UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JÉSSICA JAMILA DALGÊ

**Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-
hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*)**

Pirassununga

2014

JÉSSICA JAMILA DALGÊ

Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

D142e	<p>Dalgê, Jéssica Jamila</p> <p>Estudo da capacidade antioxidante, anti-microbiana e anti-hemolítica do gengibre (<i>Zimber officinale</i>) /Jéssica Jamila Dalgê. -- Pirassununga, 2014. 70f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.</p> <p>1. ABTS 2. DPPH 3. Folin-Ciocalteau 4. NO 5. Hemácia 6. <i>S.aureus</i>. I. Título.</p>
-------	--

*Aos meus queridos pais Maria Cleusa e Evandro,
que com todo amor sempre investiram na minha educação
e me proporcionaram a realização de mais esta etapa;*

*À querida Professora Mariza,
e à especialista de laboratório e amiga Silvana,
pela dedicação ao ensino, à orientação segura e paciente,
pelos momentos de compreensão em minhas dificuldades e obstáculos,
pela confiança em mim depositada;*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e a toda a Universidade de São Paulo, pela oportunidade e o privilégio que tive em frequentar o Mestrado nessa tão renomada instituição de ensino.

À FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho;

À Professora Dra. Mariza Pires de Melo, pela orientação, dedicação e apoio, que certamente ajudaram e incentivaram a concluir essa jornada, deixo meu mais profundo agradecimento.

À especialista de laboratório Silvana Piccole Pungine, por toda a ajuda que me deu durante todos os experimentos realizados. À Sil, minha amiga, deixo um agradecimento mais que especial.

À pós-doutoranda Luciane Tavares, pela ajuda e conselhos que me deu durante toda essa jornada.

À Professora Dra. Elyara Silva e ao Ricardo Oliveira, pelo empréstimo de equipamentos necessários para realização de parte das análises;

Aos colegas de pós graduação pela amizade e troca de experiências, em especial Patrícia, Rafaella, Paulo, Alessandra, Pamela, Karen, Drucila e Paola, pelos maravilhosos momentos que partilhamos. Agradeço pelas risadas, pelos desabafos, pelos conselhos e até pelas lágrimas.

Ao Christian Hartung, meu namorado, que sempre me ajudou, apesar de não entender nada da área, com muita paciência, carinho e compreensão. Que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Muito obrigado.

O espaço limitado reservado a esta seção de agradecimentos não é suficiente para agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a completar este mestrado. Assim, deixarei algumas palavras que tentam expressar esse profundo sentimento de reconhecimento e agradecimento.

À Deus, que sempre me conduz.

RESUMO

DALGÊ, J.J. P.G. **Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*)** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O presente estudo teve como objetivo determinar a capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*) utilizando diferentes solventes extratores. Para tal, rasuras secas de gengibre foram trituradas e usadas na proporção 1:50 (p/v) nas quatro diferentes extrações: água, etanol (70%), acetona/ácido acético (70%/2%) ou acetona (70%). Após centrifugação, o extrato foi utilizado pra determinar o conteúdo de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteau e ação sobre os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]. Foi selecionado o melhor solvente extrator pelas propriedades antioxidantes e facilidade de sua remoção da matriz. Este extrato foi submetido à rotaevaporação, liofilização e ressuspensão em tampão fosfato salino (PBS) e, então, utilizado nos estudos biológicos de captura de NO, ação antioxidante sobre hemólise induzida e ação sobre o crescimento de *S. aureus*. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Para análise estatística empregou o software Minitab® com comparação entre grupos por ANOVA, diferenças significativas por Tukey e $P < 0,05$. O extrato de gengibre obtido em acetona apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos ($8,52 \pm 1,24$ mg equivalente de ácido gálico/g de gengibre). O extrato acetona apresentou menor valor de EC₅₀ e maior ação antioxidante mediante o ensaio com ABTS^{•+}, sendo respectivamente $0,07 \pm 0,01$ mg de massa seca do extrato/mL de ensaio e $10,93 \pm 0,79$ mg equivalentes de trolox (ET)/g de gengibre, sem diferença significativa com os valores obtidos nos extratos etanol e acetona/ácido. No ensaio do DPPH[•], o extrato acetona apresentou menor valor de EC₅₀ ($0,15 \pm 0,01$ mg de massa seca de extrato/mL de ensaio) e maior ação antioxidante ($8,35 \pm 0,60$ mg ET/g de gengibre), sem diferença significativa com relação ao extrato etanólico. Dentre todos os ensaios, a extração em água apresentou resultados menos satisfatórios. A acetona foi selecionada como solvente extrator dos componentes do gengibre para os estudos biológicos. O extrato de gengibre (17,25 mg de massa seca/mL) inibiu 50% da formação de produtos no ensaio de captura de NO, valor similar ao obtido pela presença do antioxidante ácido gálico. Concentrações menores de extrato também agiram sobre o NO, sendo que 1,25 mg/mL refletiu em 33% de inibição. A hemólise foi evitada em 100% pelo extrato de gengibre em concentrações acima de 113 µg de massa seca de extrato/mL, resultado similar ao encontrado no ensaio contendo ácido ascórbico. A lise das hemácias foi evitada em 44% na presença de extrato 57 µg/mL. O extrato de gengibre não apresentou ação antimicrobiana sobre *S. aureus*. Conclui-se o extrato de gengibre, nas condições deste estudo, apresenta atividade antioxidante sobre ABTS^{•+} e DPPH[•]; bem como sobre sistemas biológicos modelos como na captura de NO e lise de membrana celular.

Palavras-chave: ABTS; DPPH; Folin-Ciocalteau; NO; hemácia; *S. aureus*

ABSTRACT

DALGÊ, J.J. **Study of antioxidant capacity, antimicrobial activity and anti hemolytic action of ginger (*Zingiber officinale*)**. 2014. 70 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The aim of this study was to determinate antioxidant capacity, antimicrobial activity and anti hemolytic action of ginger (*Zingiber officinale*) extract obtained by different solvents. For this purpose, dried ginger flakes were powdered and used in ratio 1:50 (w/v) in the four different extractions: water, ethanol (70%), acetone/acetic acid (70%/2%) and acetone (70%). The extract was centrifuged and used for phenolic compounds determination by Folin-Ciocalteu and action on ABTS⁺ and DPPH[·] radicals. The best extractor solvent was selected by its antioxidant properties and easier elimination from the matrix. The select extract was submitted on evaporation and lyophilization, and subsequent re-suspension on phosphate buffer saline (PBS). Then, this suspension was used in biologic studies as NO scavenging, antioxidant action on induced hemolysis and effect on *S. aureus* growth. The values were express as mean and standard deviation. Statistical analysis carried out by Minitab® using ANOVA and Tukey to $p < 0.05$. Acetone ginger extract showed highest value of phenolic content (8.52 ± 1.24 mg galic acid equivalent /g of ginger). The acetone extract showed the lowest EC₅₀ value and higher antioxidant action on ABTS⁺, 0.07 ± 0.01 mg of dry weight of the extract/mL of assay and 10.93 ± 0.79 mg trolox equivalents (TE)/g of ginger, respectively. These values did not show significant difference in relation to ethanol and acetone/acid extracts. For DPPH[·] assay, acetone extract showed lower value of EC₅₀ (0.15 ± 0.01 mg dry weight of extract/mL assay) and higher antioxidant action (8.35 ± 0.60 mg TE/g of ginger), without significant difference in relation to ethanolic extract. Among all extracts, aqueous extract showed lesser satisfactory results. Acetone extract was selected for biological assays. Ginger extract (17.25 mg of dry weigth/mL) inhibited 50% of products formation on NO scavenging assay, similarly to galic acid results. Lower extract concentrations as 1.25 mg/mL inhibited 33% of NO. The 100% of hemolysis prevention was obtained by concentrations of ginger extract higher than 113 µg of dry weight of extract/mL of assay. Similar result was observed by presence of ascorbic acid. Erythrocytes lysis was avoided in 44% by 57 µg/mL of ginger extract. Ginger extract did not show antimicrobial action on *S. aureus*. In conclusion, ginger extract, in present conditions, showed antioxidant action on ABTS⁺ and DPPH[·] assays and in biological model systems as in NO scavenging assay and cell membrane lysis.

Key words: ABTS; DPPH; Folin-Ciocalteu; NO; erythrocytes; *S. aureus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da planta de <i>Zingiber officinale</i> , com detalhes das flores.	17
Figura 2. Visão interna e externa do rizoma de <i>Zingiber officinale</i>	18
Figura 3. Estrutura das principais classes de flavonóides.	28
Figura 4. Fenólicos totais dos diferentes extratos de gengibre sobre o reagente de Folin-Ciocalteu.	42
Figura 5. Efeito da concentração dos diferentes extratos de gengibre sobre a porcentagem de inibição do ABTS ⁺	44
Figura 6. Efeito da concentração dos diferentes extratos de gengibre sobre a porcentagem de inibição de DPPH•.	47
Figura 7. Concentração de nitrito avaliada ao longo do tempo de incubação na ausência e presença de extrato de gengibre em diferentes concentrações.	52
Figura 8. Porcentagem de hemólise de diferentes concentrações de gengibre submetidos à AAPH ao longo do tempo.	53
Figura 9. Crescimento em placa de <i>S. aureus</i> na presença de extratos de gengibre 7,52 (orifício b), 6,01 (orifício c), 4,51 (orifício d), 3,01 (orifício e) e 1,50 mg (orifício f). Gentamicina 10µg (orifício a) foi usada como controle. Foto ilustrativa de 3 experimentos..	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de EC50 e capacidade antioxidante relacionada ao trolox nos diferentes extratos de gengibre no ensaio do ABTS ⁺	45
Tabela 2. Valores de EC50 e capacidade antioxidante relacionada ao trolox nos diferentes extratos de gengibre no ensaio do DPPH.	48
Tabela 3. Valores de Compostos fenólicos e ação sobre ABTS e DPPH dos diferentes extratos de gengibre.	49
Tabela 4. Efeito inibitório do extrato de gengibre na produção de nitrito (NO ₂ ⁻).	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) diidrocloreídrico
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis(3-eilbenzotiazolínico-6-sulfônico)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
EC ₅₀	Concentração efetiva
EO	Estresse Oxidativo
ERN	Espécies Reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Equivalente de trolox
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Grama
GAE	Equivalente de ácido gálico
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Px	Glutathione-peroxidase
GSH-Rd	Glutathione-redutase
m _{AB}	Massa do béquer com a amostra seca
m _B	Massa do béquer
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mo	Molibdênio
NADPH	<i>β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>

NED	N-1(1-Nafitil)etilenodiamina)
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Galato de propila
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Radicais livres
rpm	Rotação por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TBHQ	Tercbutil- hidroquinona
TSB	Caldo de soja triptona
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Universidade de São Paulo
ZAB	Departamento de Ciências Básicas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
O ₂	oxigênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HClO	ácido hipocloroso
O ₂ ^{-•}	ânion-radical superóxido
OH [•]	radical hidroxila
¹ O ₂	oxigênio <i>singlet</i>
NO [•]	óxido nítrico
OONO ⁻	peróxinitrito
Fe ²⁺	íon ferroso
Cu ⁺²	íon de cobre
γ	gama
Fe ³⁺	íon férrico
HO ⁻	ânion hidroxil
SCN ⁻	tiocianeto
OSCN ⁻	tiocianato
OONO ⁻	Peróxinitrito
°C	graus Celsius
±	mais ou menos
μg	micrograma
ABTS ^{•+}	radical ABTS
DPPH [•]	radical DPPH
R [•]	espécie radicalar
μM	micromolar
K ₃ EDTA	<i>tripotassium ethylene diamine tetraacetic acid</i>
μL	microlitro
CO ₂	dióxido de carbono

