



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO

TAÍS DOS SANTOS OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO [6]-
shogaol DOS RIZOMAS DE *Zingiber officinale* Roscoe**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto, Sergipe
Fevereiro, 2019

TAÍS DOS SANTOS OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO [6]-shogaol DOS RIZOMAS
DE *Zingiber officinale* Roscoe**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do diploma de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

Lagarto, Sergipe
Fevereiro, 2019

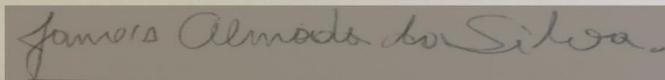
TAÍS DOS SANTOS OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO [6]-shogaol DOS
RIZOMAS DE *Zingiber officinale* Roscoe**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Sergipe, Campus Professor Antônio Garcia
Filho, como exigência para a obtenção do
Diploma de Graduação em Farmácia.

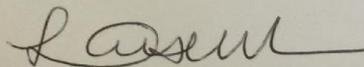
Orientador (a): Prof. Dr. James Almada da
Silva

Aprovado em: 26/02/2019



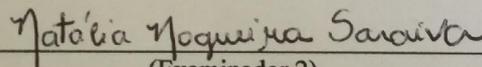
(Orientador)

Prof. Dr. James Almada da Silva



(Examinador 1)

Prof. Dr^a. Luciana Pereira Lobato



(Examinador 2)

Prof. Dra. Natália Nogueira Saraiva

“[...] um dia você vai compreender o propósito do que foi para ser, o que deixou de ser e do porquê algumas coisas nem chegaram a acontecer. E acredite, você será grato por isso.”
(Daniel Duarte)

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO [6]-SHOGAOL DOS RIZOMAS DE *Zingiber officinale* ROSCOE

Taís dos Santos Oliveira, Lagarto, 2019.

O *Zingiber officinale* Roscoe (*Zingiberaceae*) é uma espécie bastante utilizada pela medicina tradicional devido as suas propriedades terapêuticas, relacionadas principalmente aos metabólitos secundários [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol e [6]-shogaol. O [6]-shogaol, um produto de degradação do [6]-gingerol, é encontrado principalmente quando o gengibre é submetido a altas temperaturas. Segundo alguns autores, esta substância apresenta atividades biológicas superiores ao [6]-gingerol, e por isso apresenta maior potencial como protótipo para a busca de novos fármacos. Desta forma, o objetivo do trabalho é otimizar a extração de [6]-shogaol a partir dos rizomas de *Z. officinale* utilizando etanol como solvente extrator. As extrações foram realizadas na presença de catalisador (ácido *p*-toluenossulfônico), utilizando as técnicas: Soxhlet (90°C, 2 h), micro-ondas (60 s), ultrassom (50°C, 60 min), maceração (2 h), e as associações micro-ondas/Soxhlet e ultrassom/Soxhlet. Para avaliar a eficiência de extração de cada processo, a quantidade de [6]-shogaol (mg/g de gengibre seco) foi determinada por CLAE. O processo de extração mais eficiente na obtenção do [6]-shogaol foi o soxhlet, utilizado para a otimização, utilizando o planejamento fatorial 3², com temperatura, tempo de extração e massa de catalisador, como variáveis do estudo. Os resultados indicaram que a massa do catalisador (100 mg) e tempo de extração (24 horas) afetaram de forma positiva o rendimento do [6]-shogaol, favorecendo a formação do [6]-shogaol a partir do [6]-gingerol (1,86 mg/g).

Palavras-Chave: gengibre; técnicas de extração; planejamento fatorial.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS OF THE [6] -SHOGAOL OF THE RHIZOMES OF ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE

Taís dos Santos Oliveira, Lagarto, 2019.

Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae) is a species widely used by traditional medicine because of its therapeutic properties, mainly related to secondary metabolites [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. [6] -shogaol, a degradation product of [6] -gingerol, is mainly found when ginger is subjected to high temperatures. According to some authors, this substance has biological activities superior to [6]-gingerol, and therefore presents greater potential as a prototype for the search of new drugs. Thus, the objective of the work is to optimize the extraction of [6]-shogaol from the rhizomes of *Z. officinale* using ethanol as solvent extractor. The extractions were carried out in the presence of a catalyst (p-toluenesulfonic acid), using techniques: Soxhlet (90°C, 2 h), microwave (60 s), ultrasound (50 °C, 60 min), maceration 2 h), and the associations microwave / Soxhlet and ultrasound / Soxhlet. To evaluate the extraction efficiency of each process, the amount of [6] -shogaol (mg/g dry ginger) was determined by HPLC. The most efficient extraction process for obtaining [6]-shogaol was the soxhlet, used for the optimization, using factorial design 3², with temperature, extraction time, type of solvent and mass of catalyst, as study variables. The results indicated that the catalyst mass (100 mg) and extraction time (24 hours) positively affected the yield of [6]-shogaol, favoring the formation of [6]-shogaol from [6]-gingerol (1.86 mg/g).

Keywords: shogaol; ginger; extraction techniques; factorial planning

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem da espécie <i>Z. officinale</i>	11
Figura 2- Formas de consumo de gengibre no Brasil.....	12
Figura 3- Estrutura molecular dos principais gingeróis e shogaóis presentes no gengibre. Temos respectivamente, quando n=4, 6, 8 e 10: o 6-, 8-, 10- e 12-gingerol (A) e o 6-, 8-, 10- e 12-shogaol (B).....	13
Figura 4- Reações possíveis que a molécula de [6]-gingerol pode sofrer. A reação de desidratação gerará [6]-shogaol, enquanto a retro-aldólica formará a zingerona e o hexanal.....	14
Figura 5- Rendimento de [6]-shogaol em extratos obtidos por micro-ondas (MO), maceração (M), ultrassom (US), soxhlet, soxhlet associado a ultrassom e soxhlet associado a micro-ondas. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.....	27
Figura 6- Rendimentos de [6]-gingerol em diferentes tempos de extração e massa de pTSA ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....	30
Figuras 7- Rendimentos de [6]-shogaol em diferentes tempos de extração e massa de pTSA. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).....	30
Figura 8- Rendimentos de [6]-shogaol e [6]-gingerol usando massas diferentes do ácido p-toluenossulfônico, após 24 horas de extração. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As letras maiúsculas e minúsculas devem ser analisadas separadamente.....	31
Figura 9- Superfície de contorno representando o efeito da interação da massa de catalisador (pTSA) com o tempo de extração sobre a quantidade de [6]-shogaol extraído (mg/g).....	32
Figura 10- Diagrama de Pareto representando a análise de variância para os componentes lineares e quadráticos dos fatores estudados. Resultados são significantes para $p < 0,05$	32
Figura 11- Placa de Cromatografia em Camada Delgada desenvolvida com as frações obtidas após a realização da partição líquido-líquido. FHA (Fração Hidroalcoólica); FH (Fração Hexânica) e P (Padrão: [6]-shogaol). Um retângulo pontilhado destaca as bandas referentes ao [6]-shogaol.....	33

Figura 12- Placa de Cromatografia em Camada Delgada desenvolvida após a realização da cromatografia clássica apresentando as frações onde o [6]-shogaol estava presente. P: [6]-shogaol. Retângulos pontilhados destacas as bandas referentes ao [6]-shogaol.....34

Figura 13- Cromatograma da fração ZOSCH-C, com a banda referente ao [6]-shogaol indicada por uma seta ($t_r = 9,4$ min). Condições cromatográficas: coluna C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ); fase móvel: água (A)/acetonitrila (B): 0,0-2,0 min, 10-55% B; 2,0-9,0 min 55% B; 9,0-13,0 min, 65% B; 13,0-20,0, 100% B. O volume de injeção, 20 μ L; vazão 1 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 280 nm.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica de <i>Zingiber officinale</i>	12
Tabela 2- Planejamento fatorial para realização da otimização do processo de extração.....	22
Tabela 3- Massas e rendimento (com base na massa de gengibre seco) dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração. Macd (Maceração dinâmica), Soxhlet, MO-S (Micro-ondas associado ao soxhlet), US-S (Ultrassom associado ao soxhlet), MO (Micro-ondas) e US (Ultrassom). ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam que há diferença estatística.	25
Tabela 4- Rendimento de extração dos experimentos realizados segundo o planejamento fatorial.	29

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
Macd	Maceração Dinâmica
MO	Micro-ondas
MO-S	Micro-ondas associado ao Soxhlet
pTSA	Para-toluenossulfônico
Rf	Fator de retenção
US	Ultrasson
US-S	Ultrasson associado ao Soxhlet

