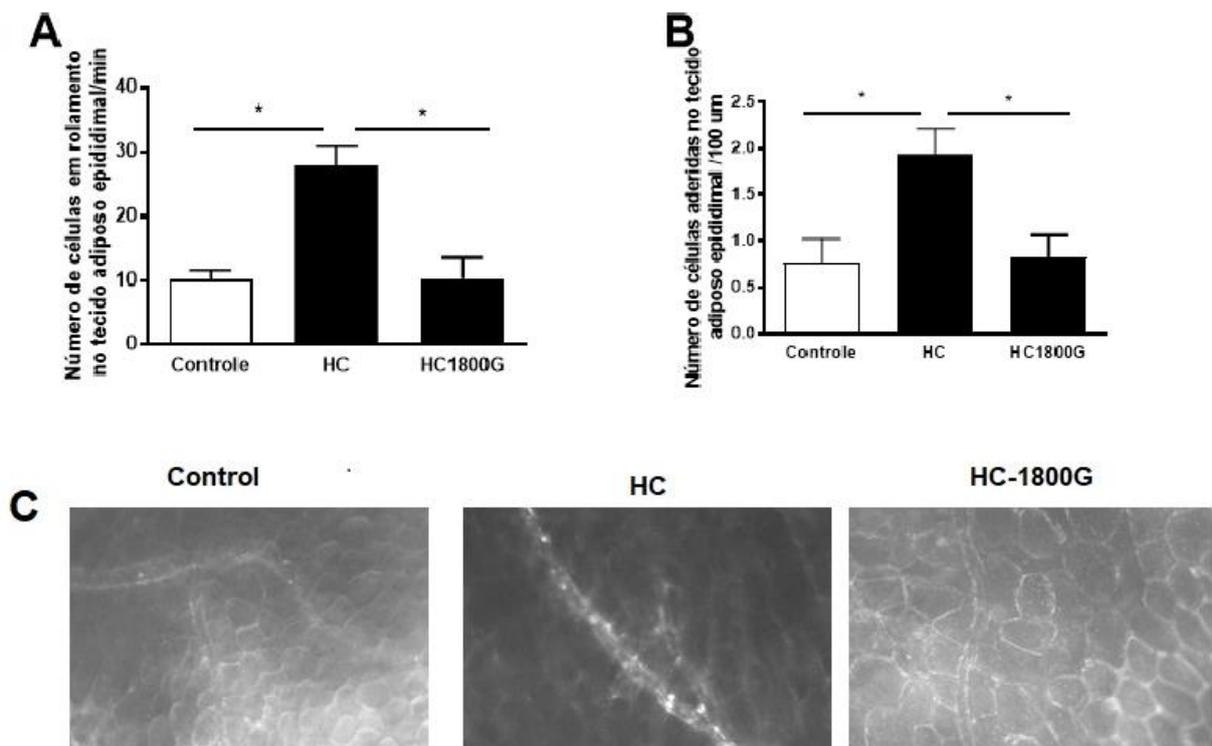


FIGURA 4. Visualização da interação leucócito-endotélio induzida pela dieta HC e ingestão de gengibre. Microscopia intravital foi utilizada para avaliar as células de rolamento (A) e de adesão (B) em vasos do tecido adiposo epididimal in vivo. Imagens representam essas análises (C). Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G).