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura	16
2.1 O gengibre	16
2.1.1 Descrição botânica.....	16
2.1.2 Descrição Geral	16
2.1.3 Rizoma.....	18
2.1.4 Aplicações.....	19
2.1.5 Composição	19
2.2 Estresse Oxidativo	20
2.3 Espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio	21
2.3.1 Ânion-radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	22
2.3.2 Radical Hidroxil ($OH^{\bullet}$)	23
2.3.3. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	24
2.3.4 Oxigênio Singlete (1O_2)	25
2.3.5 Ácido Hipocloroso ($HOCl$)	25
2.3.6 Óxido Nítrico ($NO^{\bullet}$) e Peróxinitrito ($OONO^{\bullet}$)	25
2.4 Potencialidade antioxidante do gengibre	26
2.4.1 Atividade antioxidante	26
2.4.2 Compostos fenólicos.....	27
2.4.3 Fontes alimentares de compostos antioxidantes	29
2.5 Potencialidade antimicrobiana do gengibre	30
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. Fluxograma de desenvolvimento do trabalho	33

5. Metodologia:	33
5.1 Obtenção da matéria prima	34
5.2 Obtenção dos extratos de gengibre em diferentes solventes	34
5.3 Determinação das concentrações dos extratos de gengibre	35
5.4 Determinação de compostos fenólicos por reagente Folin-Ciocalteu	35
5.4.1. Análise quantitativa do conteúdo de flavonoides totais	36
5.5 Capacidade antioxidante sobre o radical ABTS ^{•+}	36
5.6 Capacidade antioxidante sobre o radical DPPH [•]	37
5.7 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO [•])	38
5.8. Ensaio com eritrócitos <i>in vitro</i>	39
5.8.1. Preparo da suspensão dos eritrócitos	39
5.8.2 Incubação com 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorídrico (AAPH)	39
5.8.3 Avaliação da porcentagem de hemólise	39
5.9 Microbiologia	40
6. Análise dos dados	40
7. Resultados e Discussão	41
7.1 Determinação da Massa Seca dos extratos de gengibre	41
7.2 Características antioxidantes de extratos de gengibre	41
7.2.1 Determinação de compostos fenólicos	41
7.2.1.1 Flavonóides	43
7.2.2 Ação sobre o cátion radical ABTS ^{•+}	43
7.2.3 Ação sobre o radical DPPH [•]	46
7.2.4 Estudos de correlação entre os resultados obtidos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, ABTS ^{•+} e DPPH [•]	49
7.3 Estudos da ação do extrato de gengibre sobre sistemas biológicos	50
7.3.1 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO [•])	50
7.3.2 Ação antioxidante do extrato de gengibre sobre hemólise	53

7.3.3 Ação do extrato de gengibre sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	54
8. Conclusão	57
Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta herbácea composta por rizoma e parte aérea, de origem asiática, foi distribuído pelos continentes na era das grandes navegações e comércio de especiarias (Boletim, 2004). O rizomado gengibre é considerado uma especiaria, que é comercializada *in natura*, em conserva, cristalizado, seco e em pó (ELPO, 2004; NEGRELLE et al., 2005; DABAGUE et. al., 2011).

Essa planta originária da Ásia Tropical e do Arquipélago Malaio vem sendo cultivada mundialmente, e no Brasil como monocultura. As maiores áreas de produção de gengibre *in natura* no Brasil são as regiões litorâneas de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, também havendo a produção deste no litoral nordestino e do Espírito Santo, em alguns municípios de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro (DEBIASI; FELTRIN; MICHELUZZI, 2004; DESLANDES, 2013).

No mercado mundial, a China produziu, no ano de 2006, mais de 50 mil toneladas de gengibre *in natura*, liderando a produção mundial, enquanto que a Índia, grande produtora e consumidora dessa especiaria, representa 6% da oferta mundial, a produção de gengibre na Tailândia, Vietnã, Costa Rica e Honduras também movimentaram esse mercado. Neste mesmo ano o Brasil exportou cerca de sete mil toneladas e importou em média 45 toneladas, só no estado de São Paulo a exportação foi de 4 mil toneladas, e do Paraná de 1.200 toneladas (ALMEIDA; ELPO; GIROTTO, 2013; DESLANDES, 2013).

O destino da produção de gengibre dos municípios de Tapiraí e Piedade no estado de São Paulo indica um crescimento no consumo brasileiro de gengibre (TOMAZELA, 2013). A cidade de Morretes é a maior produtora de gengibre do estado do Paraná, e nessa região a colheita do gengibre ocorre no mês de julho, que é o final do período de festas juninas, sendo este utilizado em grande escala para temperar bebidas alcoólicas como o quentão. Ainda no estado do Paraná o gengibre é matéria prima do refrigerante Gengibirra da Cini (DESLANDES, 2013).

Essa especiaria vem sendo amplamente comercializada em função de seu emprego alimentar e industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de perfumes, bebidas, produtos de confeitaria tais como bolos, biscoitos, pães, biscoitos e geléias, e na indústria farmacêutica devido às propriedades antiinflamatórias, antibacteriana e antitumoral, bem como na medicina popular

(ZARATE, SUKRASNO E YEOMAN, 1992; HABSAH et al, 2000; DEDOV et al, 2002; MACHADO, et al., 2003; JOLAD, 2005; PRASAD, VIJAY, 2005; SHUKLA, SINGH, 2007).

As plantas, na grande maioria, são fontes naturais de antioxidantes, como compostos fenólicos e flavonóides e há uma tendência crescente na procura de antioxidantes naturais. Na indústria de alimentos são utilizados antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tercbutil- hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG), porém estudos demonstram a possibilidade destes compostos apresentarem efeitos tóxicos e carcinogênicos. Em muitos países esses compostos são restringidos, e os consumidores estão mais conscientes sobre sua dieta (DORMAN et al., 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; RUBERTO; BARATTA, 2000; ANDRADE et.al, 2012).

As especiarias são fontes de antioxidantes, sendo que algumas delas até mesmo superam os antioxidantes sintéticos, além de apresentarem benefícios à saúde (EL-GHORAB et al., 2010). Por apresentar constituintes aromáticos, voláteis e compostos pungentes o gengibre é usado para melhorar o aroma e a pungência na indústria de alimentos (PEREIRA et al., 2007). Apresentando também capacidade antioxidante, que é importante na estabilidade química de muitos produtos industriais, o gengibre contribui para retardar a autooxidação de óleos e gorduras em alimentos (CHRUBASIK, PITTLER, ROUFOGALIS, 2005; PEREIRA et.al., 2007).

Antioxidantes apresentam a capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, bem como retardar o envelhecimento celular, pois combatem o excesso de radicais livres no organismo. Os antioxidantes são produzidos pelo organismo e também obtidos da dieta (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

São escassos os estudos envolvendo as propriedades biológicas de espécies da família *Zingiberaceae* (Lindl., 1835, nom.cons.), a qual pertence o gengibre, inclusive no que se refere suas propriedades antioxidantes. Desta forma, estudos *in vitro* para se avaliar possíveis ações antioxidantes de extratos aquosos de gengibre, através de diferentes sistemas, podem se tornar uma base sólida de conhecimentos essenciais para futuras aplicações desta especiaria.

2. Revisão de Literatura

2.1 O gengibre

2.1.1 Descrição botânica

Pertencente ao gênero *Zingiber*, família *Zingiberaceae*, o gengibre (*Zingiber officinale*) foi descrito em 1807 pelo botânico inglês, William Roscoe (1753-1813). Estão inseridos na família *Zingiberaceae*, mais de 1200 espécies de plantas distribuída em 53 gêneros, especialmente abundante na região sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio. O gênero *Zingiber* inclui aproximadamente 85 espécies (FOSTER, 2013; ELPO, 2004).

Botanicamente, o gengibre está assim categorizado (ELPO, 2004):

Reino *Pantae*

Filo *Magnoliophyta*

Classe *Liliopsida*

Ordem *Zingiberales*

Família *Zingiberaceae* Lindl., 1835, nom.cons.

Gênero *Zingiber* P. Moller, 1754

Epíteto: *Zingiber officinale* Roscoe, 1807.

2.1.2 Descrição Geral

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta herbácea, perene, composta por rizoma e parte aérea (Figura 1). Na sua parte superior aérea, o gengibre possui pequenos tubérculos anelados, resultantes da base de antigos caules aéreos. A parte inferior da planta apresenta muitas raízes adventícias, de forma cilíndrica, carnosas e cor esbranquiçada. Seus caules são eretos, com folhas grandes lanceoladas, apresentando ramificações distintamente dispostas e com bainha na base, a qual envolve o caule. Apresenta também inflorescências dispostas em

espigas ovóides ou elipsóides com brácteas florais, as quais envolvem uma única flor. As flores são amarelo-esverdeada, zigomorfas e hermafroditas. Os frutos são capsulados triocular que se fende em três válvulas e as sementes são azuladas com albúmen carnososo (SILVESTRINI et al., 1996; GONZAGA, RODRIGUES, 2001; ELPO, 2004).

Figura 1. Visão geral da planta de *Zingiber officinale*, com detalhes das flores.
(Fonte: <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/107/koeh-146.jpg>, 2013)

2.1.3 Rizoma

O rizoma do gengibre, em sua parte externa, pode apresentar coloração amarelo ouro à marrom brilhante, enquanto que internamente é de coloração marrom amarelado. Seu corpo é composto por ramos fragmentados, alongados e um pouco achatados, variando de 3 à 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Externamente apresenta terminações que surgem obliquamente dos rizomas, conhecidas como “dedos”, as quais são achatadas e obovadas, de 1 a 3 cm de comprimento, apresentando também estrias na longitudinal (Figura 2).

Figura 2. Visão interna e externa do rizoma de *Zingiber officinale*.

(Fonte: <http://www.minhavidade.com.br/alimentacao/tudo-sobre/16281-gengibre-raiz-emagrecedora-e-antiinflamatoria>, 2013)

O córtex do gengibre é cilindro central e constituído principalmente por amido. Internamente apresenta endoderme amarela, a qual separa o córtex estriado do estelo largo, numerosos feixes fibrovasculares, muitas células oleoresinosas, contendo oleoresina e 1% a 4% de óleo essencial, com conteúdos amarelados e pontos acinzentados, feixes vasculares espalhados sobre toda a superfície. Pode apresentar odor agradável e aromático; sabor fortemente pungente (ZANCAN et al., 2002; ELPO, 2004).

2.1.4 Aplicações

Nativa do sudeste Asiático, o gengibre é uma planta aromática utilizada como condimento e erva medicinal desde a antiguidade em que, no Brasil, se tornou efetivamente comercial após a introdução de variedades de rizomas gigantes. Essa especiaria pode ser comercializada e consumida *in natura*, em conserva, cristalizado, seco e em pó, e é utilizado para fazer e aromatizar chá (ELPO, NEGRELLE, 2004).

O gengibre é utilizado no tratamento de artrite e doenças reumatológicas, também há indicações da utilização do mesmo no tratamento de dores de cabeça, enxaqueca, aterosclerose, artrite reumatóide, colesterol elevado, úlceras, depressão e impotência, além da utilização popular contra resfriado, sintomas de gripe (ALTMAN; MARCUSSEN, 2001; ELPO, NEGRELLE 2004; GRANT; LUTZ, 2000; LIANG; 1992; NEGRELLE et al., 2005). Seu óleo essencial é utilizado na indústria de alimentos como aromatizantes e condimento, e na indústria farmacêutica por suas propriedades antiinflamatórias, antibacteriana e antitumoral (MACHADO, et al., 2003; JOLAD, 2005; PRASAD; VIJAY, 2005; SHUKLA; SINGH, 2007).

Na China o chá de gengibre é indicado para tratamento de gripes, tosses, resfriados e resacas. No Japão o óleo dessa especiaria é utilizado em massagens para problemas nas articulações. Há recomendações fitoterápicas de banhos e compressas quentes de gengibre para aliviar sintomas de cólicas menstruais, problemas nos rins, gota, artrite, dores de cabeça e coluna (PALHARIN et al., 2008).