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	11
2.2 Perfil químico.....	13
2.3 Reações de desidratação e retro-aldol.....	14
2.4 Potencial farmacológico	15
2.4.1 Ação anti-inflamatória.....	15
2.4.2 Ação hipoglicemiante e antioxidante	15
2.5 Técnicas de extrações.....	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Preparação do material vegetal.....	20
4.2 Extração do [6]-shogaol.....	20
4.2.1 Maceração dinâmica (Macd)	20
4.2.2 Soxhlet (S).....	20
4.2.3 Ultrassom (US).....	21
4.2.4 Micro-ondas (MO)	21
4.2.5 Ultrassom associado ao Soxhlet (US-S)	21
4.2.6 Micro-ondas associado ao Soxhlet (MO-S).....	21
4.2.7 Otimização da extração do [6]-shogaol	22
4.3 Análise do extrato de <i>Z. officinale</i>	23
4.4 Obtenção da fração enriquecida com o [6]-shogaol	23
4.5 Isolamento do [6]-shogaol por Cromatografia Líquida Clássica	24

4.6 Análise estatística	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Rendimentos de extração utilizando diferentes técnicas.....	25
5.1.1 Rendimentos de obtenção do extrato bruto.....	25
5.1.2 Rendimento de obtenção do [6]-shogaol.....	27
5.2 Otimização do processo de extração do [6]-shogaol utilizando planejamento fatorial 3^2	28
5.3 Isolamento do [6]-shogaol	33
6 CONCLUSÃO.....	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática comum em quase todas as culturas. Uma das plantas bastante utilizadas em todo o mundo há milhares de anos, e que possui grande valor terapêutico sobre diversas enfermidades (ZICK et al., 2008) é o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Além disso, também é utilizado em indústrias de alimentos, como ingredientes de formulações que proporcionam aroma e pungência aos produtos (MORAES, 2012).

O gengibre é uma fonte rica de compostos fenólicos bioativos, dentre eles os pungentes não voláteis como os gingeróis, paradois, shogaios e zingeronas (SRINIVASAN, 2017). Extratos obtidos dos rizomas de *Z. officinale* e seus metabólitos secundários isolados apresentam diversas atividades biológicas comprovadas por diversos autores (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010; SILVA et al., 2012; VILLALVILLA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). Suas funções nutracêuticas e farmacêuticas são resultantes desses compostos fenólicos, principalmente o [6]-gingerol, o [8]-gingerol, o 10-gingerol e o [6]-shogaol (LIU et al., 2012).

Uma das principais propriedades dessa especiaria aromática é a sua ação como antioxidante, na qual atribui-se a sua variedade e quantidade de compostos fenólicos em sua constituição. Estes compostos, por sua vez, atuam neutralizando radicais livres e, assim, ajudando na prevenção do surgimento de algumas doenças graves, como doenças inflamatórias e tumores (CONCEIÇÃO, 2013).

O [6]-shogaol é o produto da desidratação do [6]-gingerol, formado durante processos térmicos no processamento e armazenamento do gengibre (KOU et al., 2017). Apesar de possuírem estruturas químicas semelhantes, diversos estudos mostram que o [6]-shogaol é mais eficaz que o seu precursor, principalmente nas atividades antioxidante (CHENG, 2011; LIU et al., 2013), anti-inflamatória (CHENG, 2011; LIU et al., 2013; KOU et al., 2018), cardioprotetora (REHMAN et al., 2011; KOU et al., 2018), anticancerígenas (CHENG, 2011; LIU et al., 2013), antiemética (LIU et al., 2013) e antimicrobianas (PRATO, 2010; SOUZA et al., 2013).

Foi comprovado que o [6]-shogaol pode induzir apoptose em muitas células cancerígenas (LIU et al., 2013), devido a sua eficiência em modular a síntese de

moléculas sinalizadoras envolvidas na parada do ciclo celular, morte celular programada, na formação e progressão tumoral (KOU et al., 2018). Este composto bioativo atua em diversos tipos de células cancerígenas, como em câncer de ovário, câncer de mama, carcinoma colo-retal e em câncer de pulmão (LIU et al., 2013).

Estudos demonstram que o potencial anti-inflamatório do gengibre se dá através da interferência na cascata inflamatória, interferindo na biossíntese de prostaglandinas devido a inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) (MISHRA & KUMAR & KUMAR, 2012; SRINIVASAN, 2017). Seu efeito anti-inflamatório também acontece devido a capacidade dos compostos de suprimirem a produção do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), diminuindo a atividade do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e de outras citocinas envolvidas na inflamação (ARABLOU et al., 2014).

Numerosas técnicas de extração têm sido utilizadas para a extração de gingeróis e shogaios dos rizomas de *Z. officinale*. Para a extração dos gingeróis, as técnicas de extração a frio são preferíveis, uma vez que elevadas temperaturas favorecem a transformação destes metabólitos secundários nos respectivos shogaios (ALI et al., 2008; PARK et al., 2008). Em consequência disto as técnicas de extração a quente são utilizadas para a obtenção e extração mais eficiente dos shogaios. As técnicas de extração convencionais, maceração e percolação, são as mais utilizadas para a extração dos gingeróis, enquanto que para a obtenção dos shogaios, técnicas de extração a quente, como a de Soxhlet, são as mais utilizadas. Além do mais, esta técnica também apresenta vantagens sobre outras, pois leva ao esgotamento quase total dos constituintes químicos da planta.

A escolha do método de extração e do solvente que vai ser utilizado depende principalmente do que se deseja extrair (extração seletiva ou total), da estabilidade dos constituintes químicos da planta, e da quantidade de material vegetal disponível. Pode-se dizer que a extração ideal é aquela em que pode ser realizada de forma rápida, simples, reprodutível, e utilizando solventes de baixa toxicidade facilmente recuperável e de baixo custo, no entanto é muito difícil preencher todos esses requisitos (SARKER et al., 2005).

Algumas técnicas de extração não convencionais são promissoras para a obtenção dos constituintes de interesse de diversas espécies vegetais, inclusive do *Z. officinale*. Elas podem ser utilizadas individualmente ou em associação com

técnicas convencionais para aumentar a eficiência de extração dos metabólitos de interesse. São elas: Ultrassom e micro-ondas. As grandes vantagens destas duas técnicas são a simplicidade, a rapidez, e a economia de energia e solvente; diminuindo de maneira considerável os custos e o impacto ambiental do processo extrativo. Além disso, resulta no esgotamento quase total dos constituintes.

Uma vez que a importância terapêutica destas substâncias está sendo comprovada e reafirmada a cada dia, é de interesse acadêmico e industrial que a sua extração, isolamento e purificação seja otimizada. Dessa maneira, para este projeto, as técnicas mencionadas acima serão utilizadas sozinhas e/ou em associação com Soxhlet para otimizar a extração do [6]-shogaol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é nativo das florestas tropicais, do Sudoeste da Ásia e hoje é cultivado nas Antilhas, Havaí, África, Austrália e no Brasil. É uma planta de fácil cultivo em países de clima tropical e sub-tropical. No Brasil encontra-se principalmente na região litoral do Espírito Santo a Santa Catarina, devido às condições climáticas (DEBIASI et al., 2004; NEGRELLE et al., 2005).

É uma planta herbácea perene que pertence à família Zingiberacea (Tabela 1), medem até 120 centímetros de altura e seu rizoma é tuberoso e grosso. Possui folhas lanceoladas, flores verdes com manchas avermelhadas e pedúnculos de 30 centímetros (FIGURA 1). Alguns talos não apresentam flores e frutificam raramente. Desenvolve-se bem em terrenos arenosos, leves, bem drenados e férteis, contudo não deve ser cultivado seguidamente no mesmo lugar, pois sofre queda acentuada de produção (EMBRAPA, 2001).



Figura 1- Imagem da espécie *Z. officinale*. Fonte: <http://hmjardins.com.br/como-fazer-espinal-ervas/>

Tabela 1 - Classificação taxonômica de *Zingiber officinale*.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Zingiberales
Família	Zingiberaceae
Gênero	<i>Zingiber</i>

Sua coloração externamente varia do amarelo ouro a marrom brilhante, com estrias longitudinais. Internamente, apresenta cor marrom-amarelada com diversos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleorresina e óleo essencial (LIMA et al., 2014).

O rizoma é geralmente articulado formado por tubérculos ovóides, rugosos e prensados uns contra os outros. É amplamente comercializado devido seu emprego alimentar e industrial, principalmente para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria, além do seu uso como planta medicinal (CHAVES, et al., 2012). As formas consumidas no Brasil são: o gengibre seco, fresco, ou em conserva (Figura 2). É utilizado também nas diferentes formas farmacêuticas: cristalizada, pastilha, xarope ou em cápsula (SILVA, 2011).



Figura 2- Formas de consumo de gengibre no Brasil. Fonte: <https://belezaesaude.com/gengibre/>. https://pt.pngtree.com/freepng/ginger-powder_696280.html. https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-1005230194-gengibre-em-conserva-kenko-195g-laminado-_JM.