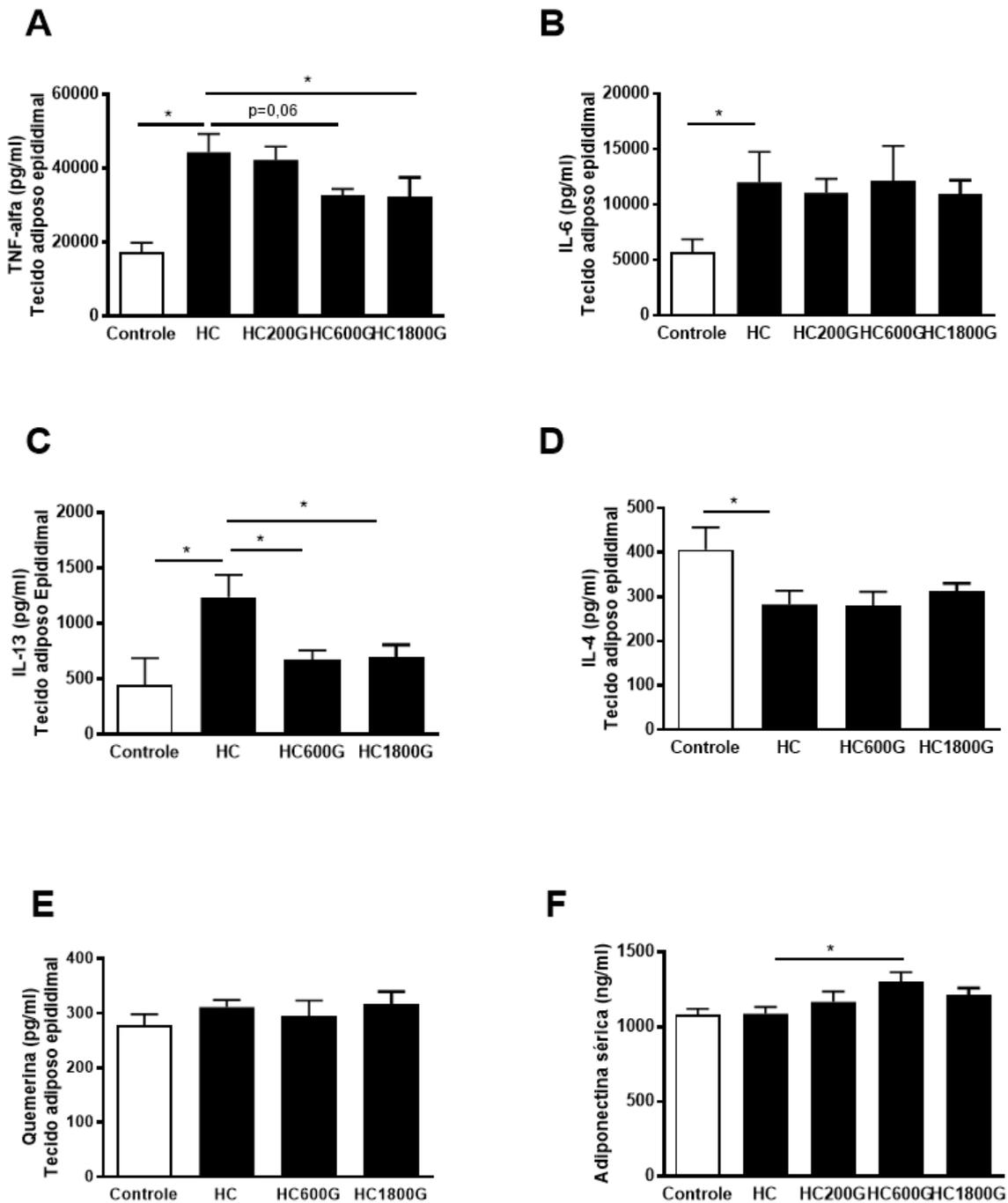


FIGURA 5. Produção de adipocinas. A. TNF-alfa no tecido adiposo epididimal. B. IL-6 no tecido adiposo epididimal. C. IL-13 no tecido adiposo epididimal. D. IL-4 no tecido adiposo epididimal. E. Quemerina sérica. F. Adiponectina sérica. Os dados representam médias de 8 animais por grupo. Barras representam significância estatística. Controle (grupo controle), dieta HC (grupo HC) ou dieta HC acrescida de três diferentes doses de extrato de gengibre (grupos HC200G, HC600G, HC1800G).

4. DISCUSSÃO

Sabe-se que o aumento da prevalência de obesidade no mundo, traz consigo diversas e significativas alterações metabólicas (NCD Risk Factor Collaboration. 2016).

Paralelamente, o tratamento convencional da obesidade mostra sucesso limitado em longo prazo. Portanto, pesquisas focadas em novas estratégias de tratamento da obesidade são relevantes. Os achados deste presente trabalho mostraram que o consumo de gengibre previniu o aumento da adiposidade induzida pela dieta HC, melhorando o perfil lipídico e promovendo diminuição dos marcadores inflamatórios em camundongos.

O efeito anti-obesidade do gengibre foi previamente demonstrado em animais obesos induzidos por dieta rica em gordura (SARAVANAN et al., 2014; BRAHMA et al., 2016; NAMMI et al., 2010; MISAWA et al., 2015). No entanto, este é o primeiro estudo que testou o efeito metabólico do gengibre no modelo de obesidade induzida por dieta HC.

Alguns estudos anteriores do mesmo grupo de pesquisa mostraram que a dieta HC é um bom modelo murino de obesidade (OLIVEIRA, et al., 2013; MENEZES-GARCIA et al., 2014; LANA et al., 2016). Assim, o consumo de dieta HC causa aumento agudo e sustentado da adiposidade visceral, acompanhado de altos níveis de citocinas nesse tecido e alteração metabólica em camundongos (OLIVEIRA et al., 2013). Neste estudo, foi mostrado que a adição de gengibre na dieta HC induziu menor adiposidade, reduziu os níveis de marcadores inflamatórios no tecido adiposo, colesterol sérico, triglicérides e ácidos graxos livres.