2.1.5 Composição

O gengibre apresenta numerosos constituintes, os quais variam de acordo com o local de origem e se os rizomas dos mesmos são frescos ou seco (ALI et al., 2008). Foram identificados em gengibre fresco 63 compostos, sendo que 20 deles até então eram desconhecidos, entre esses compostos encontram-se: gingerol, shogaol, 3-desidroshogaol, paradol, derivados acetilados de gingeróis e gingerdóis, derivados mono e di-acetilados de gingerdóis, 1-desidrogingerdionas,

diarileptanóides, e derivados de éter metílico de alguns destes compostos (JOLAD et al. 2004).

Em gengibre seco, processado comercialmente, foram identificados 115 compostos, sendo que destes, 45 já haviam sido previamente encontrados em gengibre seco, 88 já relatados e 31 eram novos compostos, tais como: metil-8-paradol, metil-6-isogingerol e 6-isoshogaol. Foram encontrados 6-, 8- e 12-gingerdionas, compostos estes que não haviam sido previamente relatados em gengibre branco e amarelo. Notou-se que as concentrações de gingeróis do gengibre seco foram ligeiramente reduzidas, enquanto que as concentrações de shogaóis aumentaram (JOLAD et al. 2005).

O gengibre apresenta compostos como aldeídos monoterpênicos, álcoois, bisaboleno, curcumeno, sesquifelandreno e zingibereno, contudo sua composição pode variar de acordo com a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, no entanto os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (ELPO, 2004; VAN BEEK et al., 1987).

Em estudos realizados por Andrade et al. (2012) foram encontrados no óleo essencial de gengibre os seguintes constituintes: 2-heptanol, α -pineno, canfeno, β -pineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, mirceno, 1,8-cineol, 2-nonanona, linalol, citronelal, borneol, isocitral, citronelol, neral, geraniol, geranial, 2-undecanona, acetato de geranila, curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -sesquifelandreno; sendo que seus constituintes majoritários foram: os monoterpênicos oxigenados geranial, neral, 1,8-cineol, geraniol, acetato de geranila e o monoterpêno bicíclico, canfeno.

2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos oxidantes (SIES, 1993). Esse desequilíbrio ocorre quando os mecanismos de proteção contra essas espécies estão deteriorados ou quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) estão aceleradas (GIASSON et al., 2002). Quando ocorre um estresse oxidativo moderado, há um aumento de

defesas antioxidantes enzimáticas, porém, quando há uma grande produção de espécies reativas, pode vir a causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

Oxidações de biomoléculas são processos naturais em seres aeróbios provenientes do metabolismo celular, em que são produzidos espécies reativas naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). É parte integrante do metabolismo humano a produção de ERO e/ou ERN, em que essas espécies reativas têm importante função biológica, como na fagocitose, porém, quando sua produção é exacerbada o organismo apresenta um sistema antioxidante eficiente em que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (VASCONCELOS et al., 2007).

Pressupõe-se que várias doenças degenerativas crônicas, como a aterosclerose, diabetes melito, câncer, envelhecimento celular precoce e patologias como mal de Alzheimer e mal de Parkinson, estejam relacionados com danos no DNA causados pelas espécies reativas (mutagênese e carcinogênese), bem como o estresse oxidativo (AMES et al., 1993; WITZUM, 1994; ROY; KULKARNI, 1996; STAHL; SIES, 1997; POULSEN et al., 1998; SORG, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.3 Espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio

Radicais livres (RL) são estruturas químicas que apresentam um ou mais elétrons livres ocupando um orbital atômico ou molecular. Devido a sua configuração, os radicais livres são altamente instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente instável, apresentando uma enorme capacidade de combinar-se inespecificamente com diversas moléculas da estrutura celular e seus derivados. Sua formação ocorre por absorção de radiação (ultravioleta ou visível), por reações redox ou por processo de catálise enzimática (BARREIROS et.al., 2006; SALVADOR; HENRIQUES, 2004). Os RL estão envolvidos no metabolismo celular dos seres vivos, e são gerados naturalmente durante processos de óxido-redução, tais como produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular, fagocitose e síntese de biomoléculas importantes (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

O processo de transferência de elétrons pode levar o oxigênio a formar espécie reativa de oxigênio e/ou espécie reativa de nitrogênio (BARREIROS et.al., 2006). Entretanto o termo ERO também é utilizado para as espécies não radicais derivados do O_2 como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO), entre outros (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

As principais ERO são: ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peróxinitrito ($OONO^{\bullet}$). Devido à reatividade das ER e, portanto, reagirem com substratos biológicos, e causarem danos às biomoléculas, afetando a saúde humana, os organismos aeróbios desenvolveram sistemas de defesa eficientes contra o estresse oxidativo, estes chamados de antioxidantes. Porém, quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas (NIKKI, 2010).

O excesso de ER é prejudicial ao organismo, podendo causar, dentre outras, a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Devido a esses efeitos prejudiciais, as ER estão relacionados com várias doenças, como artrite, choque hemorrágico, cardiopatias, catarata, disfunções cognitivas e câncer, podendo também ser a causa ou o fator agravante do quadro geral dessas doenças (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1992; BARREIOS, et.al., 2006).

2.3.1 Ânion-radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O ânion-radical superóxido é formado por diversos processos celulares, como na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e é produzido na ativação de células fagocitárias, sendo o radical mais comum e abundante na célula. Sua formação ocorre quando o oxigênio molecular sofre redução formando o $O_2^{\bullet-}$ e passa a apresentar a configuração eletrônica com número ímpar de elétrons na ultima camada de valência (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Este radical é pouco reativo, sua atuação como oxidante direto é irrelevante, sendo pouco citotóxico quando apresentado isoladamente, porém seus efeitos deletérios surgem de sua

habilidade em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical hidroxil (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O radical $O_2^{\bullet-}$, *in vivo*, é gerado por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. A produção desse radical conta com o auxílio da enzima leucócito NADPH oxidase, a qual catalisa a redução por um elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH. Dessa forma o $O_2^{\bullet-}$ também é importante para as células de defesa, pois sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos (HALLIWELL et al., 2000; BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

2.3.2 Radical Hidroxil ($OH^{\bullet}$)

Sendo considerado a ERO mais reativa, mais lesiva e deletéria, o $OH^{\bullet}$ uma vez formado, reage com uma série de endobióticos, causando modificações no DNA, danos nas proteínas e inativação enzimática e peroxidação lipídica, já que o organismo humano não dispõe de mecanismos de defesa contra o mesmo (VASCONCELOS et. al., 2007).

O radical hidroxil é capaz de retirar átomos de hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos poliinsaturados, iniciando à peroxidação lipídica e promovendo lise na membrana celular, *in vivo* pode ser formado principalmente por dois mecanismos:

I) Pela reação de Fenton (1) e Haber-Weiss (2), onde o H_2O_2 reage com metais de transição (Fe^{+2} e Cu^{+2})

II) Por fissão homolítica (homólise) da água na exposição à radiação ionizante (UV, raios Gama e X), (3) (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

A incidência de luz da radiação ultravioleta, radiação γ e raios X podem produzir o radical $\text{HO}\cdot$ nas células da pele. Em consequência de ataques intensivos e frequentes deste radical, podem ocorrer mutações no DNA e, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical $\text{HO}\cdot$ reparar os danos causados por ele ou impedir sua formação (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

2.3.3. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio, isoladamente é praticamente inócuo, e apesar de não ser considerado um RL, é importante, pois pode se difundir facilmente através das membranas celulares e participa das reações que produzem o radical $\text{OH}\cdot$ na presença de metais, como o ferro. O H_2O_2 , *in vivo*, é gerado pela dismutação do $\text{O}_2\cdot^-$ ou pela β -oxidação de ácidos graxos (HALLIWELL, 2000; BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

As mitocôndrias, que são fontes de $\text{O}_2\cdot^-$, também são ricas em superóxido dismutase (SOD) que converte esse ânion-radical em H_2O_2 , desta forma, o peróxido de hidrogênio gerado é parcialmente eliminado por catalase, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina. Porém, essa eliminação tem baixa eficiência e grande parte do H_2O_2 é liberado para outras regiões da célula.

O H_2O_2 pode ser encontrado em bebidas, como chá e café instantâneo, o qual é rapidamente difundido pelas células da cavidade oral e do trato gastrointestinal. Podendo também ser produzido por bactérias presentes na boca, durante a oxidação de substâncias e ser utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipohalogenosos, oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos, entretanto apresentam efeitos deletérios quando expostos às moléculas biológicas (VOGT, 1995; HALLIWELL et al., 2000).

2.3.4 Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)

Oxigênio singlete é uma molécula de oxigênio eletronicamente excitada, podendo ser gerado por reações luminosas, entre outras reações. É a forma mais deletéria do oxigênio ao organismo, devido a sua capacidade de causar ou intermediar a toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos, também é capaz de modificar o DNA diretamente e reagir com moléculas biológicas. (VASCONCELOS et. al., 2007; BARREIROS, 2006).

Em meio orgânico, o oxigênio singlete reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações são do tipo eno e dieno (reações de Diels-Alder). Devido a essa ERO reagir principalmente com os carotenóides, pelas múltiplas insaturações conjugadas, o $^1\text{O}_2$ reage mais lentamente com os ácidos graxos que com o β -caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles reagem (BARREIROS, 2006).

2.3.5 Ácido Hipocloroso (HOCl)

Espécie não radicalar, o ácido hipocloroso é extremamente oxidante, oxida um grande número de compostos biológicos como tióis, tioéteres, aminas, aminoácidos, nucleotídeos, ascorbatos, fenóis e ligações insaturadas, oxidando também ferro e proteínas. É capaz de gerar outras ERO, tais como, oxigênio singlete e radical hidroxil (WEISS, 1989; LAPENNA; CUCCURULLO, 1996; VASCONCELLOS et.al., 2007).

2.3.6 Óxido Nítrico ($\text{NO}\bullet$) e Peróxinitrito (OONO^-)

O óxido nítrico é um composto sintetizado pelos organismos vivos a partir do momento que a óxido nítrico sintase (NOS) torna-se cataliticamente ativa, convertendo o aminoácido L-arginina a $\text{NO}\bullet$ e L-citrulina (outro aminoácido). Quando estimulados, os fagócitos humanos também podem produzir esse radical em maior

quantidade. É um radical livre que age em uma variedade de processos biológicos, tais como relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. Difundindo-se rapidamente entre e dentro das células, porém não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$. e quando exposta ao ar reage com o oxigênio formando NO_2 (MACMICKING et.al., 1997; HALLIWELL, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

O peroxinitrito é formado pela reação o $O_2^{\cdot-}$ e o $NO^{\cdot}$, sendo um potente oxidante instável, com propriedades similares ao radical hidroxil, causa danos a muitas moléculas biológicas (EISERICH et al., 1996; HALLIWELL, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

2.4 Potencialidade antioxidante do gengibre

2.4.1 Atividade antioxidante

Antioxidante é qualquer substância ou grupo de compostos que, se presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, atrasam ou inibem significativamente os processos oxidativos, retardando e/ou prevenido a oxidação de biomoléculas de maneira eficaz, e assim os processos de reação em cadeia (SIES; STAHL, 1995; MOREIRA et al., 2001; AL-MAMARY et al., 2002; CHANWITHEESUK et al., 2005; WU et al., 2005; LIMA et al., 2006), e consequentemente previne e/ou repara danos ocasionados às células pelas ER (CHANWITHEESUK et al., 2005).

Em sistemas aeróbios, normalmente existe o equilíbrio entre agente óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. As células possuem um sistema que pode atuar em duas linhas para se proteger: uma atuando como detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão, sendo esta constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E; e a outra, que tem a função de reparar a lesão ocorrida, e é constituída pelo ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros (HEBBEL, 1986; ROSS 1991).

Os antioxidantes podem ser classificados como primários ou secundários de acordo com seu modo de ação, sendo que os primários são aqueles que atuam na

interrupção da cadeia de reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, de modo a convertê-los em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, que irá formar complexo lipídio-antioxidante, o que pode reagir com outro radical livre, enquanto que os antioxidantes secundários irão atuar retardando a inicial da autoxidação, por diferentes meios, entre eles a complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos formando espécie não radicalar, absorção de radiação ultravioleta e a desativação de oxigênio *singlete* (ADEGOKE et al, 1998).