2.2 Perfil químico

Sabe-se que mais de 100 substâncias do gengibre já foram identificadas (JOLAD et al, 2004; JOLAD et al, 2005) e que dezenas delas tem sido isoladas (MA et al., 2004; ALI et al., 2008; PARK et al., 2008; SILVA, 2011; WANG et al., 2011; LI et al., 2013). Em sua constituição, existem dois principais grupos: os compostos voláteis, encontrados no óleo essencial e os não-voláteis, em sua maioria como compostos fenólicos, encontrados na sua oleoresina. O primeiro é responsável principalmente pelo aroma marcante do gengibre, destacando-se os sesquiterpenos e monoterpenos que estão presentes em maior quantidade. O segundo grupo, é constituído pelos compostos ativos pungentes que são relatados como os responsáveis pela maior parte das atividades terapêuticas do gengibre, entre eles: os gingeróis (Figura 3A) e os shogaios (Figura 3B) (FUNK et al., 2009; PRATO, 2010; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010; CONCEIÇÃO, 2013).

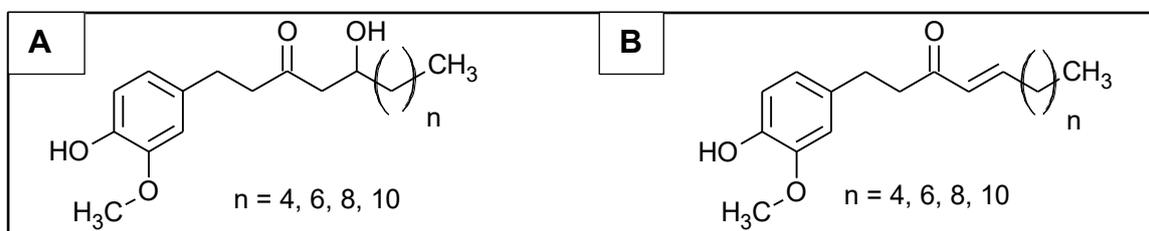


Figura 3- Estrutura molecular dos principais gingeróis e shogaios presentes no gengibre. Temos respectivamente, quando $n=4, 6, 8$ e 10 : o 6-, 8-, 10- e 12-gingerol (A) e o 6-, 8-, 10- e 12-shogaol (B).

Os constituintes do gengibre variam de acordo com o local de origem e se os rizomas estão frescos ou secos (MISHRA & KUMAR & KUMAR, 2012). Os gingeróis (GN's), principalmente o [6]-gingerol, estão presentes em maior quantidade nos rizomas frescos (ZICK, 2008; BAK et al. 2012; WANG, et al. 2015). Já os shogaios (SG's), dentre eles o [6]-shogaol, são encontrados em maior quantidade no gengibre seco devido ao processamento térmico ao qual os rizomas do gengibre são submetidos (ZICK, 2008; CONCEIÇÃO, 2013).

Os rizomas frescos de *Z.officinale* apresentam cerca de 80 a 90% água e cerca de 5,4 a 16,2% de amido e de fibras. O óleo essencial é uma mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquida, representando cerca de 1 a 3 % (LIMA et al., 2014). Além disso, os rizomas de *Zingiber officinale* são ricos em açúcares, proteínas, vitaminas do complexo B e vitamina C, que colaboram na prevenção de doenças e no bom funcionamento do organismo humano (SILVA et al., 2017).

2.3 Reações de desidratação e retro-aldol

Vários estudos revelaram que o [6]-shogaol é biologicamente mais ativo que o [6]-gingerol (BAK et al. 2012). Os GN's são convertidos principalmente em SG's, no qual o [6]-shogaol é o produto mais comum dessa conversão, consequência de uma reação de desidratação do [6]-gingerol (Figura 4) (PRATO, 2010; Ok & JEONG, 2012).

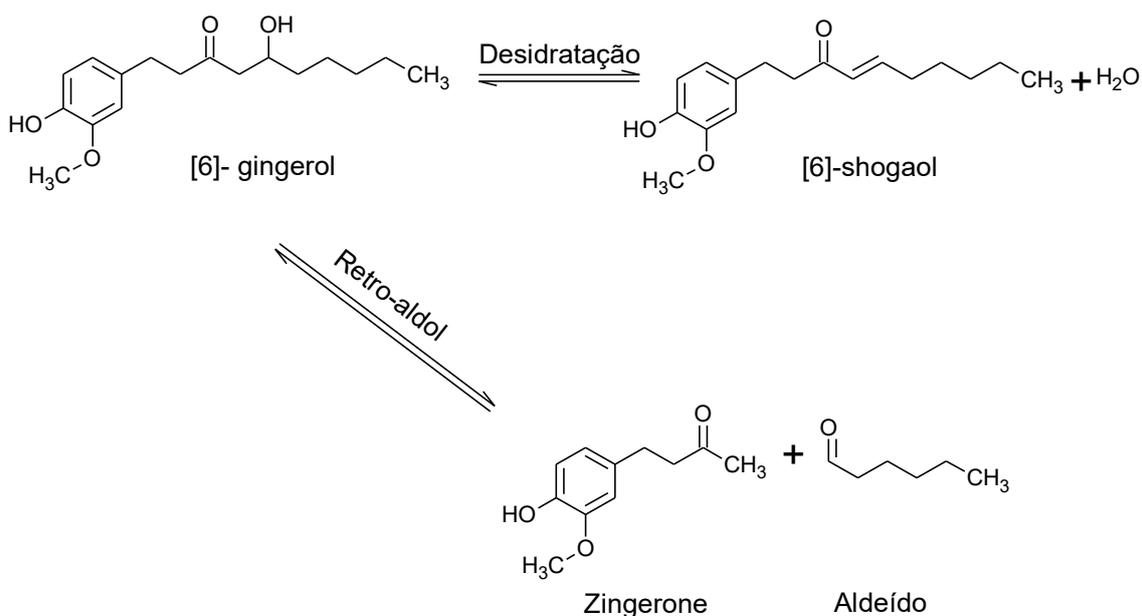


Figura 4- Reações possíveis que a molécula de [6]-gingerol pode sofrer. A reação de desidratação gerará [6]-shogaol, enquanto a retro-aldólica formará a zingerona e o hexanal.

A partir da obtenção do [6]-gingerol, o [6]-shogaol pode ser preparado por desidratação em ambientes ácidos e/ou térmicos. Geralmente, a reação de desidratação é realizada com ácidos como: ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido p-toluenossulfônico em solventes orgânicos (KOU et al., 2018).

Além da reação de desidratação, ocorre também uma reação retro-aldol onde o [6]-gingerol é degradado em zingerona e hexanal (Figura 4) (CHEN & ROSEN & HO, 1986).

2.4 Potencial farmacológico

2.4.1 Ação anti-inflamatória

As principais células inflamatórias são os macrófagos e a sua inibição é umas das principais vias para a modulação da inflamação. Os lipopolissacarídeos são moléculas derivadas da membrana de bactérias altamente tóxicas e são liberadas quando se multiplicam ou são degradadas por células de defesas (VIEIRA et al., 2014) .

Enzimas que participam da via do ácido araquidônico, como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) produzem mediadores inflamatórios como a prostaglandina E₂ (PGE₂) (ROBBINS & COTRAN, 2010). A partir disso, um estudo verificou que o [6]-shogaol inibiu a produção de prostaglandina E₂ e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) a partir da regulação negativa de COX-2, além do fator de transcrição NF-KB. Além disso, foi possível observar que somente a fração rica em [6]-shogaol conseguiu suprimir citocinas pró-inflamatórias (VIEIRA et al., 2014).

2.4.2 Ação hipoglicemiante e antioxidante

O diabetes mellitus é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por um quadro de hiperglicemia crônica que é resultante da ação e/ou secreção prejudicada de insulina, devido a essas alterações ocorrem anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, associados

ao estado de inflamação crônica subclínica e à formação de radicais livres (LIMA et al., 2014; KHANDOUZI et al., 2015).

Estudos demonstram que o aumento da glicêmica aumenta o estresse oxidativo, através da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), assim acarretando um desequilíbrio na relação entre os radicais livres e o sistema de defesa das células. As ERO podem prejudicar as células quando reagem com ácidos graxos insaturados das membranas plasmáticas e assim originar peróxidos lipídicos que por sua vez diminuem a fluidez da membrana (KHANDOUZI et al., 2015).

A propriedade antioxidante dos compostos fenólicos do gengibre se dá por apresentarem um grupo hidroxila na sua parte aromática da molécula que agem como agentes redutores e doadores de hidrogênio. Além disso a cadeia longa de hidrocarboneto e em alguns casos, ligações duplas, aumentam a capacidade de doação de elétrons, facilitando a redução (MEDEIROS, 2017). Dessa forma, atuam reduzindo o excesso de radicais livres produzidos pelo organismo de pacientes diabéticos, diminuindo o estresse oxidativo e por consequência o quadro de hiperglicemia (LIMA et al., 2014; KHANDOUZI et al., 2015; SOUZA, 2015).

2.5 Técnicas de extrações

O termo extração significa retirar de forma mais seletiva e completa possível, substâncias e/ou fração (mistura de substâncias) contida do material vegetal a ser utilizado. Para isso é necessário que haja um líquido ou uma mistura de líquidos que sejam tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (SIMÕES et al., 2010).