Em consonância com os dados deste presente estudo, Nammi e colaboradores (2010) observaram que o tratamento com 100, 200 e 400 mg / kg de extrato de *Z. officinale* administrado por gavagem oral uma vez ao dia por seis semanas suprimiu o

ganho de peso corporal induzido pela dieta. Os autores também observaram diminuição nos níveis séricos de ácidos graxos livres e triglicérides com tratamento com gengibre.

O efeito terapêutico do gengibre no metabolismo lipídico também foi demonstrado em modelos animais de doença cardiovascular, como camundongos deficientes em apolipoproteína E (FUHRMAN et al., 2000) e em ratos Wistar, em dieta rica em colesterol (MATSUDA et al., 2009). Nammi e colaboradores (2010) mostraram em seu estudo que ratos tratados com um extrato etanólico de gengibre (400mg / kg) em associação com a dieta HF por seis semanas apresentaram níveis séricos de colesterol e triglicérides mais baixos. Estes efeitos podem ser resultado da regulação positiva do receptor de LDL e da regulação negativa da expressão da HMG-CoA redutase no fígado destes ratos após o tratamento com o gengibre.

O efeito antiinflamatório do gengibre também foi demonstrado em estudos prévios *in vitro* que usaram diferentes tipos de células (ISA et al., 2008; LI et al., 2012; HAN YA et al., 2013) e *in-vivo* (BRAHMA et al., 2016; WANG et al., 2017). O gengibre tem um efeito negativo no fator nuclear kappa B (NF-κB) e ciclooxygenase 2, importantes reguladores das vias inflamatórias (WANG et al., 2017). Li e colaboradores (2012) observaram que ratos Sprague-Dawley tratados com extrato etanólico de gengibre (400mg / kg) por seis semanas, além da dieta de HF, mostraram níveis normais de expressão de citocinas inflamatórias no tecido hepático, associados à supressão da ativação do NF-κB. Além disso, os autores realizaram análises *in vitro* que observaram que a supressão na ativação do NF-κB ocorre por atenuação na via da IKK / IκBα / NF-κB em células de hepatócitos humanos tratadas com gengibre (Li et al., 2012).

A relação entre obesidade e inflamação já é bem postulada. A hipertrofia de adipócitos aumenta o recrutamento de células imunológicas e a produção de marcadores inflamatórios que desenvolvem um estado inflamatório de baixo grau que está envolvido no desenvolvimento de algumas alterações metabólicas (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011).

Foi demonstrado anteriormente neste grupo de pesquisa que o consumo de dieta HC leva a um aumento no rolamento e na adesão de leucócitos à microcirculação no tecido adiposo, aumentando os níveis de citocinas inflamatórias e diminuindo a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em camundongos (OLIVEIRA et al., 2013).

A alteração da homeostase da glicose induzida pela dieta HC foi associada à acentuada redução nos níveis séricos de adiponectina. A adiponectina é uma proteína secretada por adipócitos que é regulada negativamente na obesidade e exerce importantes efeitos de sensibilização à insulina. Aqui, mostrou-se que a adição de gengibre na dieta HC contribuiu para diminuir o recrutamento de células visualizadas *in vivo* na microvasculatura do tecido adiposo, diminuição de citocinas inflamatórias e aumento dos níveis séricos de adiponectina.

Os resultados deste presente trabalho indicaram que o consumo de gengibre diminuiu as conseqüências metabólicas negativas induzidas pela dieta HC. Apesar disso, não foi observado melhora no metabolismo da glicose. Em consonância com estes resultados, em estudo desenvolvido por Li e colaboradores (2014) em que os autores examinaram o efeito preventivo do gengibre no metabolismo da glicose em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e rica em carboidratos, os autores observaram uma acentuada redução na glicemia após seis semanas de tratamento adicional com 200mg / kg de extrato de gengibre por gavagem oral. O mesmo não foi observado após quatro semanas de tratamento. Portanto, esses resultados sugerem que o consumo de gengibre durante quatro semanas não foi suficiente para melhorar as alterações no metabolismo glicêmico induzido pela dieta HC.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a adição de gengibre na dieta habitual pode ser útil na prevenção do ganho de peso e no desenvolvimento de alterações metabólicas em camundongos apesar não ter sido observado aumento no gasto energético. No entanto, enfatiza-se que ensaios clínicos sobre este tema são necessários e os mecanismos envolvidos precisam ser melhor esclarecidos.