Estão presentes em compostos bioativos com ação antioxidante a classe de fenóis, ácido ascórbico, ácidos fenólicos e seus derivados, ácido fítico, aminoácidos, flavonóides, fosfolipídios, tocoferóis, pigmentos e esteróis. Os compostos fenólicos vêm recebendo muita atenção nos últimos anos devido a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica, (XING, 1996).

2.4.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são antioxidantes obtidos por animais e humanos exogenamente e apresentam atividade benéfica devido a sua capacidade de sequestrar os radicais livres, inibindo processos de oxidações (DECKER, 1997; BARREIROS, 2006). Quimicamente, compostos fenólicos são substâncias que possuem anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas ligados ao anel, como por exemplo, os flavonoides (Figura 3).

Figura 3. Estrutura das principais classes de flavonóides.

(Fonte: CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007, p. 446)

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante devido principalmente a sua estrutura química e suas propriedades redutoras, essas características são importantes fatores no sequestro de ER e quelação de metais de transição, pois agem tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (JIMÉNEZ-ESCRIG, et al 2000).

Compostos fenólicos são os principais compostos antioxidantes presentes em frutas e vegetais e, constituem uma ampla classe, com cerca de mais de cinco mil fenóis, como os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI, 1995; JIMÉNEZ-ESCRIG, et al 2000; LEE, et al 2005). Os flavonóides atuam na inativação das ER, tanto nos compartimentos celulares lipofílicos quanto no hidrofílico, apresentam a capacidade de doar átomos de hidrogênio, inibindo as reações em cadeia provocadas pelas ER (HARTMAN; SHANKEL, 1990; ARORA et al., 1998). As folhas e raízes das plantas são ricos em compostos fenólicos, os quais apresentam poderes de inibir ou diminuir o efeito deletério das ERO e ERN no organismo.

Para combater o excesso de ER, os seres vivos utilizam antioxidantes produzidos pelo próprio corpo (endógenos) ou podem ser absorvidos na dieta (exógenos). Muitos desses compostos exógenos são encontrados em gengibre,

como flavonóides, flavonas glicosídeos, rutina, entre outros (ARUOMA et al, 1997; FINLEY, 2011).

2.4.3 Fontes alimentares de compostos antioxidantes

São fontes naturais de antioxidantes substâncias como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que funcionam como sequestradores de ER, e que podem também agir como quelantes de metais. Dentre os compostos típicos estão a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (ROESLER et.al.,2007; LUZIA; JORGE, 2010).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram que antioxidantes presentes em cereais, frutas e vegetais contribuem para a baixa incidência de doenças crônicas e degenerativas em populações que apresenta alta ingestão desses alimentos (ROESLER et.al.,2007; MORAES et.al., 2009). Hábitos como o tabagismo, o uso de álcool e de medicamentos, além de condições nutricionais, a poluição do ar entre outros fatores podem diminuir os níveis de antioxidantes celulares, que podem ser restabelecidas com dietas apropriadas e suplementos vitamínicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A maioria das plantas apresenta complexos fenólicos que inibem a formação de ER. São fontes de antioxidantes naturais frutas, hortaliças e especiarias, tais como framboesa, amora preta, groselha, cereja, ameixa, morango, romã, carambola, goiaba, uva, maçã, manga, kiwi, melão, mamão, abacate, coco, melancia, banana, laranja, baguaçu, jambolão, abacaxi, brócolis, couve, espinafre, cenoura, cebola, alface, batata, cenoura, chuchu, grão de pimenta, orégano, noz-moscada, alecrim, dentre outros (OLIVEIRA et.al., 2009).

Extratos de gengibre são ricos em gingeróis e shogaóis que apresentam atividade antioxidante (KIKUZARI; NIKATANI, 1993), assim torna-se importante ampliar os conhecimentos sobre a utilização do gengibre como um antioxidante natural que pode exercer proteção contra danos oxidativos.

2.5 Potencialidade antimicrobiana do gengibre

Determinadas espécies de plantas, conhecidas como especiarias, são usadas por milhares de anos na dieta humana para realçar o sabor, a cor e o aroma dos alimentos. Contudo essas plantas são também conhecidas pelo seu poder antioxidante e também antimicrobiano (TRAJANO et al., 2009, 1990; SALIE et al., 1996; SHOBANA; NAIDU, 2000; WOOD et al., 2001; SINGH et.al., 2008).

Diversos estudos relatam a ação inibitória das especiarias e de seus óleos em diferentes micro-organismos. Atualmente existe um grande interesse na utilização de especiarias como agentes antimicrobianos devido a uma questionável segurança dos aditivos químicos (TRAJANO et al., 2009). A literatura científica na área da ciência e tecnologia, também vem mostrando um enfoque no estudo de especiarias contra micro-organismos, e considerando a inclusão nos chamados sistemas de bioconservação, que são procedimentos naturais capazes de prover a extensão da vida útil de alimentos com satisfatória segurança microbiológica (FIORENTINI et al., 2001; RISTORI; PEREIRA; GELLI, 2002; UTAMA et al., 2002).

A segurança de alimentos é essencial para os consumidores e para todos os órgãos responsáveis pela saúde pública. A contaminação de alimentos por micro-organismos está principalmente relacionada com as bactérias, pois elas atuam sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH, e condições do meio ambiente (ANDRADE, 2012). Um contaminante frequente em alimentos é o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, agente que possui muitas linhagens patogênicas e que possui grande capacidade de adaptação a condições adversas, representando um importante agente de toxi-infecção alimentar (CARMO et al., 2002; SERIDAN et.al., 2012).

As espécies de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas, que podem levar ao quadro de intoxicação, sendo os principais sintomas náuseas, vômito e diarreia, e em idosos, crianças e imunodeprimidos a intoxicação estafilocócica pode ser fatal (CARMO, 2001; BORGES et al., 2008; GIEZENDANNER et al., 2009; OSTYN et al., 2010). Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, ou seja, permanecem ativas após a ingestão, apresentando

também termoestabilidade, capacidade de resistir a tratamentos térmicos (SENGER et.al. 2011).

O gengibre, além de ser uma especiaria muito utilizada mundialmente, também é um vegetal que possui inúmeras propriedades como anti-inflamatória, diurética, estimulante, expectorante, antisséptica, desintoxicante, digestiva, antidepressiva e inclusive bactericida. Desta forma, torna-se importante verificar também uma possível ação antimicrobiana desta planta sobre *S. aureus*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi determinar as propriedades antioxidantes, anti-hemolítica e antimicrobiana do gengibre (*Zingiber officinale*) por meio de diferentes solventes extratores.

3.2 Objetivos Específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos determinar as propriedades antioxidante, anti-hemolítica e antimicrobiana do gengibre (*Zingiber officinale*), por meio de extrações em água, etanol (70%), acetona(70%)/ácido acético(2%) e acetona 70%, avaliando-se:

- Fenólicos totais pelo ensaio de Folin-Ciocalteu e conteúdo de flavonóides nos extratos de gengibre;
- Ação dos extratos de gengibre sobre ABTS^{•+} e DPPH[•];
- Ensaio de captura do óxido nítrico (NO[•]) pelos extratos de gengibre;
- Ação dos extratos de gengibre sobre hemólise induzida;
- Ação dos extratos de gengibre sobre *Staphylococcus aureus*.

4. Fluxograma de desenvolvimento do trabalho

5. Metodologia:

5.1 Obtenção da matéria prima

O gengibre (*Zingiber officinale*) foi adquirido em forma de rasuras do Distribuidor de Insumos Farmacêuticos Flores e Ervas Com. Farm. Ltda (FLORIEN).

5.2 Obtenção dos extratos de gengibre em diferentes solventes

Neste estudo foram utilizados quatro tipos de solventes para a extração: 1) água; 2) acetona 70%; 3) etanol 70% e 4) solução de acetona (70%), ácido acético (2%) e água (28%).

Os extratos foram obtidos da seguinte forma: as rasuras de gengibre (*Zingiber officinale*) foram trituradas em liquidificador da marca Walita, em potência máxima por 1 minuto e armazenadas em frasco âmbar. Um grama de amostra foi adicionado a 20 mL de cada solvente. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 2 minutos e colocadas em gelo em agitador (Agitador TE – 420 Tecnal) por 1 hora a aproximadamente 75 rpm.

Os extratos foram centrifugados por 15 minutos, a 4.000 rpm e 20 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico, completado o volume para 50 mL e filtrado em papel filtro qualitativo. Os extratos obtidos foram congelados a temperatura de -18°C até o momento das análises. Estes extratos obtidos de diferentes solventes foram analisados quanto ao conteúdo de fenólicos totais incluindo os flavonóides, capacidade antioxidante sobre os radicais ABTS⁺ e DPPH.

Os extratos obtidos com acetona 70%, como solvente, foram analisados quanto ao conteúdo de flavonoides totais, sequestro de óxido nítrico, atividade anti-hemolítica em eritrócitos e atividade antimicrobiana. Para a realização destas análises, a acetona foi removida por rotoevaporação (Evaporador rotativo SL 126 - SOLAB) à temperatura máxima de 40°C e posteriormente liofilizado (Terroni LC 1500). As amostras liofilizadas foram ressuspensas em água ultra pura até completa dissolução.

5.3 Determinação das concentrações dos extratos de gengibre

As concentrações dos extratos de gengibre nos diferentes solventes, assim como a concentração da solução aquosa obtida após liofilização do extrato acetônico foram determinadas através de quantificação da matéria seca. Desta forma, 1 mL das soluções foi transferido para um béquer, previamente seco em estufa (Fanem) a 105°C por 1 hora, e com massa conhecida. A solução foi colocada em estufa para secagem a 105°C até obtenção de peso constante (aproximadamente 1 hora). A massa seca da amostra foi determinada pela equação 1. Deste modo, foi possível relacionar volume de amostra e massa seca.

$$Massaseca(g) = m_{AB} - m_B \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

m_{AB} = massa do béquer com a amostra seca (g)

m_B = massa do béquer (g)

5.4 Determinação de compostos fenólicos por reagente Folin-Ciocalteu

Para quantificar o poder redutor das amostras foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Georgé et al. (2005). Neste método uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, na qual o molibdênio (Mo) encontra-se em estado de oxidação VI (cor amarela) e na presença de certos agentes redutores, incluindo os compostos fenólicos, é capaz de receber um elétron em decorrência da mudança do seu estado de oxidação para, produzindo assim um complexo de coloração azul (molibdênio-tungstênio) V (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Para os ensaios, os extratos de gengibre foram diluídos 1:5 (extrato:solução extratora) e incubados na proporção 1:10 com reagente de Folin-Ciocalteu 10%. Após 2 minutos, foi adicionado carbonato de sódio 7,5% para tornar o meio alcalino e posteriormente os tubos foram incubados por 15 minutos em banho maria a 50°C. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Beckman Coulter) a 760 nm, com a realização de um “branco”, no qual a amostra foi substituída pela solução

extratora. Como o extrato de gengibre apresenta uma cor amarelo-dourada também foi feito um branco da amostra seguindo o mesmo procedimento, mas sem a adição do reagente de Folin-Ciocalteu.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão em mg equivalente de ácido gálico por 100g de gengibre, calculados a partir da curva padrão de ácido gálico com concentrações que variaram de 0,5 a 6 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.1. Análise quantitativa do conteúdo de flavonoides totais

A quantificação dos flavonóides totais presentes no extrato de gengibre foi realizada em acordo com o método colorimétrico descrito por Miliauskas et.al. (2004), com modificações. A técnica de quantificação de flavonóides é frequentemente empregada, sendo fundamentada no uso de cloreto de alumínio. O método se baseia no fato do cátion alumínio formar complexos estáveis com os flavonóides, formando um cromóforo amarelo que apresenta absorção máxima a 415-425 nm (Farmacopéia Brasileira, 1988; WOISKY; SALATINO, 1998; CHANG et al., 2002).