Para escolher um método de extração de compostos é necessário avaliar a eficiência da técnica e a estabilidade das substâncias a serem extraídas. Além disso, deve-se considerar a finalidade do extrato e assim o custo benefício (MIYAKE, 2016).

Existe uma gama de processos de extração de metabólitos secundários de produtos naturais. Alguns métodos clássicos são: maceração, percolação e soxhlet; enquanto que os menos convencionais são: extração assistida por ultrassom,

extração assistida por micro-ondas, extração utilizando fluido supercrítico, entre outros (SARKER et al, 2005).

A maceração dinâmica por sua vez é uma operação física onde a extração é realizada em um recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sem renovação do líquido extrator e sob agitação. Esta técnica é simples e muito eficaz. É utilizada para preparar tinturas e extratos tendo como principal vantagem a utilização de aparatos simples. Utiliza-se, principalmente, álcool como líquido extrator ou a mistura de álcool e água (MOREIRA et al., 2014)

A eficiência da maceração pode ser afetada por alguns fatores, tais como: teor de umidade, quantidade de material vegetal, tamanho das partículas e a capacidade de intumescimento. Em relação ao líquido extrator, alguns fatores podem influenciar, como: seletividade e quantidade. Outros fatores estão relacionados ao vínculo do sistema: proporção droga/solvente, tempo de extração, dinâmica (agitação), temperatura e pH (BRASIL, 2010).

Outra técnica de extração clássica, como já mencionado, é a que utiliza o equipamento de Soxhlet que, sobretudo, é utilizada para extrair substâncias com solventes voláteis. Nesta técnica, o solvente entra em ebulição por meio de um aquecimento apropriado; o material vegetal entra em contato com o solvente renovado em ciclos, uma vez que durante as extrações utilizando o método de Soxhlet, a matéria prima fica dentro do cartucho durante todo o processo extrativo. Dessa forma, esta técnica possibilita uma eficiência maior empregando uma quantidade reduzida de solvente, sem perda dos materiais. A vantagem desta técnica é que quando comparado com outros processos extrativos, utiliza-se menos solvente para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos (BRUM et al., 2009; SIMÕES et. al., 2010; PROLAB, 2018;).

A extração assistida por ultrassom, por sua vez, utiliza ondas sonoras que criam uma variação de pressão no solvente utilizado (MELECCHI, 2005). Além disso, é uma técnica que traz a possibilidade de obtenção de extratos em menor tempo, além de intensificar o processo. Esta técnica se dá por cavitação gerada pelo ultrassom, favorecendo a penetração do líquido extrator nas paredes celulares. Desta forma o conteúdo de dentro da célula do vegetal é transferido para o meio de forma efetiva (SILVA, 2016). Esta técnica diminui danos ao meio ambiente, uma vez

que o volume de solvente e o tempo utilizado pode ser reduzido (CARDOSO et al., 2014),

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas que contêm campo elétrico e magnético. Ao contrário de outros métodos, a técnica de extração assistida por micro-ondas aquece toda a matéria concomitantemente. Durante a extração, o aquecimento quebra as ligações de hidrogênio em consequência da rotação dipolar. Esta gera choques entre as moléculas e assim libera energia térmica no meio (KAUFMANN & CHRISTEN, 2002). Para que o aquecimento seja eficaz, é preciso utilizar recipientes que tenham o material transparente capaz de absorver energia e transformar em calor. Essa técnica quando aplicada à extração de compostos ativos tem uma maior eficiência quando comparada aos métodos convencionais (TSUKUI & REZENDE, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de extração do [6]-shogaol a partir dos rizomas de *Zingiber officinale*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Secar, pulverizar e tamizar os rizomas de *Z. officinale*;
2. Obter extratos a partir dos rizomas de *Z. officinale* utilizando diferentes técnicas e associações;
3. Realizar a quantificação do [6]-shogaol presente nos extratos utilizando CLAE.
4. Otimizar a extração do [6]-shogaol a partir da melhor condição de extração obtida previamente, utilizando um planejamento fatorial;
5. Isolar o [6]-shogaol por cromatografia líquida clássica (CLC)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação do material vegetal

Os rizomas de *Z. officinale* frescos foram lavados em água corrente, cortados em pequenos pedaços com o auxílio de um processador de alimentos, desidratados em estufa com circulação forçada de ar, por 6 dias a 40°C e 1 dia à 80°C (OK, 2012, com modificações). Posteriormente, o gengibre seco foi triturado, tamizado em peneira de aço (diâmetro da malha: 2 mm) e armazenado em frascos de vidro até o momento das extrações.

4.2 Extração do [6]-shogaol

4.2.1 Maceração dinâmica (Macd)

O gengibre seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico 99,8%, na proporção 1:25, m/v (planta/solvente), em frascos de Erlenmeyer. Foram utilizados 10 gramas dos rizomas secos e 250 mL do solvente. Foi acrescentado 10 mg de ácido *p*-toluenossulfônico (pTSA), mantendo a temperatura de 25°C durante um período de 2 horas, sob agitação magnética (OK, 2012, com modificações).

4.2.2 Soxhlet (S)

O gengibre seco e pulverizado foi transferido para o tubo extrator tipo Soxhlet, colocado entre duas camadas de algodão, e o álcool etílico 99,8% para um balão, na proporção 1:25, m/v (planta/solvente), em balão volumétrico de fundo chato. Foram utilizados 10 gramas dos rizomas secos e 250 mL do solvente e acrescentado 10 mg de pTSA ao solvente extrator. Em seguida a mistura foi submetida a temperatura de 90°C, por um período de 2 horas em banho maria (OK, 2012, com modificações).

4.2.3 Ultrassom (US)

O gengibre seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico 99,8%, na proporção 1:25, m/v (planta/solvente), em frascos de Erlenmeyer. Foram utilizados 10 gramas dos rizomas secos e 250 mL do solvente. Foi acrescentado 10 mg de pTSA ao solvente extrator. Em seguida a mistura foi mantida à temperatura de 50°C, e submetida a ondas de ultrassom (40 KHz) por um período de 60 minutos (LIU, 2014, com modificações).

4.2.4 Micro-ondas (MO)

O gengibre seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico 99,8%, na proporção 1:25, m/v (planta/solvente), em frascos de Erlenmeyer. Foram utilizados 10 gramas dos rizomas secos e 250 mL do solvente e acrescentado 10 mg de pTSA ao solvente extrator. Em seguida a mistura foi submetida a micro-ondas (1000 W, 100% de potência) por um período de 60 segundos (LIU, 2014, com modificações).

4.2.5 Ultrassom associado ao Soxhlet (US-S)

Dez gramas de gengibre seco e pulverizado foi submerso em 250 mL de álcool etílico 99,8%, em frascos de Erlenmeyer, adicionados 10 mg de pTSA, e mantido à temperatura de 50°C, sob ultrassom (40 KHz) por um período de 60 minutos (LIU, 2014, com modificações). Em seguida, a mistura foi transferida para o sistema de Soxhlet e submetida a uma temperatura de 90°C, por um período de 2 horas, em banho maria (OK, 2012, com modificações).

4.2.6 Micro-ondas associado ao Soxhlet (MO-S)

Dez gramas de gengibre seco e pulverizado foi submerso em 250 mL de álcool etílico 99,8%, em frascos Erlenmeyer, adicionados 10 mg de pTSA, e submetido a micro-ondas (1000 W, 100% de potência) por um período de 60 segundos (LIU, 2014, com mo dificações). Em seguida, a mistura será transferida

para o sistema de Soxhlet e submetido a uma temperatura de 90°C, por um período total de 2 horas, em banho maria (OK, 2012, com modificações).

Ao final de cada processo extrativo, o extrato foi filtrado utilizando um sistema de filtração simples e submetido a partições líquido-líquido. Para isso foram adicionados 250 mL de água destilada ao extrato e 1/3 do volume total, de clorofórmio. O processo de partição foi repetido duas vezes. A fração aquosa foi descartada e o solvente da fração orgânica evaporado sob vácuo em rota-evaporador a 40°C.

O extrato bruto (FCHCl₃) obtido em cada processo de extração foi armazenado para as quantificações do [6]-gingerol e [6]-shogaol por CLAE.

Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

4.2.7 Otimização da extração do [6]-shogaol

Para a melhor técnica e condições de extração do [6]-shogaol, um planejamento experimental fatorial 3² foi realizado, utilizando como as variáveis: o tempo de extração e a massa de ácido *p*-toluenossulfônico, em três níveis (-, 0, +) conforme apresentado na Tabela 2. As variáveis dos níveis foram escolhidas a partir da realização de experimentos com tais variações para determinar quais seriam utilizadas na otimização.

Tabela 2- Planejamento fatorial para realização da otimização do processo de extração.