Apesar de muito divulgado pela mídia, o presente estudo não detectou aumento no gasto energético de camundongos alimentados com extrato de gengibre. Assim, são necessários maiores estudos neste campo, para confirmar a função termogênica do gengibre.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL M, KERN PA, NIKOLAJCZYK BS. 2017. The Immune System in Obesity: Developing Paradigms Amidst Inconvenient Truths. *Curr Diab Rep.* 2017; 17 (87): 1-14.
- AUSTIN GL, OGDEN LG, O'HILL JO. 2011. Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971–2006. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(4): 836–43.
- BASTOS, D.H.M. ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 53, n. 5, p. 646-56, 2009.
- BEAL, B.H. Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* ROSCOE) Florianópolis 2006, 87p. *Dissertação* apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.
- BOZAOGLU, K; BOLTON, K; MCMILLAN, J; ZIMMET, P; JOWETT, J; COLLIER, G; WALDEN, K; SEGAL, D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, v. 148, n. 10, p. 4687–4694, 2007.
- BRAHMA NP, UDDANDRAO VV, RAVINDAR NR, et al. 2016. Ameliorative potential of gingerol: Promising modulation of inflammatory factors and lipid marker enzymes expressions in HFD induced obesity in rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 05 (419): 139-47.
- DEDOV, V.N., TRAN, V.H., DUKE, C.C., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J., MANDADI, S., ROUFOGALIS, B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *British Journal of Pharmacology*, v. 137, p. 793-798, 2002.

- DU X, GENG Y, HUANG Z, et al. 2014. Effects of *Zingiber officinale* extract on antioxidation and lipid peroxidation in mice after exposure to 60 Co- γ -ray. *Afr J Biol.* 2014; 11 (11): 2609-2615.
- FOLCH J, LEES M, SLOANE SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 1957; 226: 497- 509.
- FONSECA, M.J.M.; CHOR, D.; VALENTE, J.G. Hábitos alimentares entre funcionários de banco estatal: padrão de consumo alimentar. *Cad. Saúde Pública*, v. 15, n. 1, p. 29-39, 1999.
- FREIRE, R. H; FERNANDES, L.R; SILVA, R.B; COELHO, B.S.L; ARAUJO, L.P.T; RIBEIRO, L.S; ANDRADE, J.M.O; ANDRADE LIMA, P.M; ARAÚJO, R.S; SANTOS, S.H.S; COIMBRA C.C; CARDOSO, V.N, ALVAREZ-LEITE, J.I. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *International Journal of Obesity*, v.40, n.3, p. 1–8, 2015.
- FUHRMAN B, ROSENBLAT M, HAYEK T, et la. 2000. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2000; 130 (5): 1124–31.
- FURUKAWA, S; TAKUYA, F; SHIMABUKURO,M; IWAKI, M; YAMADA, Y; NAKAJIMA, Y; NAKAYAMA, O; MAKISHIMA, M; MATSUDA, M; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.
- GIACOSA A, GUIDO D, GRASSI M, et al. 2015. The Effect of Ginger (*Zingiber officinalis*) and Artichoke (*Cynara cardunculus*) Extract Supplementation on Functional Dyspepsia: A Randomised, Double-Blind, and Placebo-Controlled Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 1-9.

- GONÇALVES, A.E.S.S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. 88p. 2008. *Mestrado* (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- GREGOR MF, HOTAMISLIGIL GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011 (29): 415-45.
- HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; RAHMAN, A. A.; GHAFAR; ALI, A. M. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p.403 – 410, 2000.
- HAN YA, SONG CW, KOH WS, et al. 2013. Anti-inflammatory effects of the *Zingiber officinale roscoe* constituent 12-dehydrogingerdione in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells. *Phytother Res.* 2013; 27 (8): 1200-5.
- HILL, A.A; BOLUS, W.R; HASTY, A.H. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunological Reviews.*, v. 262, n. 1, p. 134–152, 2014.
- HOPPS, E; NOTO, D; CAIMI, G; AVERNA, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 20, n. 1, p. 72–77, 2010.
- ISA Y, MIYAKAWA Y, YANAGISAWA M, et al. 2008. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF-alpha mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373 (3): 429-34.
- LANA JP, MARTINS LB, OLIVEIRA MC, et al. 2016. TNF and IL-18 cytokines may regulate liver fat storage under homeostasis conditions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41 (12): 1295-302.