O ensaio para determinação do conteúdo de flavonóide total foi realizado em etanol 70%, na presença de cloreto de alumínio 2% e amostra (6 mg/mL). Após 40 minutos, em temperatura ambiente, e ao abrigo da luz, foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro (Beckman Coulter - DU 800) 415nm. Foi realizado um ensaio "branco" em que a amostra foi substituída por água.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão em mg equivalente de quercetina por g de gengibre, calculados a partir da curva padrão de quercetina com concentrações que variaram de 0,0047 a 0,3 mg/mL.

5.5 Capacidade antioxidante sobre o radical ABTS^{•+}

O ensaio com o radical ABTS^{•+} ((2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)) é utilizado para determinar a atividade antioxidante de compostos com natureza hidrofílica e lipofílica, e que se baseia na redução de radicais ABTS^{•+} por antioxidantes presentes nos extratos de plantas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007;

DUDONNÉ et al., 2009). O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Re et al., 1999, com algumas modificações. Primeiramente, o radical ABTS^{•+} foi formado por meio da reação de ABTS 7mM e persulfato de amônio 2,45 mM ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e agitação constante por 12 à 16 horas. A solução de ABTS foi diluída em etanol absoluto até que atingisse uma absorbância entre 0,700 e 0,800 à 750 nm. Quando necessário o extrato foi diluído no solvente extrator de acordo com a capacidade antioxidante de cada amostra.

Diferentes concentrações da amostra foram incubadas com a solução de ABTS^{•+} por 6 minutos a 25°C para determinação do EC₅₀ (Concentração efetiva de amostra necessária para reduzir 50% do ABTS^{•+} inicial na reação). As absorbâncias dos ensaios foram medidas em espectrofotômetro (Beckman Coulter - DU 800) a 750 nm após 6 minutos e utilizadas para o cálculo de ABTS^{•+} sequestrado pelas amostras. A atividade foi avaliada através da redução na absorbância do ABTS^{•+} comparado ao controle (ensaio realizado na ausência de amostra).

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão em mg equivalente de Trolox por g de gengibre, calculados a partir da curva padrão do Trolox com concentrações que variaram de 1,23 a 6,3 μ g/mL. Os valores de EC₅₀ foram expressos em mg/mL de extrato.

5.6 Capacidade antioxidante sobre o radical DPPH[•]

O DPPH[•] é um radical estável muito utilizado para se verificar a capacidade antioxidante de extratos vegetais e consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre, 2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R[•]) presente na amostra, convertendo-o em sua forma reduzida 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), cuja absorbância pode ser avaliada a 515nm (MORAES et.al. 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

O ensaio com DPPH[•] foi realizado de acordo com Rufino et al., (2007), com modificações. Foi utilizada uma solução de DPPH[•] 72 μ M em metanol, e a amostra foi adicionada em diferentes concentrações para determinação do EC₅₀ (Concentração mínima de amostra necessária para reduzir 50% do DPPH[•] inicial na reação).

As absorbâncias dos ensaios foram medidas em espectrofotômetro a 515 nm após 180 minutos e utilizadas para o cálculo de DPPH[•] sequestrado pelas amostras.

A atividade foi avaliada através da redução na absorbância do DPPH* comparado à solução controle.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão em mg equivalente de Trolox por g de gengibre, calculados a partir da curva padrão de Trolox com concentrações que variaram de 0,32 a 6,3 μ g/mL. Os valores de EC50 foram expressos em mg/mL de extrato.

5.7 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO*)

Em pH fisiológico, o nitroprussiato de sódio produz óxido nítrico, um radical hidrossolúvel e lipossolúvel que interage rapidamente com o oxigênio para produzir íons de nitrito (NO₂⁻), os quais podem ser quantificados pela reação de Griess (EBRAHIMZADEH et al., 2010).

O ensaio da captura do óxido nítrico foi realizado de acordo com YEN; LAI; CHOU (2001), com modificações de acordo com MAIA et.al., (2010). O ensaio foi realizado em PBS (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM; PBS) e nitroprussiato de sódio 10 mM. Diferentes concentrações do extrato de gengibre (1,25, 2,5, 5,0 e 7,5 mg/mL) foram adicionadas em solução de nitroprussiato e incubadas em *shaker* a 25°C em agitação constante de 70 rpm. por 180 minutos. Um ensaio sem amostra foi utilizado como controle (100% de formação de nitrito). Após incubação uma alíquota de todos os ensaios foi retirada e transferida para uma placa de 96 poços e incubada com o reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e solução de N-1(1-Nafitil)etilenodiamina) (NED) 1%), sendo que primeiramente foi adicionada a solução de sulfanilamida e após 5 minutos a solução de NED. As leituras foram realizadas após incubação por mais 5 minutos em leitor de microplaca (Thermo Scientific Uniscience ®) a 540 nm.

Foi realizada uma curva de calibração de nitrito de sódio com concentrações que variaram de 1,6 a 100 μ M, a fim de determinar as concentrações de nitrito nos ensaios. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão em % de inibição, em relação ao ensaio controle.

5.8. Ensaio com eritrócitos *in vitro*

5.8.1. Preparo da suspensão dos eritrócitos

Eritrócitos obtidos de sangue de cabras (raça Saanen, 3 anos de idade), aparentemente saudáveis, que não faziam parte de experimentos que pudessem interferir no estresse oxidativo. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética da FZEA/USP e autorizada pelo número de processo 13.1.2371.74.4/USP.

Amostras de sangue venoso foram coletados em tubos para coleta de sangue à vácuo com anticoagulantes EDTA e centrifugados a 3.861 rpm à 4°C por 10 minutos. O plasma e a camada de leucócito foram removidos por aspiração, e os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução PBS. Após a última lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em PBS de modo a se obter uma suspensão com hematócrito de 5%. A concentração de eritrócitos foi determinada utilizando centrifuga de microhematócrito (Quimis, Q222HM22).

5.8.2 Incubação com 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) diidrocloreto (AAPH)

Para avaliar a ação anti-hemolítica do extrato de gengibre foi realizado ensaios em acordo com a metodologia descrita por Yang (2006) com modificações. O ensaio foi conduzido com eritrócitos 1% em PBS, a 37°C sob agitação lenta 75 rpm (Agitador TE – 420 Tecnal) durante 30 minutos. Foram realizados os seguintes ensaios: 1) somente eritrócitos (hemólise espontânea); 2) eritrócitos na presença de ácido ascórbico (40 mM); 3) eritrócitos na presença de extrato de gengibre (56,6, 113 a 566 µg/mL). Estes ensaios foram pré-incubados por 30 minutos, e posteriormente, em cada ensaio foi adicionado AAPH (5 mM), um potente indutor de hemólise. Os eritrócitos em um volume final de 5 mL de ensaio foram, então, incubados à 37°C por 5 horas, sob agitação constante a 70 rpm e ao abrigo da luz.

5.8.3 Avaliação da porcentagem de hemólise

Durante as 5 horas de incubação, de hora em hora, foram retiradas alíquotas de 300 µL de cada ensaio e transferidas para micro tubos com 700 µL de PBS, os

mesmos foram homogeneizados e colocados em gelo para cessar a reação. Em seguida, os micros tubos foram centrifugados à 4.000 rpm (Eppendorf, 5810R) à 4°C por 5 minutos, transferiu-se 300µL do sobrenadante para uma microplaca de 96 poços, e procedeu-se com a leitura das absorbâncias em leitor de microplacas (Thermo Scientific Uniscience ®) à 540nm, no qual verifica-se a ocorrência de hemólise pela presença de hemoglobina. Os resultados foram expressos em % de hemólise, em relação a 100% de hemólise, obtida de ensaio de hemólise em água.

5.9 Microbiologia

Para os ensaios de microbiologia foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. O micro-organismo foi incubado em meio TSB ("Tryptone Soya Broth") por 24 horas sob agitação de 100 rpm à 37°C. Posteriormente, a suspensão de bactérias foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, o sedimento ressuspensionado em PBS e diluído para obtenção da turbidez de 3×10^8 UFC/mL equivalente da escala McFarland.

O plaqueamento foi realizado pelo método "Spread Plate" no qual 100 µL da suspensão de bactérias foram inoculados em ágar Mueller-Hinton para crescimento do micro-organismo. Em seguida, foram feitos seis furos de 6 mm no ágar, sendo um primeiro furo (ensaio controle) preenchido com o antibiótico gentamicina (10 µg/mL) e os outros cinco furos com o extrato de gengibre nas respectivas concentrações de 7,5, 6,0, 4,5, 3,0 e 1,5 mg/mL.

As placas foram incubadas em aerobiose, a 37°C por 24 horas, e após este período foram realizadas as medidas dos halos de inibição. As imagens fotográficas foram registradas por meio de câmera digital (Sony®).

6. Análise dos dados

A comparação entre grupos foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% de probabilidade, através do software Minitab® 16.2.2 (2010 Minitab Inc.). Para as diferenças significativas foram aplicadas comparações entre médias usando o teste Tukey.

7. Resultados e Discussão

7.1 Determinação da Massa Seca dos extratos de gengibre

A massa seca dos extratos de gengibre obtidos a partir do volume total de extração (1 g de gengibre em 50 mL) em água, etanol, acetona/ácido ou acetona foi de $9,70 \pm 0,71$, $8,37 \pm 0,71$, $9,32 \pm 0,74$ e $8,10 \pm 0,42$ mg por mL de extrato. Entretanto, no extrato concentrado de acetona obtido após rota-evaporação, liofilização e solubilização em PBS a massa seca foi de $138,50 \pm 19,05$ mg por mL do extrato concentrado. Valores expressos como média e desvio padrão para $n = 3$.

7.2 Características antioxidantes de extratos de gengibre

7.2.1 Determinação de compostos fenólicos

O conteúdo de fenólicos totais baseado no do poder redutor dos diferentes extratos de gengibre sobre o molibidênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu estão apresentados na Figura 4. Houve diferença significativa entre os valores do poder redutor dos extratos, com exceção dos extratos etanol e acetona/ácido que não apresentaram diferença entre si. O extrato aquoso apresentou o menor valor de poder redutor e, entretanto, no extrato acetona obteve o maior poder redutor o que reflete maior conteúdo de fenólicos totais. Estudos mostram que, pela sua estrutura química, os polifenóis sequestram radicais livres e agem como antioxidantes (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997), colaborando com os resultados obtidos para os extratos de gengibre.

Figura 4. Fenólicos totais dos diferentes extratos de gengibre sobre o reagente de Folin-Ciocalteu. Resultados como média e desvio padrão (n = 6). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A quantificação do poder redutor pode ser realizada por vários métodos, contudo o reagente de Folin-Ciocalteu é o mais extensivamente utilizado (OLIVEIRA, 2009).

Ranilla et al. (2010) ao utilizar extrato aquoso de gengibre obteve cerca de 3,7 mg EAG/g de gengibre, valor este semelhante ao obtido no presente estudo. Outros estudos realizados por Ghasemzadeh, Jaafar e Rahmat (2010) apresentaram resultados com uma variação de 10,2 a 13,5 mg EAG/g de gengibre em extratos metanólicos. Na literatura, são escassos os estudos utilizando-se extratos aquosos de plantas, dificultando discussões sobre o extrato aquoso de gengibre.

Porém, é possível encontrar estudos sobre gengibre por meio de outros tipos de extrações. Moraes et al. (2008) investigaram o conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos de gengibre a partir do método de extração fluido supercrítico, obtendo valores de 136 mg EAG/g de amostra. Stoilova et al. (2007), utilizando extração em alta pressão de CO_2 , obteve resultados de 871 mg EAG/g de extrato seco, sendo que em ambos os casos os valores obtidos de compostos fenólicos foram superiores aos do presente estudo.

7.2.1.1 Flavonóides

O método empregado para determinação do conteúdo de flavonóides não foi sensível para os extratos de gengibre obtidos a partir do volume total de extração em água, etanol, acetona-ácido ou acetona. Porém, o extrato concentrado de acetona apresentou $0,63 \pm 0,18$ mg equivalente de quercetina (EQ)/g de gengibre. Resultados apresentados como média e desvio padrão ($n=3$).