Ensaio	Tempo de extração (h)		Massa do catalisador (mg)	
1	-	6	-	0
2	-	6	0	50
3	-	6	+	100
4	0	15	-	0
5	0	15	0	50
6	0	15	+	100
7	+	24	-	0
8	+	24	0	50
9	+	24	+	100

.3 Análise do extrato de *Z. officinale*

Os extratos de *Z. officinale* foram analisados por CLAE-DAD da Shimadzu Proeminence System, equipado com degaseificador DGU-20A5, bomba binária LC-20AT, injetor automático SIL-10A, detector UV-Vis SPD-M10Avp, interface CBM-20A e "software" LC solution, no Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade da Universidade Federal de Sergipe (LEFT-UFS). Todas as separações foram conduzidas em coluna C18 Eclipse Plus Agilent (4,6 x 100 mm, 3,5 μ). A eluição foi utilizada no modo gradiente usando água/acetoneitrila: 0,0-2,0 min, 10-55% B; 2,0-9,0 min B; 9,0-13,0 min, 65%; 13,0-20,00, 100% B. As corridas foram precedidas por equilíbrio da coluna cromatográfica por 10 min. O volume de injeção foi de 20 μ L, e a vazão de 1 mL/min. O detector UV-Vis foi configurado para operar com o comprimento de onda de 280 nm (YUDTHAVORASIT, 2014).

Os padrões analíticos, isolados previamente pelo grupo de pesquisa, foram utilizados para a construção das curvas de calibração de cada uma das substâncias ([6]-gingerol e [6]-shogaol). A quantificação do [6]-gingerol e [6]-shogaol foram realizadas com o uso das equações 1 e 2. A quantificação do [6]-gingerol se deu para comparar a proporcionalidade entre a degradação do mesmo com da produção do [6]-shogaol.

[6]-gingerol: $y = 11291x + 20061$, $R^2 = 0,9989$ Equação 1

[6]-shogaol: $y = 9079x + 36467$, $R^2 = 0,9983$ Equação 2

4.4 Obtenção da fração enriquecida com o [6]-shogaol

A fração clorofórmica ($FCHCl_3$) obtida dos rizomas de *Z. officinale* do extrato obtido pelo soxhlet foi dissolvido em etanol 99,8% e transferido para um funil de separação. Em seguida foi adicionada água destilada para obter uma solução hidroalcoólica 50% (v/v). Foi adicionado 1/3 do volume total, de hexano para a realização da partição líquido-líquido. A extração líquido-líquido foi realizada até que não se detectasse [6]-shogaol na fase hidroalcoólica. Para isso ambas as fases (hexânica, FES; e hidroalcoólica) foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando o padrão de [6]-shogaol. O eluente utilizado para a

análise por CCD foi hexano/acetato (6:4, v/v). A revelação da placa foi realizada por UV (254 nm) e solução de vanilina sulfúrica (SILVA, 2011).

4.5 Isolamento do [6]-shogaol por Cromatografia Líquida Clássica

O [6]-shogaol foi isolado por meio da Cromatografia Líquida Clássica (CLC), a partir da fração hexânica obtida dos extratos etanólicos dos rizomas de *Z. officinale*. Utilizou-se uma coluna cromatográfica de vidro aberta, preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh) e como fase móvel a mistura binária hexano/acetato de etila (6:4, v/v). As frações foram monitoradas por CCD e reveladas com luz UV (254 nm) e vanilina sulfúrica, utilizando o padrão [6]-shogaol (SILVA, 2011).

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nos diversos experimentos foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa GraphPad Prism[®], versão 7.0, através de Análise de Variância (ANOVA) de 1 via, seguido do teste de múltiplas comparações Newman-Keuls. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Para as análises de superfície resposta foi utilizado o programa STATISTICA[®] versão 7.0. O gráfico de superfície resposta foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis independentes e a resposta e com isso determinar a melhor condição experimental para a extração do [6]-shogaol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos de extração utilizando diferentes técnicas

5.1.1 Rendimentos de obtenção do extrato bruto

Após a realização dos processos de extração pesou-se cada extrato e determinou-se o rendimento de extração com base na massa de gengibre seco.

Na Tabela 3 pode-se observar as massas e os rendimentos dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração. Ao analisar estes resultados é possível perceber que a técnica de extração tem influência direta nos rendimentos de extração (OLIVEIRA, 2016).

Tabela 3- Massas e rendimento (com base na massa de gengibre seco) dos extratos obtidos por diferentes técnicas de extração. Macd (Maceração dinâmica), Soxhlet, MO-S (Micro-ondas associado ao soxhlet), US-S (Ultrassom associado ao soxhlet), MO (Micro-ondas) e US (Ultrassom). ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam que há diferença estatística.

	Macd	Soxhlet	MO-S	US-S	MO	US
Massa de extrato (g)	0,3888	0,3553	0,4472	0,4351	0,3063	0,2391
Desvio padrão	0,0230	0,0137	0,0295	0,0479	0,0552	0,0027
Rendimento (mg/g)	3,89 ^a	3,55 ^a	4,47 ^a	4,35 ^a	3,06 ^b	2,39 ^b
Desvio Padrão	0,16	0,10	0,21	0,34	0,39	0,02

O maior valor absoluto de rendimento de extração ($4,47 \pm 0,21$ mg/g) foi obtido pela técnica de micro-ondas associado ao Soxhlet (MO-S), entretanto após as análises estatística (ANOVA e teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls) observou-se apenas diferença estatística deste resultado com o rendimento obtido

por micro-ondas (M) e ultrassom (US). Desta forma, pode-se dizer que o rendimento de extração de MO-S foi estatisticamente igual a Macd, Soxhlet e US-S.

Normalmente, o processo de extração realizado por Soxhlet exhibe alto rendimento pelo fato do solvente estar constantemente em renovação, chegando deste modo ao esgotamento dos metabólitos secundários. Isso pode ser observado através do rendimento obtido por esta técnica isolada ($3,55 \pm 0,1$ mg/g) e suas associações, uma vez que a associação de técnicas extrativas é realizada para melhorar o rendimento, como também para reduzir o tempo de extração. Como é possível observar quando comparado os rendimentos das técnicas de micro-ondas e ultrassom isolados com as associações com o soxhlet (SANTOS, 2013).

A técnica assistida por micro-ondas oferece vantagens em relação ao tempo de extração, ao consumo de solventes, a simplicidade e a economia do processo, entretanto baixos rendimentos de extração ocorrem devido a ineficiente extração de compostos apolares e a impossibilidade de utilizar tempos maiores de extração, por conta do aquecimento ocasionado pelas micro-ondas (JOVANOVIC et al., 2017). Isto pode explicar o baixo rendimento ($3,06 \pm 0,39$ mg/g) obtido por esta técnica de extração em relação a outras técnicas.

Ao que se refere à extração por ultrassom, existem vantagens, tais como rapidez e baixo custo. Além disso, suas ondas, por meio do efeito das forças de cavitação, ajudam na desestruturação da parede celular aumentando a penetração do solvente nas células vegetais e na liberação do conteúdo celular, acarretando o aumento da eficiência da extração (MORAES, 2012). Apesar dessas vantagens, a técnica de ultrassom utilizada neste trabalho resultou no menor rendimento de extração ($2,39 \pm 0,02$ mg/g).

A maceração é um método que necessita de tempo de extração prolongado e maior contato do vegetal com o solvente (OLIVEIRA, 2015). Entretanto, com apenas 2 horas de contato da planta com o solvente sob agitação, obteve-se um rendimento de extração ($3,89 \pm 0,16$ mg/g), estatisticamente igual ao Soxhlet e associações, e maior quando comparado com MO e US.

Desta forma, com relação ao rendimento de extrato obtido, as melhores técnicas de extração foram: maceração dinâmica e todas aquelas que utilizaram Soxhlet. Entretanto, apenas após as análises dos extratos com relação a quantidade

de [6]-shogaol extraído, será selecionada a técnica mais promissora para a otimização da extração.

5.1.2 Rendimento de obtenção do [6]-shogaol

A partir das análises dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi possível determinar qual técnica foi capaz de obter a maior quantidade de [6]-shogaol.

A técnica de extração que foi capaz de obter o rendimento mais alto de [6]-shogaol foi Soxhlet (0,57 mg/g), provavelmente pelo motivo da constante renovação do solvente levar ao esgotamento dos metabólitos secundários, além do aquecimento que induz a transformação do [6]-gingerol em [6]-shogaol. Por outro lado, a técnica onde se obteve o menor rendimento foi a extração assistida por micro-ondas, com 0,03 mg/g de gengibre seco (Figura 5). Neste caso, o pequeno tempo de extração pode ter influenciado no rendimento de extração.