- LETE I, ALLUÉ, J. 2016. The Effectiveness of Ginger in the Prevention of Nausea and Vomiting during Pregnancy and Chemotherapy. *Integr Med Insights*. 2016; 11-17.
- LI XH, MCGRATH KC, NAMMI S, et al. 2012. Attenuation of liver pro-inflammatory responses by *Zingiber officinale* via inhibition of NF-kappa B activation in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012; 110 (3): 238-44.
- LI Y, TRAN VH, KOTA BP, et al. 2014. Preventative effect of *Zingiber officinale* on insulin resistance in a high-fat high-carbohydrate diet-fed rat model and its mechanism of action. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014; 115 (2): 209-15.
- MATSUDA A, WANG Z, TAKAHASHI S, et al. 2009. Upregulation of mRNA of retinoid binding protein and fatty acid binding protein by cholesterol enriched-diet and effect of ginger on lipid metabolism. *Life Sci*. 2009; 84 (25-26): 903-7.
- MCARDLE MA, FINUCANE OM, CONNAUGHTON RM, et al. 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol*. 2013; 4 (54): 1–23.
- MENEZES-GARCIA, Z; OLIVEIRA, M.C; LIMA, R.L; SORIANI, F.M; CISALPINO, D; BOTION, L.M; TEIXEIRA, M.M; SOUZA, D.G; FERREIRA, A.V.M. Lack of platelet activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. *Obesity*, v. 22, n. 3, p. 663–672, 2014.
- MISAWA K, HASHIZUME K, YAMAMOTO M, et al. 2015. Ginger extract prevents high-fat diet-induced obesity in mice via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor delta pathway. *J Nutr Biochem*. 2015; 26 (10): 1058-67.
- NAMMI S, SREEMANTULA S, ROUFOGALIS BD. 2009. Protective effects of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009; 104 (5): 366-73.

- NAMMI S, KIM MS, GAVANDE NS, et al. 2010. Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase expression by *Zingiber officinale* in the liver of high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106 (5): 389-95.
- NCD Risk Factor Collaboration. 2016. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet.* 2016; 02 (387): 1377-96.
- OLIVEIRA, M. C., MENEZES-GARCIA, Z., HENRIQUES, M. C. C., SORIANI, F.M., PINHO, V., FARIA, A.M. C., SANTIAGO, A.F; CARA, D.C; SOUZA, D.G; TEIXEIRA, M.M; AMARAL, FLÁVIO A; FERREIRA, A.V.M. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*, v. 21, n. 9, p. 396–406, 2013.
- OSBORN, O; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, v. 18, n. 3, p. 363–74, 2012.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. 13^a ed. Piracicaba: Nobel, 1999, 467 p.
- PEREIRA, R.C.A.; BEZERRA, M.G.A.; RODRIGUES, T.H.S. Cultivo de Gengibre em Região Litorânea do Ceará. *Comunicado técnico*, Sebrae ISSN 1679-6535 Abril, 2012 Fortaleza, CE.
- REILLY SM, SALTIEL AR. 2017. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017; 13 (11): 1-11.
- SARAVANAN G, PONMURUGAN P, DEEPA MA, et al. 2014. Anti-obesity action of gingerol: effect on lipid profile, insulin, leptin, amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet. *J Sci Food Agric.* 2014; 94 (14): 2972-7.

- SIRIWARDHANA N, KALUPAHANA NS, CEKANOVA M, et al. 2013. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem*. 2013; 24 (4): 613–23.
- STOILOVA I, KRASTANOV A, STOYANOVA A, et al. 2007. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food chem*. 2007; 102 (3): 764–70.
- TAPPY L, LE KA. 2010. The consumption of refined carbohydrate has rapidly increased worldwide in last decades. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010; 90 (1): 23-46.
- THE GBD 2015 Obesity Collaborators. 2017. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 2015; 377 (1): 13-27.
- TOSCANO, C.M. As campanhas nacionais para detecção das doenças crônicas não-transmissíveis: diabetes e hipertensão arterial. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 9, n. 4, p. 885-895, 2004.
- VIGITEL. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde. Brasília, 2014.
- WANDERLEY, E. N.& FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, n. 1, p. 185–194, 2010.
- WANG J, KE W, BAO R, et al. 2017. Beneficial effects of ginger *Zingiber officinale* Roscoe on obesity and metabolic syndrome: a review. *Ann N Y Acad Sci. Jun*. 2017; 1398 (1): 83-98.
- WHITE B. 2007. Ginger: an overview. *Am Fam Physician*. 2007; 75 (11): 1-3.
- ZAEOUNG S, PLUBRUKARN A, KEAWPRADUB N. 2005. Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. *J Sci Technol*. 2005; 27 (4): 799–81.

ZARATE, R.; SUKRASNO; YEOMAN, M. M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. *Journal of Chromatography*, v. 609, p. 407 – 413, 1992