Oboh, Akinyemi e Ademiluyi (2010), estudando extrato aquoso de gengibre encontraram 34,55 mg EQ/100g de amostra, valores próximos ao encontrados neste estudo. Em contrapartida, Ghasemzadeh, Jaafar e Rahmat (2010) encontraram valores de 3,66 e 4,21 mg EQ/g de gengibre em extrato metanólico de duas variedades diferentes deste cultivar, valores superiores aos encontrados neste estudo sugerindo que o metanol apresenta maior capacidade extratora.

Os flavonóides apresentam capacidade antioxidante e seus efeitos são benéficos a saúde humana. Estudos indicam que o mecanismo de ação dos flavonóides é por meio da captura de espécies reativas (AMIR et al. 2008).

7.2.2 Ação sobre o cátion radical ABTS⁺

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos de gengibre sobre o cátion radical ABTS⁺ foram expressos em porcentagem de inibição em relação à massa seca do extrato presente no ensaio, em EC₅₀ e em equivalente de trolox/g de gengibre. Sendo que EC₅₀ corresponde à concentração efetiva (do inglês *efetive concentration*) do extrato de gengibre necessária para exercer 50% de resposta sobre a espécie reativa (ABTS⁺).

Os resultados mostram que os diferentes extratos de gengibre apresentam ação sobre o ABTS⁺ e que existe uma correlação positiva entre a porcentagem de inibição deste radical e massa seca dos extratos de gengibre (Figura 5), sendo o coeficiente de correlação de 0,9914, 0,9950, 0,9952 e 0,9968 para os respectivos solventes extratores água, etanol, acetona-ácido e acetona.

Figura 5. Efeito da concentração dos diferentes extratos de gengibre sobre a porcentagem de inibição do ABTS⁺.

Resultados como média e desvio padrão (n=6). Letras diferentes representam diferença significativa para o mesmo solvente, $p < 0,05$.

Em estudos realizados por Dudonné et al. (2009), em extração aquosa, obteve 3,1% para inibição máxima para o ABTS⁺, valor este inferior aos obtidos no presente estudo, a diferença entre os valores, pode ser relacionada ao tipo de extração, sendo que Dudonné et al. (2009) realizou a extração em água em temperatura de 50°C.

Os valores de EC_{50} foram obtidos a partir da equação da reta da porcentagem de inibição do $ABTS^{+}$ *versus* a massa seca dos extratos no ensaio (Tabela 1). Os valores de EC_{50} correspondem à quantidade de antioxidante presente na amostra capaz de reagir com 50% do $ABTS^{+}$. Desta forma, quanto menor o EC_{50} maior será a capacidade antioxidante da amostra. Os menores valores de EC_{50} foram encontrados nos extratos obtido em etanol, acetona-ácido e acetona, sem diferença significativa entre eles, demonstrando maior capacidade antioxidante destes em relação ao extrato com água. Os valores de EC_{50} encontrados no presente estudo foram inferiores ao obtido por Kantayos e Paisooksantivatana (2012) que estudaram extrato etanólico (95%) de gengibre e os valores de EC_{50} 7,0 mg/mL, demonstrando que as condições do estudo foram mais eficientes na extração de compostos que reagem com o radical $ABTS^{+}$.

Os valores da capacidade antioxidante dos extratos de gengibre sobre o $ABTS^{+}$ expressos em equivalentes de trolox estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que não houve diferença significativa na ação redutora sobre o $ABTS^{+}$ entre os extratos etanol, acetona/ácido e acetona, sendo significativamente superiores ao da água, ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores de EC_{50} e capacidade antioxidante relacionada ao trolox nos diferentes extratos de gengibre no ensaio do $ABTS^{+}$.

Extrato	EC_{50} mg/mL	Antioxidante mg ET/g
água	0,21 ± 0,08 ^a	6,98 ± 0,41 ^a
etanol	0,08 ± 0,01 ^b	11,61 ± 2,02 ^b
acetona/ácido	0,11 ± 0,03 ^b	9,86 ± 2,02 ^b
acetona	0,07 ± 0,01 ^b	10,93 ± 0,79 ^b

Valores de EC_{50} em mg de massa seca por mL de ensaio e atividade antioxidante em mg equivalente de trolox (ET)/g de gengibre. Resultados expressos como média e desvio padrão (n=6). Letras diferentes na mesma coluna representa diferença significativa para $p < 0,05$.

7.2.3 Ação sobre o radical DPPH•

A Figura 6 apresenta os valores da porcentagem de inibição do radical DPPH• obtidos pelos diferentes extratos de gengibre. Semelhante aos resultados do ABTS⁺, a porcentagem de inibição do DPPH• teve correlação positiva com a quantidade de massa seca presente no ensaio. Neste caso, os coeficiente de correlação foram de 0,9699, 0,99782, 0,9829 e 0,9690 para os respectivos solventes: água; etanol; acetona/ácido e acetona. Este método tem sido bastante empregado em estudos de determinação da capacidade antioxidante em extratos vegetais (CHATHA et al, 2006; CANADANOVIC-BRUNET, DJILAS e CETKOVIC, 2005; PINELO et al, 2004; GHASEMZADE, JAAFAR e RAHMAT, 2011) e, segundo Suhaj (2006), é considerado um bom ensaio para avaliar a atividade antioxidante.

De acordo com Von Gadow, Joubert e Hansmann (1997), o método de DPPH• baseia-se na redução do radical DPPH• pelo antioxidante, doador de hidrogênio, presente em extratos de planta, mais especificamente pelos compostos fenólicos que apresentam a capacidade de serem doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons ou ainda a de capturar os radicais livres.

Figura 6. Efeito da concentração dos diferentes extratos de gengibre sobre a porcentagem de inibição de DPPH•.

Valores em µg de massa seca por mL de meio reacional (µg/mL) e expressos como média e desvio padrão (n=6). Letras diferentes representam diferença para o mesmo solvente significativa ($p < 0,05$).

Ao analisar extrato aquoso de gengibre, Dudonné et al. (2009) obteve 0,25% de inibição máxima, valor este inferior a todos os encontrados neste estudo. Porém, Maizura, Aminah e Wan Aida (2011) em seus estudos com extratos de gengibre, sem a utilização de solventes, obtiveram 79% de inibição do radical DPPH• semelhante aos valores apresentados no presente estudo, com exceção da extração em água que inibiu apenas 47% do DPPH•. Entretanto, outros autores encontram

43% de inibição do DPPH• mediada por extrato metanólico de gengibre (Padmanabhan e Jangle, 2012).

Os valores de EC₅₀, obtidos pela equação da porcentagem de inibição do DPPH• e da massa seca no ensaio, encontram-se na Tabela 2. Os extratos que apresentaram os menores valores de EC₅₀ foram os acetona e etanol, sem diferença significativa entre eles. Porém, os outros dois extratos, água e acetona/ácido, apresentaram os maiores valores de EC₅₀ ($p < 0,05$).

Tabela 2. Valores de EC₅₀ e capacidade antioxidante relacionada ao trolox nos diferentes extratos de gengibre no ensaio do DPPH.

Extrato	EC₅₀ mg/mL	antioxidante mg ET/g
água	0,24 ± 0,01 ^a	5,07 ± 0,41 ^a
etanol	0,13 ± 0,01 ^b	8,16 ± 0,22 ^b
acetona/ácido	0,25 ± 0,01 ^a	7,34 ± 0,24 ^c
acetona	0,15 ± 0,01 ^b	8,35 ± 0,60 ^b

Valores de EC₅₀ em mg de massa seca por mL de ensaio e capacidade antioxidante em miligrama de equivalentes de trolox/g de gengibre. Resultados expressos como média e desvio padrão (n=6). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa para $p < 0.05$.

Stoilova et al. (2007) utilizando extrator de alta pressão de CO₂ encontrou EC₅₀ de 0,64 µg/mL para extratos de gengibre, valor maior que os apresentados na Tabela 2.

A ação antioxidante dos extratos de gengibre correspondente à ação do trolox sobre o DPPH• mostra que os extratos obtidos em etanol e em acetona apresentaram os maiores valores em relação aos outros extratos, não apresentando diferença significativa entre eles. O menor valor de ET/g de gengibre foi encontrado mediante a extração aquosa e valor intermediário para o solvente acetona/ácido, sendo os valores diferentes estaticamente entre si e entre os demais extratos.

7.2.4 Estudos de correlação entre os resultados obtidos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, ABTS⁺ e DPPH[·]

Os resultados obtidos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (fenólicos totais), ABTS⁺ e DPPH[·] já foram apresentados e discutidos nas secções anteriores, porém na Tabela 3 é possível visualizá-los novamente e por meio destes valores foi possível efetuar os estudos de correlação. Os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,919, 0,977 e 0,981 para os respectivos pares Folin-Ciocalteu/ABTS⁺, Folin-Ciocalteu/DPPH[·] e ABTS⁺/DPPH[·]. Estes valores mostram que os métodos de ABTS⁺ e DPPH[·] estão correlacionados, e de fato o princípio químico de ambas as reações baseia-se na capacidade redutora do extrato de gengibre sobre o radical presente no ensaio. Por outro lado, é possível atribuir aos compostos fenólicos, determinados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, ação antioxidante e/ou redutora sobre os radicais ABTS⁺ e DPPH[·].

Tabela 3. Valores de Compostos fenólicos e ação sobre ABTS e DPPH dos diferentes extratos de gengibre.

<i>Extrato</i>	<i>Compostos fenólicos</i>	<i>ABTS⁺</i>	<i>DPPH</i>
Água	3,38 ± 0,39 ^a	6,68 ± 0,41 ^a	5,07 ± 0,41 ^a
Etanol	7,26 ± 0,53 ^b	11,61 ± 2,02 ^b	8,16 ± 0,22 ^b
Acetona/ácido	7,12 ± 7,12 ^b	9,86 ± 2,02 ^b	7,37 ± 0,24 ^c
Acetona	8,52 ± 1,24 ^c	10,93 ± 0,79 ^b	8,35 ± 0,60 ^b

Compostos fenólicos em mg EAG/g de gengibre, ABTS⁺ e DPPH[·] em mg ET/g de gengibre. Resultados como média ± desvio padrão (n = 6). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,05).

Em estudos com extratos de kesum (*Polygonum minus*), gengibre (*Zingiber officinale*) e açafrão (*Curcuma longa*), utilizando extrator de suco, Maizura, Aminah e Aida (2011) obtiveram uma correlação de 0,7328 entre o método DPPH e compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu, enquanto que Dudonné, et al. (2009) utilizando extratos aquosos de 30 plantas, entre elas o gengibre, obtiveram valores de 0,939 para a correlação entre os métodos de Folin-Ciocalteu/DPPH[·], 0,966 para Folin-Ciocalteu/ABTS⁺ e 0,906 para ABTS⁺/DPPH[·].

As características antioxidantes do extrato de gengibre, nas condições deste estudo, não foram efetivamente afetadas pelo solvente extrator. Porém, a acetona proporcionou maior conteúdo de compostos fenólicos e apresentou, juntamente com o etanol, melhor ação antioxidante frente ao DPPH $\cdot$ e aos demais solventes extratores no ensaio do ABTS $^{+}$.

Até o momento, não existe um sistema de extração com solventes que seja satisfatório para obtenção de todos ou de classe específica de antioxidantes naturais, devido a diversos fatores, dentre eles, a natureza química dos antioxidantes dos alimentos, a existência de ampla variedade e diferentes quantidades de compostos bioativos nos vegetais e o peso molecular, pois os compostos fenólicos que apresentam grande peso molecular são altamente insolúveis em água (SHAIJI e NACZK, 1995).

Com base na análise de todos os experimentos realizados para se avaliar a atividade antioxidante, foi possível observar que, os solventes etanol, acetona-ácido e acetona extraem compostos de forma ou/e em quantidades semelhantes. Portanto, o extrato com acetona foi escolhido para dar continuidade aos estudos, devido à facilidade de sua remoção por rota-evaporação e liofilização.