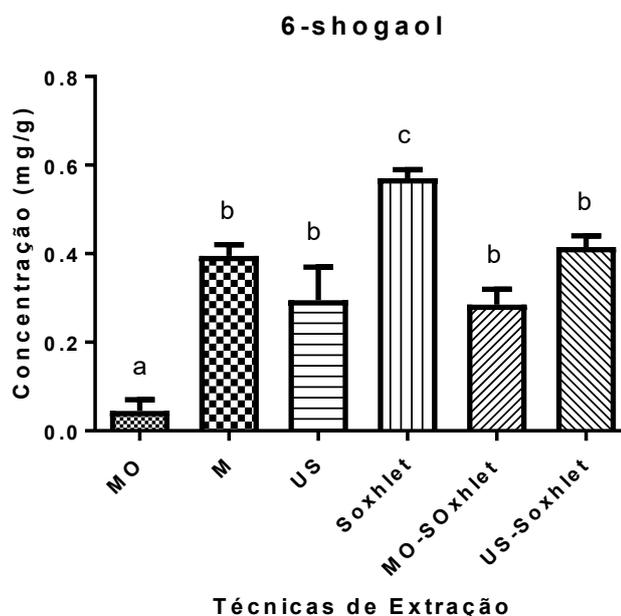


Figura 5- Rendimento de [6]-shogaol em extratos obtidos por micro-ondas (MO), maceração (M), ultrassom (US), soxhlet, soxhlet associado a ultrassom e soxhlet associado a micro-ondas. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

É possível observar que além do melhor rendimento, Soxhlet foi a técnica em que obtiveram o menor desvio padrão, mostrando ser um processo bastante reprodutível, diferentemente da extração assistida por ultrassom onde a sua variância foi maior quando comparado com as outras técnicas.

Os rendimentos obtidos com as associações: micro-ondas e Soxhlet (MO-S) assim como ultrassom e Soxhlet (US-S) foram menores do que o obtido por Soxhlet isolado. Justifica-se este fato pela possível transformação de [6]-gingerol em outros produtos como zingerona e hexanal (Figura 4, pág. 15), pois assim como o [6]-shogaol, estes produtos são artefatos do gengibre que ao ser submetido a processamento térmico ou armazenamento em longo prazo são produzidos (CHEN & ROSEN & HO, 1986).

5.2 Otimização do processo de extração do [6]-shogaol utilizando planejamento fatorial 3²

Como a técnica de Soxhlet foi a mais eficiente na extração do [6]-shogaol, esta foi utilizada no planejamento fatorial, com objetivo de otimizar a extração. Como pode ser observado na Tabela 4, o maior rendimento de extrato bruto obtido na otimização se deu na extração realizada durante 15 horas sem pTSA (5,78 mg/g). Já o menor rendimento, foi observado na extração onde a quantidade de pTSA usada foi 100 mg com duração de 6 horas, apresentando 4,00 mg/g (Tabela 5). O menor tempo de contato da planta com o solvente pode explicar este baixo rendimento.

Tabela 4- Rendimento de extração dos experimentos realizados segundo o planejamento fatorial.

Ensaio	Tempo (h)	Massa do catalisador (mg)	Rendimento do extrato bruto (mg/g)
1	6	0	4,952 ± 0,013
2	6	50	4,556 ± 0,013
3	6	100	4,001 ± 0,022
4	15	0	5,783 ± 0,069
5	15	50	5,143 ± 0,007
6	15	100	5,704 ± 0,020
7	24	0	5,268± 0,007
8	24	50	5,345 ± 0,013
9	24	100	4,951 ± 0,006

Analisando a quantidade de [6]-gingerol extraído, percebe-se que na extração realizada sem pTSA atingiu-se a maior quantidade de [6]-gingerol, fato claramente explicado pela preservação deste metabólito no extrato, na ausência do catalisador (Figura 6).

Com 6 horas de extração, na presença de catalisador, nota-se que a quantidade de [6]-gingerol é bem menor do que quando não se utiliza pTSA. Isto ocorreu pois uma parte do [6]-gingerol foi convertido em [6]-shogaol. O baixo rendimento de extração do [6]-gingerol se mantém ao longo do tempo quando se utilizou 100 mg de pTSA. Já quando utilizou-se 50mg de pTSA, percebe-se que a medida em que o tempo passa, a concentração de [6]-gingerol aumenta, mostrando que a extração do [6]-gingerol continua sem a devida conversão deste em seu produto desidratado.

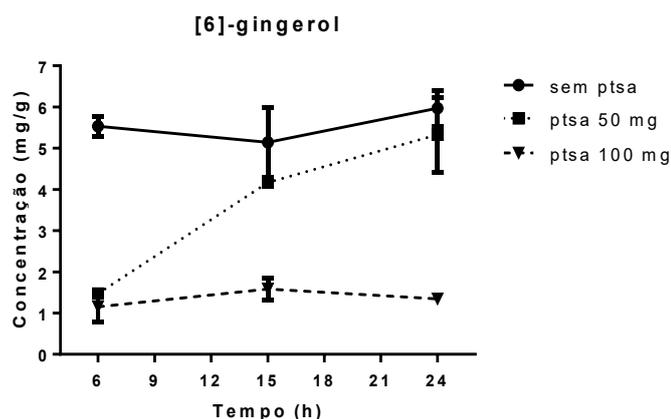
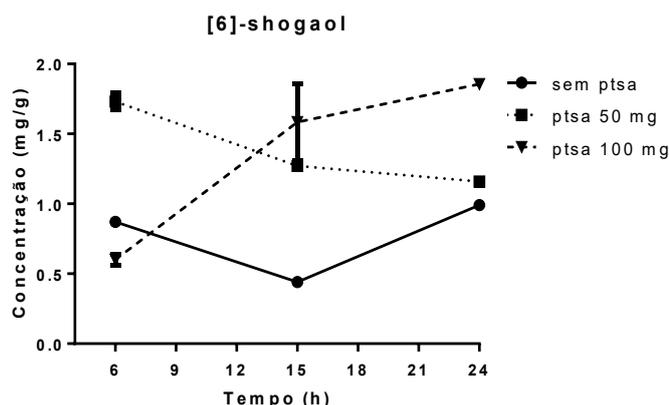


Figura 6- Rendimentos de [6]-gingerol em diferentes tempos de extração e massa de pTSA ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Como pode-se observar na Figura 7, o [6]-shogaol foi extraído em maior quantidade no tempo de 24 horas na presença do catalisador em sua concentração máxima, ou seja, tanto a presença do ácido quanto o tempo de extração favorece a desidratação e então a sua formação. Como já era de se esperar, o rendimento de [6]-shogaol, na ausência de pTSA foi pequeno, uma vez que a conversão do [6]-gingerol a [6]-shogaol é bem menor (Figura 7).



Figuras 7- Rendimentos de [6]-shogaol em diferentes tempos de extração e massa de pTSA. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 8, é possível comparar o rendimento das extração de [6]-shogaol e [6]-gingerol realizadas com diferentes concentrações do catalisador, no tempo de 24 horas. O rendimento máximo de [6]-shogaol foi alcançado quando usou-se 100 mg

do p-toluenossulfônico. Diferentemente das condições nas quais o [6]-gingerol foi extraído com maior rendimento, sendo a extração sem pTSA aquela que teve maior rendimento desta substância.

Quando foram utilizadas concentrações maiores de pTSA, como 100 mg, o rendimento de [6]-gingerol foi baixo, podendo ser justificado pela conversão do [6]-gingerol em [6]-shogaol, por meio da reação de desidratação. A formação de zingerona e hexanal, através da reação retro-aldol, também ocorre, uma vez que concentração de [6]-shogaol não aumenta proporcionalmente com a diminuição da quantidade de [6]-gingerol (Figura 8).

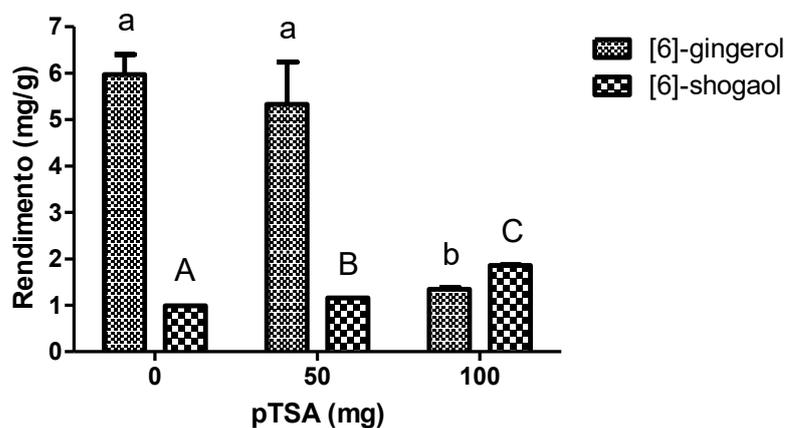


Figura 8- Rendimentos de [6]-shogaol e [6]-gingerol usando massas diferentes do ácido p-toluenossulfônico, após 24 horas de extração. ANOVA, pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. As letras maiúsculas e minúsculas devem ser analisadas separadamente.