7.3 Estudos da ação do extrato de gengibre sobre sistemas biológicos

Para realização dos experimentos da ação do gengibre sobre sistemas biológicos foi utilizado o extrato com acetona. O extrato foi rota-evaporado, liofilizado, ressuspenso em PBS (extrato concentrado e sem acetona) e armazenado a -20°C.

7.3.1 Ensaio de captura do óxido nítrico (NO $\bullet$)

A Tabela 4 apresenta os valores da concentração de nitrito e a porcentagem de inibição da formação deste ânion mediante concentrações crescentes de extrato de gengibre. A concentração de nitrito na ausência de extrato foi aproximadamente 26 μ M. A formação de nitrito ocorre espontaneamente no meio reacional a partir do NO e O $_2$, sendo, portanto um método indireto de determinação de NO gerado pela decomposição do nitroprusiato de sódio (MARCOCCI et al., 1994; YEN; LAI; CHOU, 2001). Os valores absolutos de nitrito formado na reação variam entre os trabalhos,

entretanto os autores Maia et al. (2009) encontraram valor semelhante ao aqui apresentado (aproximadamente 25 μM).

O extrato de gengibre nas concentrações utilizadas (2,5, 5,0 e 7,5 mg/mL) mostrou ser capaz de diminuir a formação de nitrito, diferenciando significativamente em relação ao controle, porém sem diferença significativa entre elas. Sendo que na concentração de 7,25 mg/mL a porcentagem de inibição foi de 50%. Estes resultados sugerem que o extrato de gengibre atua como antioxidante frente ao NO.

Tabela 4. Efeito inibitório do extrato de gengibre na produção de nitrito (NO_2^-).

Ensaio	Concentração de NO_2^- (μM)	% de inibição
Nitroprussiato (controle)	26,32 $\pm$ 4,57 ^a	-
Extrato 1,25 mg/mL	17,53 $\pm$ 3,16 ^{ab}	33,42 $\pm$ 2,41 ^a
Extrato 12,50 mg/mL	16,54 $\pm$ 4,02 ^b	37,71 $\pm$ 5,20 ^{ab}
Extrato 15,00 mg/mL	14,56 $\pm$ 3,88 ^b	45,37 $\pm$ 4,78 ^{bc}
Extrato 17,25 mg/mL	12,93 $\pm$ 1,95 ^b	50,69 $\pm$ 2,56 ^c
Ácido gálico 70 $\mu\text{g/mL}$	13,46 $\pm$ 2,04 ^b	48,72 $\pm$ 2,28 ^c

Extrato de gengibre em mg de massa seca do extrato concentrado por mL de ensaio. Porcentagem de inibição da formação de nitrito na presença de extrato em relação ao controle. Valores como média e desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

A metodologia descrita para quantificação indireta de NO recomenda 180 minutos de incubação, porém observou-se que a formação de nitrito é praticamente constante após 1 hora de incubação do sistema gerador de nitrito na ausência e presença de extrato de gengibre (Figura 7). Este resultado sugere que a quantidade de nitrito pode ser avaliada em menor tempo de incubação, pelo menos nas condições deste estudo.

Figura 7. Concentração de nitrito avaliada ao longo do tempo de incubação na ausência e presença de extrato de gengibre em diferentes concentrações. Valores expressos como média e desvio padrão (n=3).

Amir et al. 2011, utilizando extratos metanólicos de gengibre (entre 10 e 50 µg/mL), observaram aproximadamente entre 30 a 50% de inibição, resultados estes, melhores que os encontrados, contudo o método de extração foi diferenciando, podendo-se justificar a diferença nos resultados. Baliga et al. (2003) encontraram 11,8% de inibição da formação de nitrito por extrato aquoso de folhas de gengibre, na concentração de 125 mg/mL, em 150 minutos de experimento, valor este menor do encontrado neste estudo, contudo, os métodos de extração e a parte do gengibre utilizado são diferentes.

E em 2009, trabalhando com extratos de um tipo de alga vermelha - *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) - Maia et al., observaram um percentual de inibição de 46,6% em uma concentração de 7,5 mg/mL.

Apesar de existir poucos estudos que avaliam a inibição de NO por extratos de plantas ou similares verifica-se que a técnica é adequada, que a inibição não é dose-dependente e que esta não ultrapassa aos 50% da redução da concentração de nitrito presente no ensaio.

7.3.2 Ação antioxidante do extrato de gengibre sobre hemólise

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram a atividade anti-hemolítica do extrato de gengibre em diferentes concentrações. No ensaio APPH, este induziu hemólise das hemácias, ao longo do tempo de incubação, chegando em 71% após 5 horas de exposição das hemácias a esse indutor, comparado a 100% de lise induzida pela água.

Na menor concentração do extrato de gengibre (57 $\mu\text{g/mL}$) a hemólise pelo APPH iniciou após 4 horas de incubação e foi parcialmente evitada após 5 horas, 44% menor que o controle+APPH. Observou que o extrato de gengibre em concentrações acima de 113 $\mu\text{g/mL}$ protege em 100% a lise das hemácias pelo APPH similar a ação do ácido ascórbico (40 $\mu\text{g/mL}$). Ensaios contendo apenas extrato de gengibre em PBS mostraram que o mesmo não induz hemólise (resultados não apresentados).

Figura 8. Porcentagem de hemólise de diferentes concentrações de gengibre submetidos à APPH ao longo do tempo.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

O sistema de incubação de eritrócitos com AAPH a 37°C tem sido extensivamente utilizado, de modo a simular um processo de destruição da membrana celular associado às espécies reativas, pois provoca a hemólise dos eritrócitos de forma lenta e dependente da concentração deste gerador de radicais peroxil (TANG; LIU, 2008). De fato, foi possível observar hemólise a partir de 3 horas de incubação e após este tempo houve acréscimo na porcentagem de lise das hemácias de forma gradativa, na ausência do extrato de gengibre. Estes resultados mostram que o método foi adequado nas condições de estudo e o extrato de gengibre não interfere no perfil da hemólise induzida pelo APPH.

Estudos nas mesmas condições experimentais, mostram que chá verde, na concentração de 0,54 mg/mL, apresenta 81,6% de inibição da hemólise de hemácias expostas ao AAPH (SCHMITZ et al., 2008). Ferreira, et al. (2007), ao estudar extratos metanólicos de folhas de oliveira (*Olea europaea*) na concentração de 50 mg/mL, observou 100% de inibição da hemólise oxidativa.

Os resultados sugerem que o extrato de gengibre constitui em uma fonte de antioxidantes naturais com potencial de aplicação na prevenção e/ou terapêutica de doenças relacionadas às espécies reativas.

7.3.3 Ação do extrato de gengibre sobre *Staphylococcus aureus*

Nas condições do estudo, o extrato de gengibre não apresentou ação sobre o crescimento de *S. aureus* (Figura 9). Observa-se que o raio do halo de inibição da gentamicina foi, sempre, acima de 13 mm que representa a ação antimicrobiana. Ao contrário do orifício contendo gentamicina, em nenhum dos outros contendo extrato de gengibre houve a formação de halo de inibição. De acordo com os Padrões Interpretativos de Diâmetros do Halo de Inibição para *Staphylococcus* spp (CLSI, 2010), a gentamicina usada como controle formou um halo de diâmetro ≥ 15 mm, valor este de referência que corresponde à susceptibilidade deste micro-organismo com relação a este antibiótico. Outro autor também referência a gentamicina como controle positivo em determinações de atividades de antibióticos por efeitos inibitórios sobre o crescimento microbiano (LOURENÇO, 2006).

O extrato de gengibre, nas condições deste trabalho, não exerceu nenhum efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, corroborando com Pinto et al. (2001), que também não observaram nenhum efeito de extrato aquoso de própolis sobre o gênero *Staphylococcus*.

Diferentes espécies vegetais são estudadas por apresentarem, além de substâncias ativas como compostos fenólicos e polifenóis, características antimicrobianas (OSTROSKY et al., 2008). Estudos realizados por Indu et al. (2006) mostraram que extratos de , *in natura*, obtidos apenas por maceração apresentou propriedades antibacterianas moderadas em concentrações de 100% para *Escherichia coli* O8 (raio do halo = 5 mm) e para o mesmo micro-organismo sorotipo O88 (raio do halo = 9 mm), porém não mostrou nenhuma atividade contra outros grupos de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, e *Aeromonas hydrophila*. Estes mesmos autores relataram que o extrato de gengibre macerado e diluído a 75% (v/v) em água inibiu, parcialmente, apenas a *E. coli* O88 (raio do halo = 6,5mm). Provavelmente, o gengibre no presente estudo não apresentou atividade antimicrobiana pelas características dos compostos presentes no extrato, devidas a extração em acetona e ressuspensão final em PBS.

Figura 9. Crescimento em placa de *S. aureus* na presença de extratos de gengibre 7,52 (orifício b), 6,01 (orifício c), 4,51 (orifício d), 3,01 (orifício e) e 1,50 mg (orifício f). Gentamicina 10µg (orifício a) foi usada como controle. Foto ilustrativa de 3 experimentos.

Norajit, Laohakunjit e Kerdchoechuen (2007) ao estudar diferentes tipos de extrações de óleo essencial de gengibre observaram que os mesmos apresentaram efeito antibacteriano em *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*, não apresentando efeito em *E. coli*. Em contrapartida, resultados encontrados por Trajano et al. (2009), em que utilizaram óleo essencial de gengibre, observaram efeito antibacteriano somente em *S. aureus*, e não encontraram efeitos para *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens* e *Yersinia enterocolitica*, bactérias responsáveis por contaminações em alimentos.

Para melhor compreensão da ação de gengibre sobre micro-organismos são necessários maiores estudos para relacionar estrutura química dos compostos e ação antimicrobiana.

8. Conclusão

Conclui-se que o gengibre (*Zingiber officinale*) apresenta capacidade antioxidante e anti-hemolítica, mas não apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. De um modo geral, o gengibre extraído com acetona e etanol mantiveram suas propriedades antioxidantes de forma mais eficiente quando comparado aos extratos acetonico-ácido e aquoso.

Contudo, são necessárias mais pesquisas para efetivamente identificar, quantificar e testar a capacidade antioxidante de compostos extraídos de plantas em sistemas biológicos. Ainda é preciso mais estudos para se avaliar a contribuição individual de cada composto com relação à sua atividade antioxidante total, utilizando-se diferentes solventes.

Referências Bibliográficas

ADEGOKE GO. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **J Food Sci Technol**. v. 35, n.4, p. 283-398, 1998.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v.22, p.1041-1047, 2002.

ALI, Badreldin H. et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 46, p.409-420, 2008.

ALMEIDA, N.G. De; ELPO, E.R. SERPE; GIROTTO, A.. **Aspectos Econômicos Da Cultura Do Gengibre**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/gengibre_2007_08.pdf>. Acesso em: 24 jul. 2013.

ALTMAN, R. D.; MARCUSSEN, K. C. Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. **Arthritis Rheum**. V.44, p. 2531–2538, 2001.

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

AMIR, Mohd et al. Phytochemical Analysis and in vitro Antioxidant Activity of *Zingiber officinale*. **Free Radicals And Antioxidants**, v. 1, n. 4, p.75-81, 2011.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p.399-408, 2012.

ARORA, A., MURALEEDHARAN, G.N., STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

ARUOMA, O.I.. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n.2, p. 199-212, 1997.

BALIGA, Manjeshwar Shrinath et al. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro: A preliminary study. **Food / Nahrung**, v. 47, n. 4, p.261-264, 2003.

BARREIROS, ANDRÉ L. B. S.; DAVID, JORGE M.; DAVID, JUCENI P.. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggí. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 2, n. 12, p.123-130, 1999.

BOLETIM MENSAL DE COMÉRCIO AGRÍCOLA. Preços de cereais registram subida desde meados de 2003. Fonte: Boletim Mensal do Comércio Agrícola, n.67, p.4, 2004.

BORGES, M. F., ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 4. ed. São Paulo, Atheneu.1988.

CANADANOVIC-BRUNET JM, DJILAS SM, CETKOVIC GS. Freeradical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts. **J. Sci. Food Agric.**, v.85, p. 265–272, 2005.

CARMO, L.S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e toxina TSST – 1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CARMO, L. S. et al., Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O.. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p.441-449, 2007.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, 178-182, 2002.

CHANWITHEESUK, A., TEERAWUTGULRAG, A., RAKARIYATHAM, N. Screening of Antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

CHATHA SAS, ANWAR F, MANZOOR M, BAJWA JR. Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. **Grasas Aceites Sevilla**, v.57, p. 328-335, 2006.

CHRUBASIK, S., PITTLER, M.H., ROUFOGALIS, B.D. Zingiberis rhizome: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. **Phytomedicine**. v. 12, n. 9, p. 684-701, 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI Publication M100-S20; 2010.

DABAGUE, I.C.M et al. Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 13, n. 1, p.79-84, 2011.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C.. Micropropagação De Gengibre (*Zingiber officinale*). **R. Bras. Agrociência**, v. 10, n. 1, p.61-65, 2004.

DEDOV, V.N., et al., B. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, p. 793-798, 2002.

DECKER, E A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55, n.11, p. 396-407, 1997

DESLANDES, F.. **Produção de Gengibre quer de volta o mercado**. Disponível em: <<http://www.parana-online.com.br/editoria/economia/news/458685/?noticia=PRODUTOR+DE+GENGIBRE+QUER+DE+VOLTA+O+MERCADO>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

DORMAN, D. H. J. et al. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 01, p.12-16, 2000.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Agric. Food Chem**, p.1768-1774, 2009.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. Nitric oxide radical scavenging potential of some Elburz medicinal plants. **African Journal Of Biotechnology**, p. 5212-5217, 2010.

EISERICH, J. P.; et al. Formation of nitrang and chlorination species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, n.32, p. 19199-19208, 1996.

EL-GHORAB, AHMED HASSAN ET AL. A Comparative Study on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) and Cumin (*Cuminum cyminum*). **J. Agric. Food Chem.**, p. 8231-8237. 2010.

ELPO, E.R.S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. 2004. 179p. Dissertação (Mestrado-Área de concentração em Produção Vegetal) - Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.. *Zingiber officinale* ROSCOE: ASPECTOS BOTÂNICOS E ECOLÓGICOS. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p.27-32, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, I. C.F.R. et al. Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea*. L. leaves sprayed with different copper formulations. **Food Chemistry**, v. 103, p.188 - 195, 2007.

FINLEY, W. J. Antioxidants in food: state of the science important to the food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6837-6846, 2011.

FIORENTINI, A. M. et al. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

FOSTER, S. **GINGER ZINGIBER OFFICINALE: YOUR FOOD IS YOUR MEDICINE**. Disponível em: <<http://www.stevenfoster.com/education/monograph/ginger.html>>. Acesso em: 15 out. 2013.

GHASEMZADEH, A.; JAAFA, H. Z. E.; RAHMAT, A. Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 1, n. 15, p.4324-4333, 2010.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. **Journal Of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 7, p.1147-1154, 2011.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1370-1373, 2005.

GIASSON, B.I. et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology and Medicine**. v.32, p.1264-1275, 2002.

GIESENDANNER, N. et al. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. **Schweiss Arch Tierheilkd.**, v.7, p.329, 2009.

GONZAGA, D. S. de O. M.; RODRIGUES, V. G. Gengibre – *Zingiber officinale* Roscoe. Curitiba: EMBRAPA, dezembro 2001. Folder 12 – série “Plantas Medicinais”.

GRANT, K. L.; LUTZ, R. B. Alternative therapies: ginger. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v.57, p.945–947, 2000.

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 119, n. 6, p. 598, 1992.

HALLIWELL, Barry; CLEMENT, Marie Veronique; LONG, Lee Hua. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, n. 486, p.10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition; Oxford University Press; p. 268 – 340, 2007.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal Laboratre Clinical Medical**, v. 107, p. 401-404, 1986.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L.. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.** p. 1841-1856, 2005.

INDU, M.n. et al. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 1, n. 37, p.153-158, 2006.

JIMÉNEZ- ESCRIG, A. et al. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1686-1690, 2000.

JOLAD, S.D. et al., Timmermann, B.N., 2004. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p.1937–1954, 2004.

JOLAD, S.D. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composes and effects on LPSstimulated PGE₂ production. **Phytochemistry**, v.66, p.1614-35, 2005.

KANTAYOS, V.; PAISOOKSANTIVATANA, Y. Antioxidant Activity and Selected Chemical Components of 10 *Zingiber spp.* in Thailand. **Journal Of Developments In Sustainable Agriculture**, n. 7, p.89-96, 2012.

KIKUZARI, H.; NIKATANI, N. Antioxidants Effects of Some Ginger Constituents. **Journal of Food and Science**, v.58, n. 6, p. 1407-1410, 1993.

LAPENNA,D; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Geneneral Pharmacology**, v.27, p.1145-1147, 1996.

LEE SJ, UMANO K, SHIBAMOTO T, LEE KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**; v.91, n.1, p.131-7, 2005.

LIANG, M. H. From America: Cookbook medicine or food for thought: Practice guidelines development in USA. *Ann. Rheum. Dis.* v.51, p.1257–1258, 1992.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.;FARIAS, N. M.P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p 197-201, 2006.

LOURENÇO, F.R. **Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em agar - proposta de delineamento experimental**. 2006. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 30, p.489-493, 2010.

MACHADO, G.C. et al. Composição química de amostras de gengibre (*Zingiber officinale*) de cultivo convencional e orgânico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26., 2003, Maringá.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and Macrophage function. **Annual Review of Immunological**, v.15, p.323-350,1997.

MAIA, Robinson M. et al. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 4, n. 20, p.489-493, 2010.

MAIZURA, M; A AMINAH,; AIDA, W M Wan. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extrac. **International Food Research Journal**, v. 18, p.529-534, 2011.

MARCOCCI, Lucia et al. The Nitric Oxide-Scavenging Properties oh Ginko Biloba Extract EGb 761. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, N., v. 201, n. 2, p.748-755, 1994.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.r.; BEEK, T. Van. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, p.231-237, 2004.

MORAES, O. R. J. et. al. Avaliação Do Potencial Antioxidante De Extratos Ativos De Plantas Obtidos Por Extração Com Fluido Supercrítico. **Quim. Nova**, p. 1699-1705, 2008.

MORAIS, Selene M. de. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p.315-320, 2009.

MOREIRA, R.R.D.; CARLOS, I.Z.; VILEGAS, W. Release of Intermediate Reactive Hydrogen Peroxide by Macrophage Cells Activated by Natural Products. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.201-204, 2001.

NEGRELLE, R.R.B.; ELPO, E.R.S.; RÜCHER, N.G.A. Análise prospectiva do agro negócio gengibre no estado do Paraná. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.1022-8, 2005.

NIKKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NORAJIT, K.; LAOHAKUNJIT, N.; KERDCHOECHUEN, O. Antibacterial Effect of Five *Zingiberaceae* Essential Oils. **Molecules**, v. 1, n. 12, p.2047-2060, 2012.

OBOH, G.; AKINYEMI, A. J.; ADEMILUYI, A.O. Antioxidant and inhibitory effect of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) and white ginger (*Zingiber officinale roscœ*) on Fe²⁺ induced lipid peroxidation in rat brain in vitro. **Experimental And Toxicologic Pathology**, v. 1, n. 64, p.31-36, 2012.

OLIVEIRA, A.C.O.; VALENTIM, I.O.; GOULART, M.O.F; SILVAI, C.A; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S., Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, Campinas, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009.

OSTROSKY, E.A.; MIZIMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18. n.2. p.301-307, 2008.

OSTYN, A. et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France. **Euro Surveil**, v.13, p.19528, 2009.

PADMANABHAN, P.; JANGLE, S. N.. Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity and Reducing Power of Four Selected Medicinal Plants and Their Combinations. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Drug Research**, v. 2, n. 4, p.143-146, 2012.

PALHARIN, L. H. C. Estudo sobre gengibre na medicina popular. **Revista Científica Eletônica De Agronomia**, Garça, VII, n. 14, 2008.

PEREIRA, R. C. B. et al. Obtenção de óleo essencial e oleoresina de gengibre (*zingiber officinale roscoe*) por arraste com vapor e extração com solvente. **Rev. Univ. Rural**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p.10-20, 2007.

PINELO M, RUBILAR M, SINEIRO J, NUNEZ M J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v.85, p. 267–273, 2004.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

PRASAD, J.; VIJAY, V.K. Experimental studies on drying of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* L. and *Tinospora cordifolia* in solar biomass hybrid drier. **Renewable energy**, v.30, p.2097-109, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 04, p. 755-760, 2006.

RANILLA, Lena Galvez et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potencial against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v. 1, n. 101, p.4676-4689, 2010.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, Oxford, v.4, p.304-309, 1997.

RISTORI, C. A.; PEREIRA, M. A. dos S.; GELLI, D. S. The effect in vitro of ground black pepper on contamination with salmonella rubislaw. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.2, p. 131-133, 2002.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n. , p.53-60, 2007.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-170, 1991.

ROY, P., KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 02, p. 167-174, 2000.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, ISSN 1679-6535, Fortaleza - CE, julho de 2007.

SALIE, F., EAGLES, P.F.K., LENG, H.M.J., 1996. Primary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **J. Ethanopharmacol.** 52, 27–33.

SALVADOR, M.; HENRIQUE, J.A.P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: ULBRA, 2004. 204p.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais, Canoas**, v. 5, n. 2, p.25-42, 2011.

SERIDAN, B. et al. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 2, p.465-470, 2012.

SHAHIDI F, NACZK M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic publishing company; 1995

SCHMITZ, W. O. et al. Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2- azobis amidinopropano (aaph): efeito antioxidante e anti- hemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 3, p.175-179, 2008.

SHOBANA, S.; NAIDU, K. A. Antioxidant activity of selected Indian spices. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids**, v. 62, n. 2, p.107-110, 2000.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.683-90, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVESTRINI, A. et al. A cultura do gengibre. **Curitiba, PR: EMATER**, 1996.

SINGH, GURDIP et al. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food And Chemical Toxicology**, n. 46, p.3295-3302, 2008.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, v.327, n.7, p.649-662, 2004.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, Supplement 2, p.S14-S18, 1997.

STOILLOVA, I et al. Antioxidant Activity of a ginger extract. **Food Chemistry**, v. 102, p.764-770, 2007.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.531-537, 2006.

TANG, Y. Z.; LIU, Z. Q. Chemical Kinetic Behavior of Chlorogenic Acid in Protecting Erythrocyte and DNA against Radical-Induced Oxidation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.56, n.22, p. 11025-11029, 2008.

TOMAZELA, J. M.. **Mercado interno descobre o gengibre**: Em vez de exportar maior parte da produção, como em outros anos, agricultores vendem 70% da safra no Brasil. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/suplementos,mercado-interno-descobre-o-gengibre,567328,0.htm>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p.542-545, 2009.

UTAMA, J. M. S. et al. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetal decay microorganisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, 2002.

VAN BEEK, T. A.; POSTHUMUS, M.A.; LELYVELD, H.V.P.; YEN, B.T. Investigation of the essential oil of Vietnamese ginger. **Phytochemistry**, v. 26, n.11, p. 3005 – 3010, 1987.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química. Nova**, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 93-105, 1995.

VON GADOW A, JOUBERT E, HANSMANN CF. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. **Food Chemistry**, v.60, p. 73–77, 1997.

WARGOVICH, M. J. et al. Herbals, cancer prevention and health. *The Journal of nutrition*, v. 131, n. 11, p. 3034S-3036S, 2001.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**, v.320, p.365-376, 1989.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WU, J.L. et al. Bioactive tetrahydrofuran lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal Nature Products**, v.68, n.11, p.1656-1660, 2005.

XING, Y.; WHITE, P. J. Antioxidants from cereals and legumes in natural antioxidants chemistry, health effects, and applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.). *Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications*. Champaign: AOCS Press, p. 25-63, 1996.

YEN, Gow-chin; LAI, Hsi-huai; CHOU, Hsin-yi. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**, n. 74, p.471-478, 2001.

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.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.