Os gráficos de superfície de contorno, apresentado na Figuras 9 mostra o efeito da combinação da massa de catalisador com o tempo de extração sobre a quantidade de [6]-shogaol extraído. Ele mostra nitidamente que quanto maior o tempo de extração nas quantidades mais altas de catalisador, maior é a quantidade de [6]-shogaol extraído, demonstrando que o efeito combinado destes dois fatores é importante para o maior rendimento de extração deste metabólito secundário.

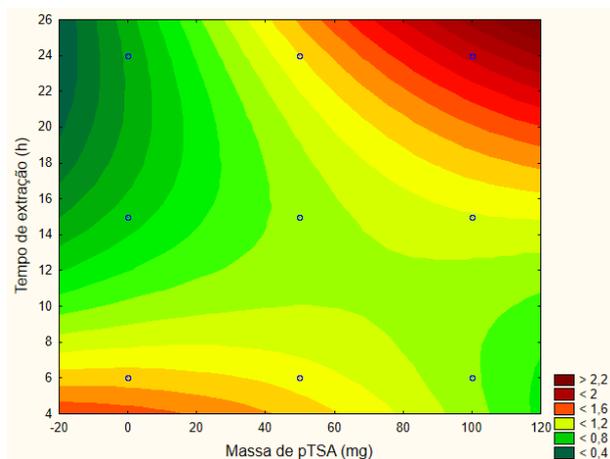


Figura 9- Superfície de contorno representando o efeito da interação da massa de catalisador (pTSA) com o tempo de extração sobre a quantidade de [6]-shogaol extraído (mg/g).

Por meio do diagrama de Pareto (Figura 10) é possível observar que o efeito da interação dos 2 fatores (massa de catalisador e tempo de extração) é o único que apresenta significância, sendo consistente com a discussão dos gráficos anteriores. Diz-se que o efeito é significativo quando a coluna horizontal ultrapassar a linha vermelha que indica $p < 0,05$

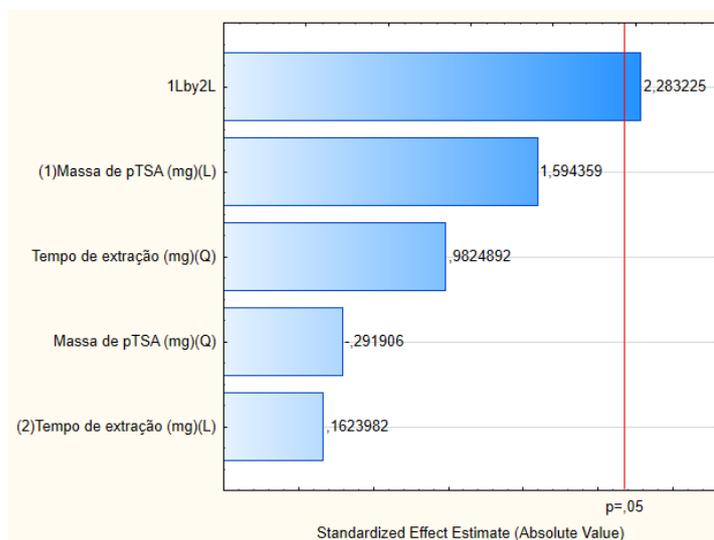


Figura 10- Diagrama de Pareto representando a análise de variância para os componentes lineares e quadráticos dos fatores estudados. Resultados são significantes para $p < 0,05$.

5.3 Isolamento do [6]-shogaol

Para o isolamento do [6]-shogaol utilizou-se a fração enriquecida com o [6]-shogaol (FES) obtida por partição líquido-líquido utilizando-se hexano. Uma análise por CCD das frações obtidas após a partição líquido-líquido pode ser observada na Figura 11. Observa-se a ausência da banda referente ao [6]-shogaol na fração hidroalcoólica (FHA) e conseqüentemente presença na fração hexânica (FH).

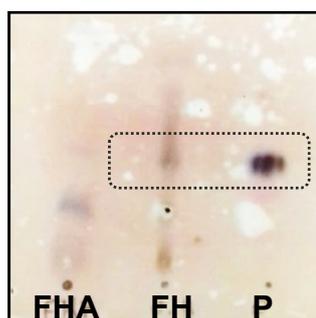


Figura 11- Placa de Cromatografia em Camada Delgada desenvolvida com as frações obtidas após a realização da partição líquido-líquido. FHA (Fração Hidroalcoólica); FH (Fração Hexânica) e P (Padrão: [6]-shogaol). Um retângulo pontilhado destaca as bandas referentes ao [6]-shogaol.

No isolamento realizado por cromatografia líquida clássica foram coletadas 20 frações (30 mL), monitoradas por CCD e então reunidas de acordo com o seu perfil químico. Com isso, foi possível observar que o [6]-shogaol estava presente nas frações 6 e 7, com razoável grau de pureza, considerando esta análise, pois observa-se, principalmente, a banda cromatográfica com mesmo fator de retenção ($R_f=0,55$) que o padrão. A esta reunião denominou-se de ZOSCH-C (Figura 12), onde ZO refere-se ao extrato bruto do gengibre, S à técnica utilizada para o isolamento, C à fração clorofórmica e H à fração hexânica.

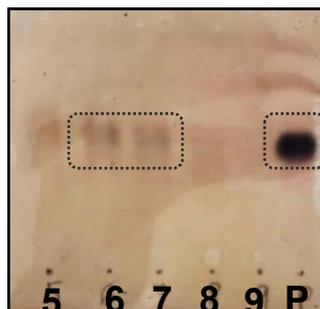


Figura 12- Placa de Cromatografia em Camada Delgada desenvolvida após a realização da cromatografia clássica apresentando as frações onde o [6]-shogaol estava presente. P: [6]-shogaol. Retângulos pontilhados destacas as bandas referentes ao [6]-shogaol.

O cromatograma obtido após análise da fração ZOSCH-C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV) pode ser observado na Figura 13.

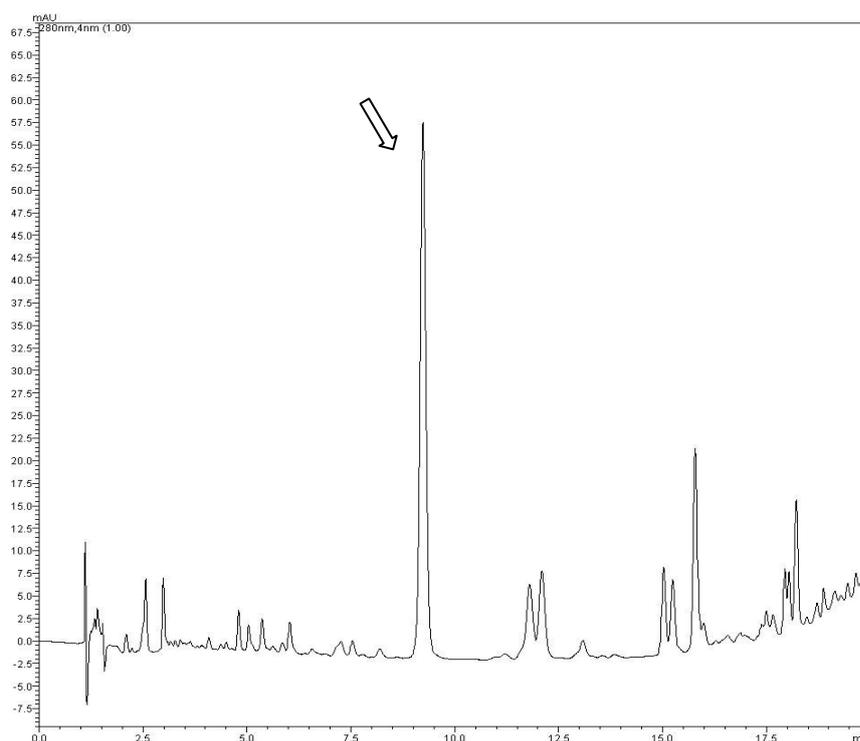


Figura 13- Cromatograma da fração ZOSCH-C, com a banda referente ao [6]-shogaol indicada por uma seta ($t_r = 9,4$ min). Condições cromatográficas: coluna C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ); fase móvel: água (A)/acetonitrila (B): 0,0-2,0 min, 10-55% B; 2,0-9,0 min 55% B; 9,0-13,0 min, 65% B; 13,0-20,0, 100% B. O volume de injeção, 20 μ L; vazão 1 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 280 nm.

Pode-se observar no cromatograma a banda intensa referente ao [6]-shogaol no tempo de retenção de 9,4 minutos, no entanto observa-se também diversas

outras bandas menos intensas, o que demonstra a baixa pureza desta substância nesta amostra. Desta forma é necessário que mais etapas de purificação, sejam realizadas, seja por Cromatografia Líquida Clássica (CLC) ou por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para se chegar a um produto com elevado grau de pureza (>95%).

Este trabalho teve como finalidade a obtenção de técnicas e variáveis que conseguissem extrair ainda mais [6]-shogaol, uma vez que este metabólito secundário apresenta diversas indicações terapêuticas comprovadas em estudos.

6 CONCLUSÃO

A metodologia foi implementada para a otimização das condições experimentais para obtenção do [6]-shogaol. Diante das análises, foi possível concluir que o método mais eficiente para extração de [6]-shogaol foi o Soxhlet. Os resultados indicam que a massa do catalisador e tempo de extração afetou de forma positiva o rendimento do [6]-shogaol. Tanto o tempo máximo de extração como a massa máxima do catalisador favorecem a reação de desidratação e então a formação do [6]-shogaol a partir do [6]-gingerol, apesar do aumento da quantidade de [6]-shogaol não ser proporcional à diminuição da quantidade de [6]-gingerol, com o aumento da quantidade de catalisador. Desta forma, deve haver um controle maior das condições experimentais para que o [6]-gingerol seja convertido em sua maior parte em [6]-shogaol e assim a eficiência de extração deste importante composto bioativo seja aumentada.

Devido a grande variedade de efeitos terapêuticos atribuídos ao [6]-shogaol, a otimização do seu processo de extração é um passo importante para produção de medicamentos à base desta substância, assim podendo diminuir as reações adversas e ser mais eficiente do que os que estão no mercado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARABLOU, T. et al.. The effect of ginger consumption on glycemic status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Food Sciences and Nutrition*, v. 65, n. 4, p. 515 – 520, 2014.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

CHAVES, F. C. M. et al. Avaliação agrônômica e caracterização química de acessos de gengibre (*Zingiber officinale*) nas condições de Manaus, AM. *The journal Horticultura Brasileira*, v. 30, n. 2, p. 5805 – 5809, Julho 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80345/1/A4748-T8541-Comp.pdf>>. Acesso em: 28/11/2018.

CHEN, C.; ROSEN, R. T.; HO, C. Chromatographic analyses of gingerol compounds in ginger (*Zingiber officinale roscoe*) extracted by liquid carbon dioxide. *Journal of Chromatography*, p. 163 – 173, 1986.

CHENG, X. et al.. Steamed ginger (*Zingiber officinale*): Changed chemical profile and increased anticancer potential. *Food Chem.*, v. 129, n. 4, p. 1785-1792, 2011.

CONCEIÇÃO, S. F. da Silva Martins da. *Efeitos do Gengibre, do Alho e do Funcho na Saúde*. 2013. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Fernando Pessoa.

DUGASANI, S. et al.. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharm.*, v. 127, n. 2, p. 515-520, 2010.

EMBRAPA. *GENGIBRE*. Porto Velho, 2001. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100657/1/Folder-gengibre.pdf>>. Acesso em: 22/12/2018.

FUNK, J. L. et al.. Comparative effects of two gingerol-containing *Zingiber officinale* extracts on experimental rheumatoid Arthritis. *J. Nat. Prod.*, v. 72, n. 3, p. 403-407, 2009.

HENROTIN, Y. et al.. Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 18, p. 141-149, 2010.

JOVANOVIC, A. et al.. Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite Sirovine*, v. 37, p. 45 – 49, 2017.

KHANDOUZI, N. et al. The Effects of Ginger on Fasting Blood Sugar, Hemoglobin A1c, Apolipoprotein B, Apolipoprotein A-I and Malondialdehyde in Type 2 Diabetic Patients. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 1, n. 14, p. 131 – 140, 2015.

KOU, X. et al.. Efficient dehydration of [6]-gingerol to [6]-shogaol catalyzed by an acidic ionic liquid under ultrasound irradiation. *Food Chem.* v. 215, p. 193 – 199, 2017.

KOU, X. et al.. Occurrence, biological activity and metabolism of [6]-shogaol. *Food & Function*, v. 9, p. 1310 – 1327, 2018.

LIMA, A. de et al. GENGIBRE (ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE), PROPRIEDADES BIOATIVAS E SEU POSSÍVEL EFEITO NO DIABETES TIPO 2: ESTUDO DE REVISÃO. *Rev. Saúde em Foco*, v. 1, n. 2, p. 15 – 25, Dezembro 2014.

LIU, W. et al. Optimized microwave-assisted extraction of [6]-gingerol from *Zingiber officinale* roscoe and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* v. 13, n. 2, p. 155-168, 2014.

LIU, Q. et al.. [6]-shogaol induces apoptosis in human leukemia cells through a process involving caspase-mediated cleavage of eIF2. *Molecular Cancer*, BioMed Central, v. 12, n. 1, p. 1 – 12, 2013. ISSN 1476-4598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176122/>>.

LI, W-J. et al. Phenylalkanoids from *Zingiber officinale*. *Chem. Nat. Compounds*, v. 49, n. 3, p. 440-442, jul. 2013.

MA, J.; et al. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry*, v. 65, n.8, p. 1137-1143, abr. 2004.

MEDEIROS, R. de Oliveira Neves Bettencourt de. *ESTUDO DA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE DO GENGIBRE, SUA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA*. 2017. 68 p. Dissertação (Mestrado Integrado Em Ciências Farmacêuticas) — Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz. Disponível em: <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/20249/1/Medeiros_Raquel_de_Oliveira_Neves_Bettencourt_de.pdf>. Acesso em: 10/01/2019.

MIYAKE, T. *Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais*. 2016. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>>. Acesso em: 20/12/2018.

MISHRA, R. K.; KUMAR, A.; KUMAR, A. Pharmacological Activity of *Zingiber officinale*. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences*, v. 1, n. 3, p. 1422 – 1427, 2012.

MORAES, H. H. Q. *Otimização experimental da extração do óleo essencial de gengibre (zingiber officinale)*. 2012. 133 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) — Universidade Federal do Pará.

MOREIRA, P. D. et al. Análise de métodos de extração de alcaçuz (*glycyrrhiza glabra*) por maceração estática e dinâmica. In: CAMILO C. U. S. (Ed.). *II Simpósio De Assistência Farmacêutica*. [s.n.], 2014. Disponível em: <<http://www.saocamilo-sp.br/novo/eventos-noticias/saf/resumo-2.pdf>>. Acesso em: 08/01/2019.

OLIVEIRA, V.B. et al.. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clacdad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 18, n. 1, p. 230 – 239, 2016.

OLIVEIRA, F. G. D. S. *Influência do método extrativo sobre a produção de compostos fenólicos em Hymenaea martiana (Fabaceae) e controle de qualidade da droga vegetal*. 2015. 208 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) — UNIVERSIDADE EDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO.

OK, S.; JEONG, W-S. Optimization of Extraction Conditions for the [6]-shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Prev. Nutr. Food Sci.*, v. 17, p. 166-171, 2012.

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

PROLAB. *Saiba como funciona o Soxhlet e sua importância na extração de lipídeos*. 2018. Disponível em: <<http://www.prolab.com.br/blog/equipamentos-aplicacoes/saiba-como-funciona-o-soxhlet-e-sua-importancia-na-extracao-de-lipideos/>>. Acesso em: 10/01/2019.

REHMAN, R. et al.. *Zingiber officinale* Roscoe (pharmacological activity). *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, n. 3, p. 344 – 348, 2011.

RODRIGUES, F. A. P. et al.. Gingerol Fraction from *Zingiber officinale* Protects against Gentamicin-induced Nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 58, n. 4, p. 1872-1878, 2014.

SANTOS, E. R. M. *Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de Rumex acetosa*. 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. *Natural Products Isolation*. New Jersey: Human Press, 2006.

SILVA, J. A. *Busca de Inibidores da Catepsina K em Plantas Medicinais Utilizadas no Tratamento de Doenças Osteoarticulares*. Tese de doutorado, São Carlos: UFSCar, 2011, 157 f.

SILVA, J.A. et al.. Purification and differential biological effects of ginger-derived substances on normal and tumor cell lines. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, v. 903, p. 157–162, 2012.

SILVA, A. et al. Boletim fitoterápico Gengibre (*Zingiber officinale* R.). *Portal de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*, v. 1, n. 1, p. 1 – 430, Março 2017. Disponível em: <<http://www.fitoterapicos.ufpa.br/artigos/gengibre%20final.pdf>>.

SIMÕES, C.M.O. et al.. (Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *Pharma Nutrition*, v. 5, n. 1, p. 18 – 28, 2017.

SOUSA, L. S. et al.. Estudo prospectivo sobre as propriedades terapêuticas do *Zingiber officinale* (gengibre) com ênfase na ação antimicrobiana. *Revista GEINTEC*, v. 3, n. 5, p. 427 – 436, 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 6, p. 1713 – 1725, 2014.

VIEIRA, N. A. et al. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 35, n. 1, p. 149 – 162, junho 2014.

VILLALVILLA, A. et al.. [6]-shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. *Mol. Nutr. Food. Res.*, v.58, n. 2, p. 256–266, 2014.

YUDTHAVORASIT, S.; WONGRAVEE, K.; LEEPIPATPIBOON, N. "Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics". *Food Chem.*, 158, 101 -111, 2014.

ZICK, S. M. et al.. Pharmacokinetics of [6]-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and [6]-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, v. 17, n. 8, p. 1930-1936, 2008.